

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

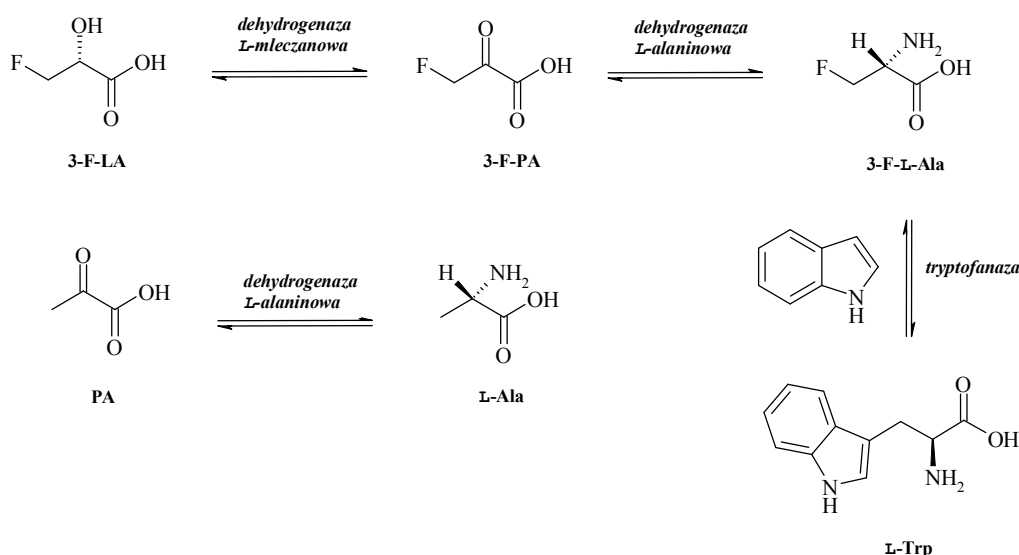
Badanie biotransformacji L-alaniny i jej pochodnych metodami izotopowymi

Promotor: prof. dr hab. Marianna Kańska

Aminokwas L-alanina (L-Ala) jest ważnym składnikiem i prekursorem bakteryjnej ściany komórkowej, gdyż wraz z D-alaniną odpowiada za sieciowanie łańcuchów polisacharydowych w peptydoglikanie. L-Ala jest produktem redukcyjnego aminowania kwasu pirogronowego (PA) katalizowanego przez enzym dehydrogenazę L-alaninową (AlaDH, EC 1.4.1.1). Enzym ten nie występuje w organizmie ludzkim, jednak uczestniczy w wielu szlakach metabolicznych bakterii zapewniając źródło azotu i węgla oraz pełniąc istotną rolę w dostarczaniu energii do procesu sporulacji, czyli tworzenia form przetrwalnikowych mikroorganizmów z rodzaju *Bacillus*. Z tego względu istnieją hipotezy, iż enzym AlaDH uczestniczy również w procesie biosyntezy bakteryjnej ściany komórkowej. Pomimo, że enzym ten jest znany od ponad pół wieku, mechanizm jego katalizy nie został do końca poznany i wyjaśniony. Niedawne odkrycie obecności AlaDH w chorobotwórczym szczepie bakterii *Mycobacterium tuberculosis* jest dodatkowym bodźcem do badania tego enzymu, gdyż stanowi on potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu gruźlicy, której nawrót obserwuje się nawet w krajach wysokorozwiniętych.

Dodatkowo, według niektórych źródeł, pochodna L-alaniny – 3-fluoro-L-alanina (3-F-L-Ala), będąca nienaturalnym aminokwasem i produktem enzymatycznej redukcji kwasu 3-fluoropirogronowego (3-F-PA) z udziałem AlaDH, ma potencjalne znaczenie antybakteryjne i przeciwwirusowe. Wynika to z faktu, iż związek ten, zamiast L-alaniny, wbudowuje się do komórek mikroorganizmów, powodując nieprawidłowości w metabolizmie oraz stanowi inhibitor niektórych enzymów uczestniczących w biosyntezie ściany komórkowej bakterii, takich jak racemaza alaninowa (AlaR, EC 5.1.1.1). Zgłębienie mechanizmu działania AlaDH mogłoby przyczynić się do pełniejszego poznania procesów metabolicznych bakterii oraz opracowania nowych farmaceutyków przeciwbakteryjnych i szczepionek przeciwgruźliczych, co miałyby ogromne znaczenie w epidemiologii. Zablokowanie funkcji enzymu AlaDH poprzez zaprojektowanie odpowiedniego inhibitora mogłoby doprowadzić do zahamowania biosyntezy ściany komórkowej, a tym samym zatrzymania rozwoju patogennych bakterii.

Celem mojej rozprawy doktorskiej było badanie mechanizmu odwracalnej biotransformacji L-alaniny i jej fluoropochodnej katalizowanych przez enzym – dehydrogenazę L-alaninową oraz uzyskanie informacji na temat przebiegu reakcji redukcji kwasu 3-fluoropirogronowego do kwasu (*R*)-3-fluoromlekowego ((*R*)-3-F-LA) z udziałem dehydrogenazy L-mleczanowej (LDH, EC 1.1.1.27). Do badania tych przemian posłużyła mi metoda rozpuszczalnikowych, SIE i kinetycznych efektów izotopowych, KIE. Zastosowane metody izotopowe wymagają użycia związków selektywnie znakowanych deuterem. Z tego względu moja praca składała się z dwóch części: syntetycznej i kinetycznej. Dodatkowo otrzymana przeze mnie fluoropochodna L-alaniny posłużyła jako substrat w syntezie L-tryptofanu w wyniku reakcji sprzęgania z indolem katalizowanej przez tryptofanazę (Tfase, EC 4.1.99.1) – enzym z klasy liaz katalizujący rzadką w przyrodzie reakcję tworzenia wiązania pomiędzy aromatycznym i alifatycznym atomem węgla. Poniżej przedstawiłam badane przeze mnie procesy, *Schemat 1*:



Schemat 1. Biotransformacja L-Ala i jej pochodnych

Pierwsza część moich badań dotyczyła opracowania i optymalizacji warunków syntez z udziałem związków natywnych, metod identyfikacji i kontroli postępu reakcji, a także technik izolacji produktów. Kolejnym stadium było otrzymanie izotopomerów znakowanych deuterem tj. L-alaniny, 3-fluoro-L-alaniny, L-tryptofanu oraz koenzymu NADH. W ramach pracy doktorskiej opracowałam i przeprowadziłam syntezę następujących związków:

- [(4*R*)-²H]-NADH – izotopomeru koenzymu NADH znakowanego deuterem w pozycji 4*R* pierścienia nikotynoamidowego otrzymanego przez redukcję NAD⁺ (z jednoczesnym utlenieniem kwasu mrówkowego do dwutlenku węgla) katalizowaną przