
Autoreferat

*Reakcje dehalogenacji: od reakcji
modelowych do rzeczywistych układów
środowiskowych*

dr inż. Agnieszka Dybała-Defratyka

Międzyresortowy Instytut Techniki Radiacyjnej
Wydział Chemiczny
Politechnika Łódzka

Spis treści

1. Dane osobowe.....	3
2. Wykształcenie.....	3
3. Dotychczasowe zatrudnienie	3
4. Osiągnięcia naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego	3
5. Pozostałe osiągnięcia naukowo-badawcze	14
5.1. Spis publikacji niewchodzących w zakres tematyki habilitacyjnej.....	14
5.2. Najbliższe plany badawcze.....	20
5.3. Udział w projektach badawczych.....	23
5.4. Staże naukowe	23
5.5. Uzyskane stypendia.....	24
5.6. Współpraca międzynarodowa	24
5.7. Najważniejsze nagrody i wyróżnienia wynikające z prowadzenia badań naukowych	24
5.8. Udział w konferencjach i komitetach organizacyjnych konferencji	25
5.9. Recenzowanie publikacji.....	27
5.10. Opieka naukowa nad studentami oraz doktorantami.....	28
6. Działalność dydaktyczna.....	28
7. Udział w zespołach eksperckich	29
8. Udział w warsztatach i szkoleniach	29
9. Inne doświadczenia zawodowe.....	29
10. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego	30

1. Dane osobowe

Imię i Nazwisko: **Agnieszka Dybała-Defratyka**

2. Wykształcenie

2003 Stopień doktora nauk chemicznych, rozprawa doktorska pt. "Hydrogen Isotope Effects on the Reaction Catalyzed by Methylmalonyl-CoA Mutase", promotor: prof. dr hab. Piotr Paneth, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

1997 Mgr inż. chemii, tytuł pracy magisterskiej: "Badania radiacyjnego tworzenia żeli w wodnych roztworach polimerów syntetycznych", praca wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Janusza M. Rosiaka, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

3. Dotychczasowe zatrudnienie w jednostkach naukowych

10.2009-obecnie adiunkt, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

07.2009-09.2009 specjalista, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

02.2003-06.2009 chemik, Wydział Chemiczny Politechniki Łódzkiej

4. Osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa przewodu habilitacyjnego

a) tytuł osiągnięcia naukowego

Reakcje dehalogenacji: od reakcji modelowych do rzeczywistych układów środowiskowych

Podstawę osiągnięcia stanowi cykl 9 oryginalnych publikacji współautorstwa habilitantki

b) Spis monotematycznych publikacji stanowiących osiągnięcie naukowe zgłoszone jako podstawa do przewodu habilitacyjnego. Kopie publikacji oraz oświadczenia współautorów zamieszczono odpowiednio w załącznikach 3 i 4

[H1] A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, O. Matsson, K.C. Westaway, P. Paneth, *A New Interpretation of Chlorine Leaving Group Kinetic Isotope Effects; A Theoretical Approach*, J. Org. Chem. 69 (2004) 4900, **IF₂₀₀₄=3.462**, wkład własny=35%

Moim wkładem jest wykonanie części obliczeń (w zespole prof. Piotra Paneth), udział w analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu.

[H2] O. Matsson, A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, P. Paneth, K.C. Westaway, *A Theoretical Investigation of α -Carbon Kinetic Isotope Effects and Their Relationship to the Transition-State Structure of S_N2 Reactions*, J. Org. Chem. 70 (2005) 4022, **IF₂₀₀₅=3.675**, wkład własny=25%

Moim wkładem jest wykonanie części obliczeń (w zespole prof. Piotra Paneth), udział w analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu.

[H3] Y.-R. Fang, S. MacMillar, J. Eriksson, M. Kolodziejska-Huben, A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, O. Matsson, K.C. Westaway, *The effect of solvent on the structure of the transition state for the $S(N)2$ reaction between cyanide ion and ethyl chloride in DMSO and THF probed with six different kinetic isotope effects*, J. Org. Chem. 71 (2006) 4742, **IF₂₀₀₆=3.790**, wkład własny=25%

Moim wkładem jest wykonanie części obliczeń, udział w analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu.

[H4] A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, P. Paneth, *Enzyme mechanisms from molecular modeling and isotope effects*, Arch. Biochem. Biophys. 474 (2008) 274, **IF₂₀₀₈=2.626**, wkład własny=60%

Moim wkładem jest zaprojektowanie oraz wykonanie części obliczeń, udział w analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu manuskryptu.

[H5] A. Dybala-Defratyka, L. Szatkowski, R. Kaminski, M. Wujec, A. Siwek, P. Paneth, *Kinetic Isotope Effects on Dehalogenations at an Aromatic Carbon*, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 7744, **IF₂₀₀₈=4.458**, wkład własny=50%

Moim wkładem jest udział w koncepcji pracy, wykonanie części obliczeń, analizie i interpretacji wyników oraz w przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu.

[H6] L. Szatkowski, M.K. Thompson, R. Kaminski, S. Franzen, A. Dybala-Defratyka, *Oxidative dechlorination of halogenated phenols catalyzed by two distinct enzymes: horseradish peroxidase and dehaloperoxidase*, Arch. Biochem. Biophys. 505 (2011) 22, **IF₂₀₁₁=2.935**, wkład własny=60%

Moim wkładem jest koncepcja pracy, zaprojektowanie obliczeń oraz eksperymentu, wykonanie obliczeń oraz udział w analizie wyników oraz przygotowanie pierwszej oraz ostatecznej wersji manuskryptu.

[H7] L. Szatkowski and A. Dybala-Defratyka, *A computational study on enzymatically driven oxidative coupling of chlorophenols: An indirect dehalogenation reaction*, Chemosphere 91 (2013) 258, **IF₂₀₁₃=3.137**, wkład własny=70%

Moim wkładem jest koncepcja pracy, zaprojektowanie obliczeń, udział w analizie wyników oraz korekta pierwszej oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu

[H8] L. Szatkowski, A. Dybala-Defratyka, C. Batarseh, J. Blum, L. Halicz and F. Gelman, *Bromine kinetic isotope effects: insight into Grignard reagent formation*, New J. Chem. 37 (2013) 2241, **IF₂₀₁₃=2.966**, wkład własny=50%

Moim wkładem jest zaplanowanie części obliczeniowej pracy, wykonanie części obliczeń oraz udział w interpretacji wyników i przygotowaniu wszystkich kolejnych wersji manuskryptu.

[H9] R. Manna, A. Dybala-Defratyka, *Insights into the Elimination Mechanisms Employed for the Degradation of Different Hexachlorocyclohexane Isomers Using Kinetic Isotope Effects and Docking Studies*, J. Phys. Org. Chem. 26 (2013) 797, **IF₂₀₁₃=1.578**, wkład indywidualny=70%

Moim wkładem jest koncepcja pracy, zaprojektowanie obliczeń, udział w analizie wyników oraz korekta pierwszej oraz przygotowanie ostatecznej wersji manuskryptu.

<i>Łączny IF publikacji wchodzących w skład monotematycznego cyklu prezentacji to <u>28.627</u>.</i>
--

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników

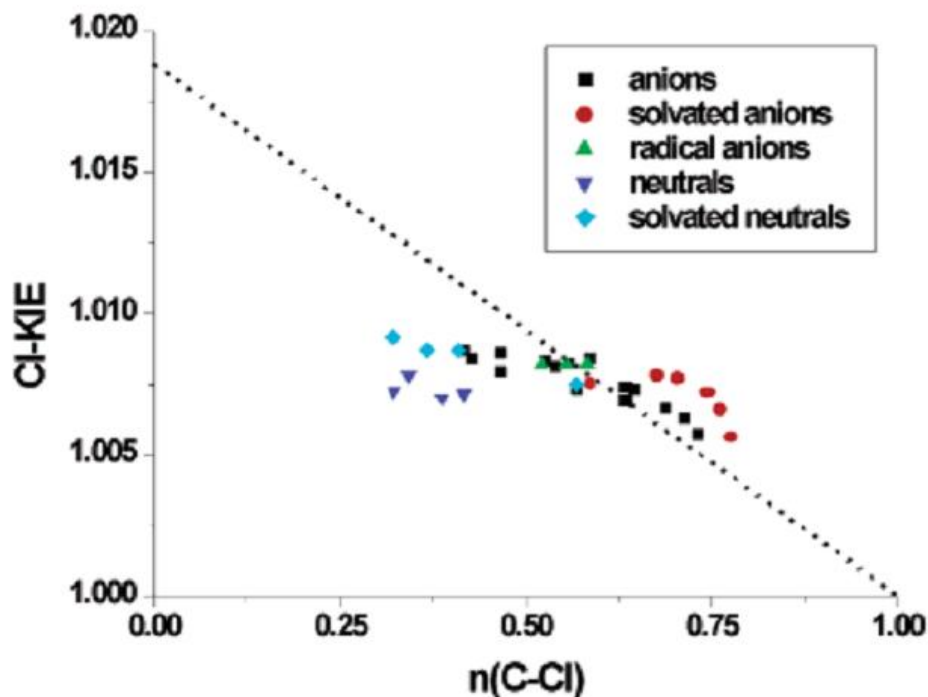
Przedmiotem wybranych prac stanowiących cykl habilitacyjny jest charakterystyka reakcji dehalogenacji. Problemem pozbywania się toksycznych organicznych związków halopochodnych środowisko naukowe zajmuje się nie od wczoraj. W miarę jednak

poprawiającej się możliwości detekcji tych związków w środowisku naturalnym (rozwój metod analitycznych), wskazywania ich kolejnych źródeł pochodzenia (działalność człowieka a procesy bio i geogeniczne) oraz pojawiania się nowych sposobów adaptowanych przez Naturę celem pozbywania się szkodliwych substancji (ewoluowanie nowych enzymów, przystosowywanie nowych funkcji przez enzymy już istniejące) rośnie również potrzeba szczegółowego opisu tychże procesów a w szczególności zerwania wiązania węgiel-halogen, gdyż akt ten stanowi załączek ogólnie rozumianego procesu detoksyfikacji halogenopochodnych związków organicznych i jest on dość mocno zróżnicowany mechanistycznie w zależności od szeregu czynników (np. organizmów mających zdolność utylizacji tego typu zanieczyszczeń, warunków przebiegu procesu, itd). [1]

Charakterystyka tych reakcji na poziomie molekularnym może zatem stanowić istotny wkład w obecny stan wiedzy na temat strategii wykorzystywanych w przemianach środowiskowych prowadzących do wyeliminowania podstawników halogenowych ze związków organicznych oraz może stać się załączkiem metody-narzędzia interpretacyjnego dla obserwowanych trendów w analizie izotopowej próbek środowiskowych. Metodą, która została wybrana są kinetyczne efekty izotopowe (z ang. kinetic isotope effect - KIE), porównanie wartości których uzyskanych doświadczalnie jak i przewidzianych teoretycznie już niejednokrotnie pozwoliło opisać szczegółowo mechanizm dehalogenacji.[2]

Skoro podstawową i zarazem wspólną bez względu na mechanizm kwestią wymagającą rozstrzygnięcia w tak rozległym tematycznie zagadnieniu jakim są reakcje dehalogenacji jest szczegółowy opis warunków zerwania wiązania węgiel-halogen naturalnym podejściem było uprzednie stworzenie prostych modeli, które pomogłyby przetestować metody zarówno doświadczalne jak i teoretyczne pod względem ich poprawności i wydajności w badaniach układów zawierających związki haloorganiczne.

W serii prac [**H1-3**] skoncentrowaliśmy się na czynnikach wpływających na efekt izotopowy oraz strukturę stanu przejściowego (TS) na przykładzie modelowych reakcji podstawienia nukleofilowego zarówno w fazie gazowej jak i w roztworze. Zbadano wpływ różnych rozpuszczalników oraz różnych nukleofili na KIE węgla, azotu, chloru i wodoru. Stosując wcześniej [A3] wybraną metodę oraz poziom obliczeń struktury elektronowej przewidzieliśmy teoretycznie KIE chloru dla reakcji S_N2 chlorku metylu z 25 różnymi nukleofilami (Rys. 1).



Rys. 1. Zmiana kinetycznego efektu izotopowego chloru w zależności od rzędu wiązania węgiel-chlor. Linia przerywana przedstawia tę samą zależność, ale wyznaczoną korzystając z podejścia BEBOVIB [Sims LB, Burton GW, Lewis DE (1997) BEBOVIB-IV, QCPE No.337 (Quantum Chemistry Program Exchange, Department of Chemistry, University of Indiana: Bloomington, IN,)]

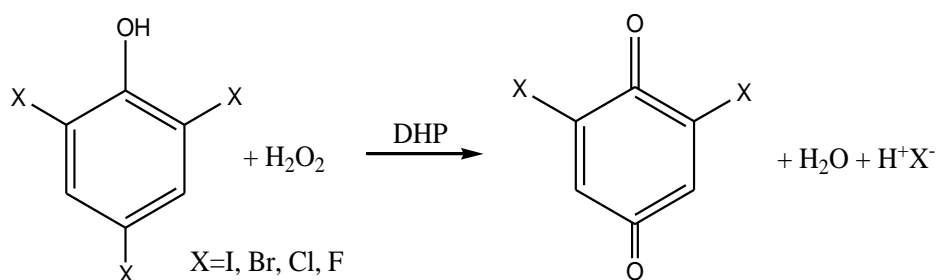
Wyniki tych badań stanowią swojego rodzaju ostrzeżenie przed próbami oszacowywania długości wiązania C-Cl w stanie przejściowym na podstawie wielkości efektu izotopowego grupy opuszczającej. Szczegółowa analiza wszystkich komponentów całkowitego KIE pokazała, że niezbędnym jest oszacowanie zarówno udziału efektu tunelowania oraz współczynnika niezależnego od temperatury, gdyż to ich iloczyn wpływa istotnie na brak liniowej zależności pomiędzy CI-KIE a strukturą TS.

Kontynuując badania układów modelowych skoncentrowaliśmy się na wpływie rozpuszczalnika na strukturę TS i w konsekwencji na wielkość obserwowanych i przewidzianych efektów izotopowych. Do tego celu wybraliśmy reakcję S_N2 chlorku etylu z jonem cyjankowym przeprowadzoną w roztworze THF, wyznaczono efekty izotopowe wodoru, węgla α , węgla i azotu w cząsteczce nukleofila, oraz chloru [H2] i porównano je z wcześniej zmierzonymi tymi samymi efektami, ale w roztworze DMSO [A3]. Nie znaleziono znaczących różnic pomiędzy wymodelowanymi stanami przejściowymi reakcji prowadzonej w różnych warunkach, co potwierdza doświadczalną "regulę solwatacji w reakcjach S_N2 ".[3] Istotną obserwacją z tych badań było również to, że wszystkie, z wyjątkiem grupy

opuszczającej, wyznaczone efekty izotopowe wskazywały jednoznacznie na wczesny stan przejściowy (podobny do substratu), natomiast wielkość Cl-KIE wskazywała jednoznacznie na geometrię bardziej przypominającą produkt (dość znacznie rozluźnienie wiązania C_α-Cl, Cl-KIE_{teor}=1.0070, Cl-KIE_{DMSO}=1.0070 ± 0.0003, Cl-KIE_{THF}=1.0066 ± 0.0001) jeśli interpretować doświadczalny KIE przy użyciu tradycyjnej zależności liniowej [H3]. Nadmienić także warto, że wartość przewidziana teoretycznie pochodziła z obliczeń kwantowomechanicznych bez uwzględniania rozpuszczalnika (faza gazowa), co dodatkowo mogłoby potwierdzać brak wpływu takowego na strukturę stanu przejściowego reakcji S_N2, w której zarówno nukleofil jak i grupa opuszczająca mają ten sam ładunek i w związku z tym należy się spodziewać zbliżonego wpływu solwatacji obu indywiduów. W pracy [H2] przeprowadzono dodatkową analizę C_α-KIE dla reakcji S_N2 oraz ocenę przydatności tychże efektów do oszacowania struktury stanu przejściowego reakcji.

Następnie, kontynuując badania procesu dehalogenacji zajęłam się związkami obecnymi w środowisku naturalnym i stanowiącymi jego potencjalne zagrożenie. Jedną z grup takich związków są chloropochodne związków aromatycznych. Swoje zainteresowanie w tej części badań skierowałam na chlorofenole [H5-7], atrazynę [H5] oraz heksachlorocykloheksany [H9]. Halogenopochodne fenoli stanowią istotną grupę zanieczyszczeń środowiskowych, których źródła leżą nie tylko w działalności człowieka (przemysł papierniczy), ale również w aktywności wulkanów, pożarach lasów i innych procesach geotermicznych [4] oraz w produkcji biologicznej (organizmy niższe takie jak glony, gąbki czy koralowce są głównymi dostarczycielami związków organochlorowych w przyrodzie). Organizmy żyjące w środowisku, gdzie oprócz zanieczyszczeń pochodzących z działalności człowieka szeroko rozpowszechnione są związki haloaromatyczne pochodzenia biologicznego musiały wytworzyć się odpowiednie mechanizmy obronne. Przykładem takiego organizmu jest *Amphitrite ornata* – wieloszczet zamieszkujący przybrzeżne osady morskie. Swoje środowisko dzieli głównie z innym wieloszczetem: *Notomastus lobatus* oraz półstrunowcem *Saccoglossus kowalewskyi*, które zanieczyszczają zamieszkiwane osady bromofenolami oraz bromopiolami [5-8] będącymi inhibitorami oddychania oraz funkcji mitochondrialnych. Toksyczność tych związków dla kręgowców została już dobrze udokumentowana. [9-12] Szczegółowa analiza tolerancji *Amphitrite ornata* na związki haloaromatyczne wykazała, że zamiast typowej dla takich organizmów oksydazy wytwarza on dwie niezwykle dehalogenujące peroksydazy (DHP). [13-14] Sam nie wytwarza halometabolitów i nie wykazuje aktywności halogenowej. Pokazano, że DHP analogicznie do peroksydaz katalizuje

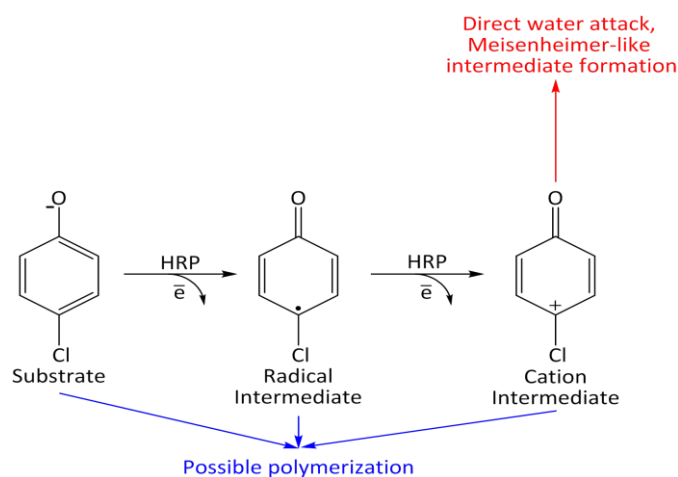
konwersje halogenopochodnych fenoli do chinonów w obecności nadtlenu wodoru jak pokazano na Rys. 2. Proces ten przebiega 10 razy szybciej niż dla wszystkich znanych halohydrolaz bakteryjnego pochodzenia, [14] co w dużej mierze tłumaczy zdolność przeżycia *A. ornata* w toksycznych warunkach. Jest jednym z nielicznych enzymów katalizujących rozpad wiązania C-F.



Rys. 2. Konwersja trichlorofenolu to chinonu katalizowana przez dehalogenazę z *Amphitrite ornata*.

Poznanie zatem szczegółów mechanizmu procesu dehalogenacji katalizowanego przez DHP wydało się naturalnym aby zrozumieć zjawisko podjęcia aktywności peroksydacyjnej przez globiny oraz ważnym przy projektowaniu zmian strukturalnych, które mogłyby prowadzić do zmiany funkcjonalności. W tym celu zmierzaliśmy oraz wymodelowaliśmy kinetyczne efekty izotopowe chloru reakcji dehalogenacji 4-chlorofenolu, 2,4,6-trichlorofenolu oraz 4-chloro-2,6-dimetylofenolu katalizowanej przez wspomnianą dehaloperoksydazę (DHP) oraz klasyczną peroksydazę chrzanową (HRP) [H6]. Wcześniejszą teoretyczną analizę dla reakcji modelowej bez obecności enzymów przeprowadziliśmy i porównaliśmy z innymi znanymi nam reakcjami usuwania podstawnika chlorowego ze związków aromatycznych [H5]. Otrzymane wyniki pozwoliły nam opracować roboczą hipotezę dotyczącą mechanizmu transformacji halogenopochodnych fenoli katalizowanych przez peroksydazy. Pokazaliśmy, iż w obu przypadkach głównym zadaniem enzymu posiadającego aktywność peroksydacyjną jest przekształcenie substratu w formę kationową, z której bardzo łatwo ulega eliminacji podstawnik chlorowy. Zarówno w przypadku DHP jak i HRP sama już reakcja dehalogenacji zachodzi niemalże poza centrum aktywnym enzymu, gdzie ma miejsce bezpośredni kontakt reagujących indywidualów z cząsteczkami rozpuszczalnika, co powoduje, że proces ten jest bardzo podobny do reakcji zachodzącej bez udziału enzymu w roztworze wodnym. Użyty przez nas schemat obliczeniowy QM/MM do modelowania powyższych reakcji pozwolił wskazać, że reakcja dehalogenacji w cyklach katalitycznych enzymów oksydacyjnych jest jedynie reakcją uboczną niewymagającą zbyt dużego nakładu energetycznego enzymu.

Kontynuując badania mające na celu lepsze poznanie mechanizmu działania tychże enzymów i ich potencjalnemu wykorzystaniu w projektowaniu nowych biokatalizatorów do usuwania takich zanieczyszczeń środowiskowych jakimi są chlorofenole swoją uwagę skierowałam na drugi kanał reakcyjny w cyklu katalitycznym oksydoreduktaz - dimeryzację. Fakt ten jest wykorzystywany szeroko przy syntezie nowych funkcjonalnych materiałów polimerowych dzięki reakcjom oksydacyjnego sprzężenia, które to również mogą prowadzić do eliminacji podstawników. [15] Ciekawym zatem wydało się nam czy tworzeniu dimerów czy wyższych oligomerów w reakcji utleniania chlorofenoli będzie towarzyszył proces dehalogenacji i jeśli tak to jaki będzie jego mechanizm. W tym celu zastosowaliśmy obliczenia kwantowomechaniczne na poziomie DFT wraz z ciągłym modelem rozpuszczalnika dla czterech różnych reakcji jakim mogą ulegać dysocjujące z centrum aktywnego rodnikowe produkty przejściowe tworzące się podczas cyklu katalitycznego peroksydaz (Rys. 3). [H7]



Rys. 3. Możliwe ścieżki reakcji w cyklu katalitycznym peroksydazy chrzanowej (HRP).

Na podstawie analizy powierzchni energii potencjalnej wymodelowanych reakcji sprzężenia (rodnik-rodnik w stanie trypletowym, rodnik-rodnik w stanie singletowym, rodnik-kation, rodnik-anion) najbardziej prawdopodobnymi scenariuszami mechanistycznymi okazały się być reakcje rodnik-rodnik w stanie singletowym oraz rodnik-kation. Jednakże biorąc pod uwagę możliwe stężenie poszczególnych indywiduów w trakcie reakcji ścieżka rodnik-anion nie powinna być z góry odrzucona, gdyż forma anionowa substratu jest tą, której należałoby spodziewać się najwięcej. Reakcja rodnik-anion okazała się być reakcją jednoetapową, w wyniku której podstawnik chlorowy jest usuwany, ale nie towarzyszy temu procesowi kinetyczny efekt izotopowy chloru. W odróżnieniu, energetycznie możliwa reakcja rodnik-

rodnik w stanie singletowym jest reakcją dwuetapową, której pierwszy etap polega na utworzeniu się dimeru, w którym następnie dochodzi do wewnątrzcząsteczkowego przeniesienia atomu chloru, czemu towarzyszy znaczny efekt izotopowy (Cl-KIE > 1.01), mimo, że w końcowym produkcie podstawnik ten nie zostaje wyeliminowany.

Zainicjowane z kolei badania dla innej grupy chloropochodnych aromatycznych - *s*-triazyn [H5] pokazały na przykładzie atrazyny (1-chloro-3-etyloamino-5-isopropylamino-2,4,6-triazyna), że reakcja dehalogenacji zachodzi według mechanizmu uzgodnionego i w środowisku wodnym, w warunkach neutralnych powinien jej towarzyszyć duży efekt izotopowy chloru (Cl-KIE ~ 1.007). Prace zarówno doświadczalne jak i teoretyczne zostały rozszerzone na inne związki z tej grupy: terbutylazynę (1-chloro-3-etylamino-5-terbutylamino-2,4,6-triazyna)- w dalszym ciągu wykorzystywaną jako pestycyd w Europie oraz ametryn (2-tiometylo-4-isopropylamino-6-etylamino-1,3,5-triazyna)). Badania te są przedmiotem pracy doktorskiej mgr inż. Anny Grzybkowskiej, której jestem opiekunką naukową, również w ramach realizowanego przez nią grantu NCN Preludium.

Kolejną grupą chlorowcopochodnych związków organicznych stanowiących dość uporczywy problem środowiskowy są heksachlorocykloheksany (HCH). Mimo, iż nasza uwaga jest głównie skupiona na roli dwóch dehalogenaz mających zdolność metabolizowania izomerów HCH - LinA i LinB oba układy przeanalizowaliśmy najpierw stosując uproszczone modele centrów aktywnych [H9]. Takie podejście pozwoliło nam lepiej zrozumieć reakcję chemiczną zachodzącą w centrach katalitycznych badanych enzymów, a także dokonać wyboru odpowiedniego poziomu obliczeń. Wymodelowanie reakcji dehydrohalogenacji izomerów α , β , δ oraz γ indukowaną cząsteczką wody (reakcja niekatalizowana) oraz cząsteczką imidazolu (model reakcji w centrum aktywnym LinA) pokazało, że eliminacja jednej pary H/Cl zachodzi według uzgodnionego mechanizmu E2, istnieją jednak znaczące różnice pomiędzy izomerami. W środowisku wodnym struktura stanu przejściowego dla izomerów α , δ i γ przypomina mechanizm E1 zaś w obecności imidazolu mechanizm jest bliższy E1cb. Struktura stanu przejściowego dla β -HCH jest inna niż struktura stanów przejściowych zlokalizowanych dla pozostałych izomerów. W przypadku reakcji z imidazolem wyraźnemu rozluźnieniu w stanie przejściowym ulegają dwa wiązania węgiel-chlor. Eliminacja pary H/Cl w przypadku izomeru β -HCH zachodzi zawsze według mechanizmu *syn*, zaś w przypadku pozostałych izomerów jest to *anti*. Kompleksy ligand-receptor uzyskane w wyniku dokowania izomerów do centrum aktywnego LinA oraz

wymodelowane powierzchnie energii potencjalnej przy użyciu minimalnych modeli centrum aktywnego (reakcja dehydrohalogenacji w obecności diady katalitycznej czyli pary His73-Asp25) pozwoliły określić warunki mogące wpływać na efektywność procesu eliminacji podstawników chlorowych w heksachlorocykloheksanach. Przewidziane kinetyczne efekty izotopowe chloru, węgla oraz wodoru okazały się być dodatkowym, przydatnym narzędziem umacniającym wnioski płynące z analizy struktur stanów przejściowych oraz dokowania. Spośród czterech analizowanych izomerów HCH β -HCH jest najmniej podatny na reakcję katalizowaną przez LinA, co pozostaje w zgodzie z obserwacjami z badań kinetycznych [16], co wynika z konformacji tego izomeru oraz jego położenia w centrum aktywnym LinA. β -HCH natomiast jest chętniej metabolizowany przez drugą dehalogenazę z rodziny Lin - LinB. Reakcja ta przebiega według mechanizmu S_N2 przy udziale Asp125 jako nukleofila. Wymodelowana (manuskrypt w przygotowaniu) przez nas reakcja dehalogenacji zarówno przy użyciu klastrowych modeli centrum aktywnego jak i całego modelu enzymu z powodzeniem wpasowuje się w istniejącą już bibliotekę podobnych przemian katalizowanych przez inne dehalogenazy hydrolityczne. [2, 17-18] Dla modelu enzymatycznego uzyskaliśmy barierę energetyczną 14.3 ± 2.2 kcal/mol, która pozostaje w zgodzie ze wstępną wartością doświadczalną oszacowaną na podstawie stałej szybkości reakcji k_{cat} ($\Delta G^\ddagger = 17.1$ kcal/mol) oraz kinetyczny efekt izotopowy chloru 1.0067 ± 0.0009 .

W ramach współpracy nawiązanej z naukowcami z Geological Survey of Israel podjęliśmy również próbę opisu wybranych reakcji, w których udział biorą bromowe pochodne związków organicznych. W badaniach modelowych zajęliśmy się kinetycznymi efektami izotopowymi węgla i bromu towarzyszącymi tworzeniu się czynnika Grignarda [**H8**]. Pokazaliśmy przydatność nowo opracowanej metodyki pomiarowej opartej na analizie środowiskowej CSIA oraz frakcjonowaniu bromu do badania przemian jakim ulegają zanieczyszczenia zawierające brom w swojej strukturze. Zmierzony oraz potwierdzony teoretycznie Br-KIE jest jednym z największych efektów dla tego pierwiastka wspomnianych do tej pory w literaturze (1.0028).

Podsumowanie i dalsze perspektywy

Badania wykorzystania enzymów do detoksyfikacji zanieczyszczonego środowiska cieszą się rosnącym zainteresowaniem. Jedną z grup enzymów, które mogą odegrać istotną rolę w procesie bioregeneracji są enzymy dehalogenujące. Niestety niewiele doniesień pojawiło się do tej pory szczegółowo wyjaśniających mechanizmy reakcji przez nie katalizowanych. Z

tego też względu przedstawiony zbiór wyników stanowi istotny wkład do istniejącej na ten temat wiedzy oraz znacząco poszerza bibliotekę opisanych już mechanizmów, jakie Natura wykorzystuje celem obrony przed szkodliwymi związkami. Taka wiedza z kolei może pozwolić na racjonalną modyfikację lub syntezę efektorów do wykorzystania tych enzymów do bioregeneracji środowiska naturalnego zanieczyszczonego związkami halogenopochodnymi.

Wykorzystanie kinetycznych efektów izotopowych chloru oraz metod modelowania molekularnego – metodyki przetestowanej i wielokrotnie zastosowanej z powodzeniem przez naszą grupę badawczą do badania mechanizmów reakcji katalizowanych enzymatycznie pozwala nam na dokładne poznanie reakcji chemicznych zachodzących w centrum aktywnym enzymów dehalogenujących oraz czynników wpływających na jej przebieg. Należy jednak pamiętać, że metody teoretyczne wykorzystywane do przewidywania efektów izotopowych i opisywania struktury stanu przejściowego reakcji wymagają wciąż udoskonalenia gdyż istnieją układy, dla których zmierzony KIE nie może być wyjaśniony na podstawie wymodelowanej pojedynczej konfiguracji stanu przejściowego [19]. Zatem wybór metody, która pozwoli w odpowiedni sposób opisać dynamikę układu ma również ogromne znaczenie. Planujemy zatem przetestować dostępne metody obliczeń kwantowomechanicznych wraz ze zmodyfikowaną wersjami dostępnych podejść celem uzyskania poprawnego opisu reakcji chemicznych w roztworze, dla których podejście konwencjonalne okazało się być niewystarczające.

Literatura cytowana z wykluczeniem prac wylistowanych jako dotychczasowy dorobek habilitantki:

- [1] Haggblom and Bossert (Eds), DEHALOGENATION. Microbial processes and environmental application, 2003
- [2] P. Paneth, Chlorine Isotope Effects in Biological Systems, in: A. Kohen, H.H. Limbach (Eds.), Isotope Effects in Chemistry and Biology, CRC Press, 2006
- [3] K.C. Westaway, Can. J. Chem. 56 (1978) 2691
- [4] G.W. Gribble, Chemosphere 52 (2003) 289
- [5] S.A. Woodin, M.D. Walla, and D.E. Lincoln, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 107 (1987) 209
- [6] Y.P. Chen, D.E. Lincoln, S.A. Woodin, and C.R. Lovell, J. Biol.Chem. 266 (1991) 23909
- [7] C.C. Steward, J. Pinckney, Y. Piceno, and C.R. Lovell, Mar. Ecol. Prog. Ser. 90 (1992) 61

- [8] K.T. Fielman, and N.M. Targett, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 116 (1995) 125
- [9] E. Casillas, and M.S. Myers, *Comp. Biochem. Physiol.* 93C (1989) 43
- [10] B.D. Kerger, S.M. Roberts, and R.C. James, *Drug Metab. Dispos.* 16 (1988) 672
- [11] D.C Malins, et al. *Environ. Health Perspect.* 71 (1987) 5
- [12] R.G. Schnellmann, and L.J. Mandel, L. J. in *Biological Reactive Intermediates III* (Kocsis, J. J., Jollow, D. J., Witmer, C. M., Nelson, J. O., and Snyder, R., eds) pp. 911–917, Plenum Press, New York, 1986
- [13] Y.P. Chen, D.E. Lincoln, S.A. Woodin, and C.R. Lovell, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 23909
- [14] Y.P. Chen, S.A. Woodin, D.E. Lincoln, and C.R. Lovell, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 4609
- [15] H. Ritter, et al., Synthesis of Phenol Polymers Using Peroxidases, In: Kobayashi, S., Ritter, H., Kaplan, D, (Eds.), *Advances in Polymer Science Vol. 194: Enzyme-Catalyzed Synthesis of Polymers*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1–49, 2006
- [16] D. R. B. Brittain, R. Pandey, K. Kumari, P. Sharma, G. Pandey, R. Lal, M. L. Coote, J. G. Oakeshott, C. J. Jackson, *Chem. Commun.* 47 (2011) 976
- [17] P. Paneth, *Acc. Chem. Res.* 36 (2) (2003) 120–126
- [18] S. Marti, V. Moliner and I. Tunon, *J. Chem. Theory Comput.*, 1 (2005) 1008
- [19] J.J. Ruiz Pernia and I.H. Williams, *Chem Eur. J.* 18 (2012) 9405 oraz prace tam cytowane

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych.

5.1. Spis publikacji niewchodzących w zakres tematyki habilitacyjnej

Przed uzyskaniem stopnia doktora:

Dwie pierwsze prace stanowią część mojej pracy doktorskiej. Pierwsza [A1] z nich przedstawia modele centrum aktywnego mutazy metylomalonylo-CoA i proponuje

mechanizm reakcji katalizowanej przez ten enzym. To pierwsze teoretyczne podejście do homolizy wiązania Co-C oraz towarzyszącego jej przeniesienia atomu wodoru. W zależności od rozważanego mechanizmu (uzgodniony lub etapowy) różnego rozmiaru modele centrum aktywnego zostały przygotowane. Dla każdego z nich kinetyczny efekt izotopowy wodoru został teoretycznie oszacowany zarówno w podejściu quasiklasycznym jak i uwzględniającym poprawkę na efekt tunelowy i porównany z wartościami otrzymanymi doświadczalnie. Druga praca [A2] to z kolei test wybranych metod półempirycznych do opisu układów zawierających jon metalu przejściowego. Wyniki przy ich użyciu obliczeń zostały porównane do tych otrzymanych na poziomie DFT.

Trzecia praca [A3] stanowi początek zainteresowania tematyką kinetycznych efektów izotopowych atomów ciężkich, w szczególności chloru oraz relacji pomiędzy strukturą stanu przejściowego a wielkością efektu izotopowego. Zaplanowana i przeprowadzona obliczenia wszelkich możliwych efektów izotopowych w badanym układzie na 39 poziomach obliczeń i porównano je z wartościami zmierzonymi. W tym teście najlepiej wypadły metody DFT.

[A1] A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, *Theoretical Evaluation of the Hydrogen Kinetic Isotope Effect on the First Step of Methylmalonyl-CoA Mutase*, J. Inorg. Biochem. 86 (2001) 681, **IF₂₀₀₁=1.729**, wkład własny: 50%

Mój udział polegał na przygotowaniu odpowiednich modeli, wykonaniu wszystkich obliczeń. Uzyskane wyniki zostały następnie przeze mnie zanalizowane i zinterpretowane. Przygotowałam pierwszą wersję manuskryptu.

[A2] V. Anisimov, E. Bartnicka, A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, *A Theoretical Study on (η^5 -C₅H₅)Fe(CO)(PPh₃)(C(O)CHMe) Anion Structure and Stereoselectivity*, Pol. J. Chem. 76 (2002) 737, no IF, wkład własny: 20%

Mój wkład polegał na wykonaniu części obliczeń oraz udziale w analizie i interpretacji wyników. Uczestniczyłam w przygotowaniu wszystkich wersji manuskryptu.

[A3] Y. Fang, Y. Gao, P. Ryberg, J. Eriksson, M. Kolodziejska-Huben, A. Dybala-Defratyka, S. Madhavan, R. Danielsson, P. Paneth, O. Matsson, K.C. Westaway, *Experimental and Theoretical Multiple Kinetic Isotope Effects for an S_N2 Reaction. An Attempt to Determine Transition State Structure and the Ability of Theoretical Methods to Predict Experimental Kinetic Isotope Effects*, Chem. Eur. J. 9 (2003) 2696, **IF₂₀₀₃=4.353**, wkład własny=10%

Mój wkład polegał na wykonaniu części obliczeń oraz udziale w analizie i interpretacji wyników. Uczestniczyłam w przygotowaniu części pierwszej wersji manuskryptu.

Po uzyskaniu stopnia doktora (artykuły niewchodzące do monotematycznego cyklu habilitacyjnego):

Po uzyskaniu stopnia doktora przez kilka kolejnych lat kontynuowałam jeszcze pracę nad reakcjami przeniesienia atomu wodoru i układem enzymatycznym, którym zajmowałam się w swojej pracy doktorskiej. Publikacje B1-B7 są efektem tych wysiłków. Poprawienie metodologii obliczeniowej pozwoliło na udoskonalenie obliczeń i powtórzenie ich przy użyciu zmodyfikowanego kodu. We współpracy z prof. Rumą Banerjee z University of Nebraska-Lincoln oraz prof. Donaldem G. Truhlarzem z University of Minnesota udało nam się przeanalizować dokładnie mechanizm reakcji przeniesienia atomu wodoru katalizowany przez mutazę metylomalonylo-CoA używając do tego celu symulacji w schemacie QM/MM oraz wariacyjnej teorii stanu przejściowego. Dzięki takiemu podejściu zaproponowaliśmy, że tunelowanie zarówno wodoru jak i deuteru jest silnie sprzężone z ruchem innych atomów w centrum aktywnym enzymu oraz oszacowaliśmy, że jedynie 1% reakcji zachodzi klasycznie z przejściem przez barierę. Dodatkowo zidentyfikowaliśmy tzw. krytyczne konfiguracje tunelowania.

Pozycja B8 to praca redaktorska będąca odpowiedzią na zaproszenie prof. Jerzego Leszczyńskiego redaktora całej serii (*Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics*, Springer). Przybliżyła ona współczesne zagadnienia modelowania procesów w skali odpowiadającej bio- i nano- w różnych aspektach badań chemicznych i biochemicznych. Została uznana przed redaktora serii za najlepszą z dotychczasowych pozycji w tej serii.

Modelowanie reakcji środowiskowych

Zainteresowanie przemianami środowiskowymi wiąże się z nawiązaniem kontaktów ze środowiskiem badaczy zajmujących się tym problemami i wykorzystującymi do tego celu analizę izotopową jednak w podejściu doświadczalnym, co zaowocowało obecnością grupy badawczej, której jestem członkiem w międzynarodowych konsorcjach badawczych oraz częścią prac zaliczonych w poczet dorobku do habilitacji oraz także pracy [B10], w której to przetestowaliśmy szereg poziomów teoretycznych celem wyboru najlepszego do opisu

utleniania związków stanowiących zanieczyszczenia środowiskowe na przykładzie reakcji trichloroetenu z nadmanganianem potasu.

Rozmiar układów środowiskowych, w tym również biologicznych wpływa znacznie na nasze możliwości teoretycznego przewidywania efektów, gdyż nie jesteśmy w stanie wyznaczać częstości dla wszystkich atomów w takim układzie i często korzystamy z dostępnych uproszczonych podejść. Praca [B9] przedstawia próbę zaproponowania nowego schematu obliczeniowego dla efektu izotopowego.

Kolejny kierunek badań, w który zaangażowałam się w ostatnim okresie to utlenianie kwasów boronowych. W pracy [B11] zajęliśmy się ścieżką rodnikową reakcji boronianu z ONOO^- . Wolnorodnikowe produkty przejściowe scharakteryzowane zostały przy użyciu spektroskopii EPR oraz techniki spin-trapping. Na podstawie tej charakterystyki zaproponowano mechanizm reakcji, według którego tworzą się fenol i azotyn jako główne produkty lub para rodników $\text{PhB(OH)}_2\text{O}^{\bullet-} \dots \text{NO}_2$ jako poboczne produkty. Powstawanie rodników fenolowych może być wyjaśnione fragmentacją anionorodnika $\text{PhB(OH)}_2\text{O}^{\bullet-}$. Obliczenia DFT pokazały, że bariera energetyczna dysocjacji tego anionorodnika prowadzącej do utworzenia rodnika fenyłowego wynosi tylko kilka kcal/mol co potwierdzałoby szybką i spontaniczną fragmentację $\text{PhB(OH)}_2\text{O}^{\bullet-}$ w wodnych roztworach. Z kolei w pracy [B12] przetestowano izomeryczne rodnikoaniony $\text{MitoPhB(OH)}_2\text{O}^{\bullet-}$. Dzięki obliczeniom na poziomie DFT pokazano, że stan przejściowy dla formy orto charakteryzuje się najkrótszym wiązaniem C-B oraz równomiernie rozłożoną gęstością spinową na atomie węgla, od którego odchodzi grupa $(\text{OH})_2\text{O}^{\bullet-}$ oraz zdeprotonowanym atomie tlenu tejże grupy. Natomiast w przypadku pozostałych dwóch izomerów zaobserwowano jedynie nieznaczną zmianę gęstości spinowej w porównaniu z odpowiednimi rodnikoanionami, gdzie większość charakteru rodnikowego zgromadzona jest na atomie $\text{O}^{\bullet-}$.

[B1] R.A. Kwiecien, M. Rostkowski, A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, *Validation of semiempirical methods for modeling of corrinoid systems*, J. Inorg. Biochem. 98 (2004) 1078, **IF₂₀₀₄=2.225**, wkład własny=25%

Mój wkład polegał na analizie i interpretacji wyników oraz na udziale w przygotowywaniu wszystkich kolejnych wersji manuskryptu.

[B2] A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, J. Pu, D.G. Truhlar, *Benchmark Results for Hydrogen Atom Transfer Between Carbon Centers and Validation of Electronic Structure Methods for Bond Energies and Barrier Heights*, J. Phys. Chem. A 108 (2004) 2475, **IF₂₀₀₄=2.639**, wkład własny=60%

Mój wkład polegał na wykonaniu większości obliczeń, udziale w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu wszystkich wersji manuskryptu. Jestem również jednym z autorów korespondencyjnych tej pracy.

[B3] R. Banerjee, A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, *Quantum catalysis in B12-dependent methylmalonyl-CoA mutase: experimental and computational insights*, *Philos. Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 361 (2006) 1333, **IF₂₀₀₆=4.579**, wkład własny=50%

Mój wkład polegał na wykonaniu większości obliczeń, udziale w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu wszystkich wersji manuskryptu.

[B4] A. Dybala-Defratyka, R.A. Kwiecien, D. Sicinska, P. Paneth, *Intrinsic Isotope Effects – the Holy Graal of Studies of Enzyme-Catalyzed Reactions* in *Modelling Molecular Structure and Reactivity in Biological Systems*, J. Brady, J. Gao K. J. Naidoo, M. Hann, M. Field, (Eds) Royal Society of Chemistry (UK) Special Publication S. No. 303, 2006, 163-173, wkład własny=30%

Wykonałam wszystkie obliczenia dla reakcji przeniesienia atomu wodoru katalizowanej przez mutazę metylomalonylo-CoA, których wyniki prezentowane są w tej pracy. Przygotowałam część manuskryptu poświęconej temu układowi oraz brałam udział w złożeniu całego manuskryptu i edycji jego kolejnych wersji.

[B5] R. Banerjee, D.G. Truhlar, A. Dybala-Defratyka, and P. Paneth, *Hydrogen Atom Transfers in B12 Enzymes* in *Hydrogen-Transfer Reactions*. Edited by R. L. Schowen, J. P. Klinman, J. T. Hynes, and H.-H. Limbach Copyright © 2007 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, wkład własny=25%

W rozdziale tym mój udział polegał na zebraniu wyników dotyczących modelowania enzymów zależnych od B12, przygotowaniu podrozdziału poświęconego tym zagadnieniom, przygotowaniu wszystkich schematów i tabel oraz uczestniczeniu w edycji wszystkich wersji manuskryptu.

[B6] A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, R. Banerjee, D.G. Truhlar, *Coupling of Hydrogenic Tunneling to Active-Site Motion in the Hydrogen Radical Transfer Catalyzed by a Coenzyme B12-Dependent Mutase*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 104 (2007) 10774, **IF₂₀₀₇=9.598**, wkład własny=50%

Mój wkład polegał na zaplanowaniu i wykonaniu wszystkich obliczeń, udziale w analizie i interpretacji wyników oraz przygotowaniu pierwszej wersji manuskryptu. Jestem również jednym z dwóch autorów korespondencyjnych tej pracy.

[B7] A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, D.G. Truhlar, Quantum Catalysis in Enzymes in *Quantum Tunneling in Enzyme Catalyzed Reactions*, edited by N. Scrutton and R. Allemann (RSC Publishing, Cambridge, UK) 2009, wkład własny=40%

W tym rozdziale mój wkład polegał na przygotowaniu podrozdziału numer 3.3 zawierającego przykłady układów enzymatycznych. Uczestniczyłam również w złożeniu całego rozdziału oraz we wszystkich jego edycjach.

[B8] P. Paneth, A. Dybala-Defratyka (Eds), *Kinetics and Dynamics, From Nano- to Bio-Scale*, Vol. 12 in Challenges and Advances in Computational Chemistry and Physics (series editor: J. Leszczynski), Springer, 2010, wkład własny=50%

W tym woluminie moja praca jako jego współredaktora polegała na współudziale w komponowaniu jego zawartości, zebraniu poszczególnych rozdziałów od ich autorów, udziale w ułożeniu ich w odpowiedniej kolejności, przygotowaniu słowa wstępnego oraz udziale w proofreadingu wersji przygotowanej do druku.

[B9] K. Swiderek, A. Dybala-Defratyka, D.R. Rohr, *A New Scheme to Calculate Isotope Effects*, J. Mol. Model., 17 (2011) 2175, DOI: 10.1007/s00894-010-0868-4, **IF₂₀₁₁=1.797**, wkład własny=25%

Mój wkład polegał na współudziale w analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu części wstępnej do manuskryptu oraz edycji wszystkich jego wersji.

[B10] P. Adamczyk, A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, *DFT Study of Trichloroethene Reaction with Permanganate in Aqueous Solution*, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3006, DOI: 10.1021/es103251u, **IF₂₀₁₁=5.228**, wkład własny=30%

Mój wkład polegał na koncepcji badań, analizie wyników oraz współudziale w edycji poszczególnych wersji manuskryptu.

[B11] A. Sikora, J. Zielonka, M. Lopez, A. Dybala-Defratyka, J. Joseph, A. Marcinek, and B. Kalyanaraman, *Reaction between Peroxynitrite and Boronates: EPR Spin-Trapping, HPLC Analyses, and Quantum Mechanical Study of the Free Radical Pathway*, Chem. Res. Toxicol. (2011), DOI: 10.1021/tx100439a, **IF₂₀₁₁=3.779**, wkład własny=10%

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części obliczeniowej pracy, analizie otrzymanych wyników oraz opisanu ich we wszystkich wersjach manuskryptu.

[B12] A. Sikora, J. Zielonka, J. Adamus, D. Dębski, A. Dybala-Defratyka, B. Michalowski, J. Joseph, R. C. Hartley, M. P. Murphy, and B. Kalyanaraman, *Reaction between peroxynitrite and triphenylphosphonium-substituted arylboronic acid isomers – Identification of diagnostic marker products and biological implications*, Chem. Res. Toxicol., 26 (2013) 856, **IF₂₀₁₃=3.667**, wkład własny=10%

Mój udział polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części obliczeniowej pracy, analizie otrzymanych wyników oraz opisanu ich we wszystkich wersjach manuskryptu.

5.2. Najbliższe plany badawcze

Spośród swoich najbliższych planów naukowych mogłabym wskazać trzy główne projekty:

(i) transformacja izomerów heksachlorocykloheksanów katalizowane przez dwie dehalogenazy LinA i LinB

W ramach realizacji projektu CSI-Environment opisaliśmy do tej pory reakcję eliminacji pary H/Cl z α , β , γ , i δ -HCH przy użyciu małego, klastrowego modelu centrum aktywnego LinA zawierającego cząsteczkę substratu oraz parę katalitycznych aminokwasów: His73-Asp25. Uzyskane wyniki na poziomie DFT porównaliśmy z odpowiednimi reakcjami wymodelowanymi w środowisku wodnym. Przewidzieliśmy kinetyczne efekty izotopowe węgla, chloru oraz wodoru [H9].

Celem scharakteryzowania wpływu enzymu na badane przemiany przygotowane zostały modele zawierające całe łańcuchy białkowe odpowiednich enzymów. Następnie podzieliliśmy je na część QM (wcześniejszy model klastrowy) oraz MM. Podjęto pierwszą próbę wymodelowania energii swobodnej aktywacji w obecności całego enzymu stosując metodologię QM/MM/MD. Z racji, że część QM mogła być potraktowana co najwyżej metodami półempirycznymi otrzymane potencjały reakcji wymagają poprawy przy użyciu wyższego poziomu teorii. Te prace są w toku.

Ponadto, w planach jest również przetestowanie różnych podejść do teoretycznego wyznaczenia efektów izotopowych w oparciu o zespół wygenerowanych par struktur substraty-stan przejściowych.

(ii) hydroliza s-triazyn katalizowana przez chlorohydrolazy TrzN i AtzA

To kolejny projekt, którego jednym z głównych celów jest opisanie reakcji detoksyfikacji szkodliwych s-triazyn katalizowanych przez dwie chlorohydrolazy TrzN i AtzA. Najpopularniejszym przedstawicielem tej klasy związków jest atrazyna (2-chloro-4-(N-etyloamino)-6-(N-isopropylamino)-1,3,5-s-triazyna), która ze względu na swoją toksyczność i rosnącą obecność w wodach powierzchniowych i gruntowych została zakazana ponad 10 lat temu w Europie. Wciąż jest jednak stosowana w Stanach Zjednoczonych oraz Australii jako związek kontrolujący rozrost chwastów w uprawach zbóż. W Polsce środki chwastobójcze zawierające atrazynę jako substancję aktywną były głównie stosowane w uprawie kukurydzy i zostały wycofane z rynku ochrony roślin w 2007 roku. Obecnie zamiast atrazyny stosuje się jeszcze mało poznana terbutylazynę (2-chloro-4-(N-etyloamini)-6-(N-t-butylamino)-1,3,5-s-triazyna). AtzA katalizuje jedynie reakcje dehalogenacji, podczas gdy TrzN wykazuje szersze zastosowanie. W wyniku aktywności tych enzymów powstaje nietoksyczna hydroksyatrasyzna. Dokładne opisanie mechanizmu hydrolizy katalizowanej przez te enzymy oraz ich mutanty (E241 i T325 w TrzN) może pomóc wyjaśnić ewolucyjne przemiany oraz wskazać kierunek, w którym należy podążać aby opracować efektywną metodę do walki z triazynewymi herbicydami.

Pomimo, że pewne podstawowe fakty dotyczące obu enzymów i katalizowanych przez nie reakcji zostały już ustalone okazały się one jednak niewystarczające. Natomiast dostępne wyniki pierwszych prób opisanie mechanizmu reakcji katalizowanych przez chlorohydrolazy pochodzące z różnych laboratoriów wzajemnie się wykluczają co czyni potrzebę wyjaśnienia

obserwowanych zjawisk jeszcze bardziej konieczną. Zapronowałyśmy efekty izotopowe chloru jako narzędzie badawcze w ramach grantu finansowanego przez NCN (Preludium: mgr inż. Anna Grzybewska, której pracy doktorskiej jestem opiekunką naukową). Proponowane badania nad hydrolizą terbutyloazyny i atrazyny, katalizowaną przez enzymy TrzN i AtzA oraz ich mutanty przy użyciu kinetycznych efektów izotopowych chloru wyznaczonych zarówno doświadczalnie jak i na drodze modelowania molekularnego mogą prowadzić do istotnego wkładu w stan wiedzy na temat mechanizmów dehalogenacji zachodzących w środowisku na poziomie podstawowym i teoretycznym, który pomoże opisać złożone układy biologiczne z jednej strony zaś z drugiej dostarczy nowych danych niezbędnych do racjonalnej bioinżynierii enzymów w przyszłości. Ponadto ze względu na fakt, że reakcja dehalogenacji katalizowana przez TrzN i AtzA wydaje się być wynikiem losowych procesów ewolucyjnych, taki szczegółowy opis przemian zachodzących w zanieczyszczonym środowisku podczas biodegradacji herbicydów jest konieczny celem zrozumienia odpowiedzi Natury na działalność człowieka i w oparciu o istniejącą wiedzę przewidzenia nowych procesów adaptacyjnych zachodzących w żywych organizmach.

(iii) poprawienie metod teoretycznych do przewidywania stałych szybkości reakcji w fazie skondensowanej (np. w roztworach homogenicznych)

To projekt mający na celu ulepszenie odtwarzania oraz wyjaśniania kinetycznych efektów izotopowych, które jako narzędzie mechanistyczne powinno zostać poddane testowi celem weryfikacji jego stosowania zarówno w chemii jak i biochemii. Pomimo że, obliczenia struktury elektronowej jak i różne sposoby opisywania reakcji chemicznej wiele razy już udowodniły swoją przydatność do interpretacji efektów izotopowych to bardzo często są oparte na przybliżeniach uniemożliwiających poprawny opis układów mogących przyjmować różne konformacje zarówno dla substratów jak i stanów przejściowych. Badanie te mają w swoim założeniu połączenie wysiłków doświadczalnych z teoretycznymi dla dokładnie tych samych układów chemicznych; połączenie precyzyjnej analizy trwałych izotopów atomów ciężkich (węgla i bromu) z obliczeniami kwantowomechanicznymi wraz z użyciem różnych metod opisujących dynamikę reakcji tak aby poprawnie opisać i zinterpretować wyniki pochodzące z eksperymentu okazuje się być konieczne jeśli interesuje nas rozwiązanie mechanizmu danej reakcji. Badania zostały już zapoczątkowane w ramach współpracy z dr Fainą Gelman z Geological Survey of Israel.

5.3. Udział w projektach badawczych

- NCN Preludium (2011-2014), *Mechanizm enzymatycznej hydrolizy s-triazyn*, DEC-2011/01/N/ST4/02461 (mgr inż. Anna Grzybkowska), wsparcie naukowe, pomoc merytoryczna
- FP7 CSI-ITN (2010-2014), PhD programme 10, *Theoretical modeling of environmentally important biotic and abiotic dehalogenation processes. In particular modelling of dehalogenations catalyzed by LinA*, odpowiedzialność merytoryczna za projekt oraz promotorka pomocniczna doktoratu Rabindry Nath Manny
- FP7 THEME 6 Environment, isoSoil (2009-2012), <http://isosoil.eu/>, *Contaminant-specific isotope analyses as sharp environmental-forensics tools for site characterization, monitoring and source apportionment of pollutants in soil*, wykonawczynie projektu
- Komitet Badań Naukowych, 3 T09B 007 29 (2005-9), *Study on enzymatic degradation of halogenated phenols with the use of chlorine isotope effects and molecular modeling*, kierowniczką grantu
- Komitet Badań Naukowych, 3 T09A 030 25 (2003-6), *Study on enzymatic dehalogenation with the use of chlorine isotope effects*, wykonawczynie projektu
- Komitet Badań Naukowych, 3 T09A 070 19 (2000-2), *Hydrogen isotope effects on reaction catalyzed by methylmalonyl-CoA mutase*, główna wykonawczynie projektu

5.4. Staże naukowe

- 2011-2012** University of Minnesota, Department of Chemistry, Minneapolis, MN, USA (Fulbright Senior Advanced Research Grant), opiekun: prof. Christopher J. Cramer
- 2002** University of Minnesota, Department of Chemistry, Minneapolis, MN, USA (visiting collaborator), opiekun: prof. Donald G. Truhlar
- 2000** Universitat Jaume I, Castellon, Spain (short-term training), opiekun: prof. Vicente Moliner
- 1998-1999** University of Nebraska-Lincoln, Department of Biochemistry, Lincoln, NE, USA (visiting research associate), opiekun: prof. Ruma Banerjee

5.5. Uzyskane stypendia

- 2011-2012** Fulbright Senior Advanced Research Grant, Polsko-Amerykańska Komisja Fulbrighta
- 2003** stypendium konferencyjne Fundacji na rzecz Nauki Polskiej

5.6. Współpraca międzynarodowa

- Prof. Christopher J. Cramer, University of Minnesota, USA, model reakcji chlorowania wody (projekt ze stypendium Fulbright'a)
- Prof. Lawrence Wackett, University of Minnesota, USA, enzymatyczna degradacja s-triazyn
- Dr. Martin Elsner, Helmholtz Zentrum München - National Research Center for Environmental Health, Niemcy: oksydacyjna dealkilacja oraz hydrolityczna dehalogenacja s-triazin
- Dr. Faina Gelman, Geological Survey of Israel, Izrael, efekty izotopowe bromu
- Prof. D.G. Truhlar, University of Minnesota, USA, reakcja przeniesienia atomu wodoru katalizowana przez mutazę metylomalonylo-CoA
- Prof. Ruma Banerjee, (poprzednio University of Nebraska-Lincoln, teraz University of Michigan, USA) - reakcja przeniesienia atomu wodoru katalizowana przez mutazę metylomalonylo-CoA

5.7. Najważniejsze nagrody i wyróżnienia wynikające z prowadzenia badań naukowych

- 2010** Wsparcie z EEF/FSU Fund na poczet uczestnictwa w 2010 Gordon Research Conference on Isotopes in the Chemical and Biological Sciences
- 2009** Nagroda Zespołowa Ministra Zdrowia
- 2008** Nagroda zespołowa JM Rektora Politechniki
- 2007** Nagroda zespołowa JM Rektora Politechniki

2004 The Carl Storm Fellowship, Gordon Research Conferences Board of Trustees,
Ventura, CA, USA

5.8. Udział w konferencjach i komitetach organizacyjnych konferencji

Konferencje (w zestawieniu wymienione są jedynie te, w których uczestniczyłam i prezentowałam wyniki badań):

1. *Bromine and Carbon Kinetic Isotope Effects on dehydrobromination of 2-bromoethylbenzene. Two different solvents - two different mechanistic scenarios?* - Faina Gelman, Agnieszka Dybala-Defratyka, Gordon Research Conference on Isotopes in the Chemical and Biological Sciences, Galveston, TX, USA, February 2012 - POSTER
2. *Reductive dechlorination of tetrachloroethylene in the presence of cobalt complexes: A revisited computational study* - A. Dybala-Defratyka, 242nd ACS National Meeting&Exposition, Aug28-Sep1, 2011, Denver CO, USA - zaproszony wykład
3. *Molecular mechanism of action of two distinct peroxidases: horseradish peroxidase and dehaloperoxidase on halogenated phenols* - Lukasz Szatkowski, Matthew K. Thompson, Rafal Kaminski, Stefan Franzen, Agnieszka Dybala-Defratyka, Isotopes 2011, Gréoux-les-Bains, Provence-Alpes-Côte d'Azur, France, June 2011 - wybrana prezentacja ustna
4. *A word from a computational chemist* – A. Dybala-Defratyka, Isotopes in Groundwater Management – Advances in Science and Implementation, Munich, Germany, October 2010 – zaproszony wykład
5. *Attempts to create a theoretical framework for predictions of isotope fractionation* – A. Dybala-Defratyka, Piotr Paneth, Gordon Research Conference on Isotopes in the Chemical and Biological Sciences, Galveston, TX, USA, February 2010 - POSTER
6. *Selected examples of QM/MM calculations for enzymatic systems* – A. Dybala-Defratyka, 52 Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Łódź, September 2009 – zaproszony wykład
7. *Isotope effects of reactions catalyzed by peroxidases* – A. Dybala-Defratyka, Isotopes 2009, Cluj-Napoca, Romania, May 2009 - POSTER

8. *Modeling dehalogenation step catalyzed by peroxidases* – A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, P. Paneth, World Associated Theoretically Oriented Chemists 2008 Conference, Sydney, Australia, September 2008 - POSTER
9. *To tunnel or not to tunnel? Methylmalonyl-CoA mutase story, part II* - A. Dybala-Defratyka, Modelling and Design of Molecular Materials, Piechowice, Poland, June 2008 - POSTER
10. *Early attempts to the elucidation of the mechanism of reaction catalyzed by dehaloperoxidase from A. ornate* – A. Dybala-Defratyka, Isotopes 2007, Benicassim, Spain, May-June 2007 - POSTER
11. *Calculations of Kinetic Isotope Effects on Chemical Reactions* - A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, P. Paneth, O. Mattson, K. Westaway, World Associated Theoretically Oriented Chemists 2005 Conference, Cape Town, South Africa, January 2005 - POSTER
12. *Should Leaving-Group Kinetic Isotope Effects be Re-interpreted? A Theoretical Approach* - P. Paneth, A. Dybala-Defratyka, M. Rostkowski, O. Mattson, K. Westaway - Gordon Research Conference “Frontiers of Science”, “Isotopes in Biological & Chemical Sciences”, Ventura, CA, USA, February 2004 - POSTER
13. *Modeling of pre-steady-state steps in methylmalonyl-CoA mutase II. Hydrogen atom transfer* - A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, D. G. Truhlar - Gordon Research Conference “Frontiers of Science”, “Isotopes in Biological & Chemical Sciences”, Ventura, CA, USA, February 2004 - POSTER
14. *High end calculations of tunneling isotope effect on hydrogen atom transfer* - A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, J. Pu, D.G. Truhlar, The International Isotope Effects Conference, Uppsala, Sweden, June 2003 - POSTER
15. *Modeling of reaction catalyzed by methyl-malonyl-CoA mutase* - A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, J. Gao, D.G. Trular, The International Isotope Effects Conference, Uppsala, Sweden, June 2003 - POSTER
16. *Modeling of Methylmalonyl-CoA Mutase; Implications for Isotope Effects* - A. Dybala-Defratyka, P. Paneth, Gordon Research Conference “Frontiers of Science”, “Isotopes in Biological & Chemical Sciences”, Ventura, CA, USA, February 2002 - POSTER

17. *Theoretical Evaluation of the Hydrogen Kinetic Isotope Effect on the First Step of Methylmalonyl-CoA Mutase* – A.Dybala-Defratyka, P.Paneth, 2001 an Isotope Odyssey, New Applications for a new millenium, International Conference, Zakopane, Poland, June 2001 - POSTER

18. *Instanton Calculations of the tunneling contribution to isotope effects in hydrogen atom transfers* - A.Dybala, J. Gębicki, P. Paneth, 5th International Conference COMPUTERS IN CHEMISTRY'99 and Polish-American Workshop, „New trends in computational methods for large molecular systems”, Szklarska Poręba, Poland, July 1999 - POSTER

19. *Isotopic Fractionation of Irradiated Polymers* - A. Dybała, S. Madhavan, J. Rosiak, P. Paneth, Gordon Research Conference “Frontiers of Science”, “Isotopes in Biological & Chemical Sciences”, Ventura, CA, USA, February 1998 - POSTER

Komitety organizacyjne konferencji:

- 2013** współprzewodniczenie międzynarodowej konferencji Isotopes 2013
(www.isotopes-conference.eu) - Sopot, czerwiec 16-21 (organizacja wraz z dr Martinem Elsnerem z Helmholtz Zentrum München)
- 2011** wice-przewodnicząca i członkini naukowego komitetu doradczego
międzynarodowej konferencji Isotopes 2011, Francja, czerwiec
- 2010** współorganizacja międzynarodowego Mikrosymposium “High-level quantum
chemistry meets in Lodz” z okazji nadania honorowego doktoratu prof. D.G.
Truhlar'owi z University of Minnesota przez Politechnikę Łódzką, Łódź
- 2001** Sekretarz międzynarodowej konferencji (Isotopes 2001) Zakopane, Poland in
2001 and organizowanej przez prof. Piotra Paneth (Politechnika Łódzka) oraz
prof. Vernona E. Anderson'a (Case Western Ohio Reserve University)

5.9. Recenzowanie publikacji

Byłam recenzentką 16 manuskryptów zgłoszonych do następujących czasopism z listy JCR:

- Journal of the American Chemical Society (5 manuskryptów w latach 2009-2012)
- Environmental Science & Technology (5 manuskryptów w latach 2009-2012)
- Journal of Molecular Modeling (1 manuskrypt w 2011)
- Theochem (1 manuskrypt w 2010)
- Electrochimica Acta (1 manuskrypt w 2012)
- BBA - Proteins and Proteomics (1 manuskrypt w 2011)
- Central European Journal of Chemistry (1 manuskrypt w 2009)
- Journal of Hazardous Materials (1 manuskrypt w 2013)

5.10. Opieka naukowa nad studentami oraz doktorantami

- promotorka pomocnicza pracy doktorskiej dr inż. Łukasza Szatkowskiego pt. *Mechanizmy enzymatycznej dehalogenacji pochodnych chlorofenoli obronionej w 2012*
- promotorka pomocnicza pracy doktorskiej mgr Rabindry Nath Manny (tematyka: *Theoretical modeling of environmentally important biotic and abiotic dehalogenation processes. In particular modelling of dehalogenations catalyzed by LinA*)
- opieka nad doktoratem mgr inż. Anny Grzybkowskiej (tematyka: *Mechanizm enzymatycznej hydrolizy s-triazyn*)
- opieka nad magisterską pracą dyplomową (tematyka: *Modelowanie oddziaływań pomiędzy tRNA a cytochromem c*)

6. Działalność dydaktyczna

- Technologie Informatyczne dla międzywydziałowego kierunku zamawianego Chemia Budowlana (I stopień) - przygotowanie programu zajęć oraz prowadzenie wykładów i laboratorium komputerowego (łącznie 30 h, liczba studentów: około 30)
- Informatyka dla międzywydziałowego kierunku zamawianego Chemia Budowlana (I stopień) - przygotowanie programu zajęć oraz prowadzenie wykładów i laboratorium komputerowego (łącznie 30 h, liczba studentów: około 30)

- Metody obliczeniowe w projektowaniu leków dla studentów specjalności Chemia medyczna (II stopień) - przygotowanie programu zajęć oraz prowadzenie wykładów (łącznie 15 h, liczba studentów: 8-10)
- Angielska terminologia chemiczna - dla kierunku Chemia, specjalność Chemia biologiczna - przygotowanie programu oraz prowadzenia zajęć (30 h, liczba studentów około 10-12)
- Ochrona własności intelektualnej dla międzywydziałowego kierunku zamawianego Chemia Budowlana (I stopień) - przygotowanie programu zajęć oraz prowadzenie wykładów (łącznie 15 h, liczba studentów: około 25)
- Przygotowanie i współprowadzenie kursu z podstaw modelowania molekularnego (łącznie 35 h: wykłady i zajęcia praktyczne) dla 16 doktorantów w ramach projektu europejskiego MCA-ITN: CSI: Environment (czerwiec, 2013)

7. Udział w zespołach eksperckich

- 2010-2011** powołanie do Zespołu doradczego do spraw przygotowań do kompleksowej oceny działalności jednostek naukowych, MNiSW, prof. B. Kudrycka
- 2012-2014** pełnomocniczka Dziekana Wydziału Chemicznego PŁ ds ochrony praw autorskich

8. Udział w szkoleniach i warsztatach

- 2013** program szkoleniowy FastTrac TechVenture opracowany przez amerykańską [Fundację Kauffmana](#) zorganizowany przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej (transfer technologii i przedsiębiorczość naukowców) w ramach projektu Skills
- 2013** warsztat umiejętności przywódczych pt. "Nowy model przywództwa kobiet", Vital Voices Poland&Ambasada USA, American Corner Lodz, Biblioteka Główna UŁ

2009 warsztaty "Prawo własności intelektualnej w kontekście tworzenia bibliotek cyfrowych", Dział Transfer Technologii PŁ i Biblioteka Główna PŁ

9. Inne doświadczenia zawodowe

2003-2008 redaktor zarządzający, Central European Journal of Chemistry, Versita

2008-2009 dyrektor wydawniczy, Versita

2011-obecnie z-ca dyrektora Międzyresortowego Instytutu Techniki Radiacyjnej, PŁ

10. Syntetyczne dane dotyczące dorobku naukowego (Tabela)

	Przed uzyskaniem stopnia doktora	Po uzyskaniu stopnia doktora	Łącznie
Publikacje z listy JCR	2	17	19
Pozostałe publikacje w wydawnictwach recenzowanych	1	4	5
Publikacje łącznie	3	21	24
Sumaryczny IF	6.082	62.139	68.221
Cytowania obce w periodykach z JCR	47	163	210
Autocytowania w periodykach z JCR	1	21	22
Łączna liczba cytowań	48	184	232
Indeks Hirscha	2	8	9
Konferencje międzynarodowe	4	14	18
Konferencje krajowe	-	1	19
Kierowanie projektami badawczymi	-	1	1

Wykonawstwo w projektach badawczych	1	3	4
-------------------------------------	---	---	---

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. W. Kozłowski'.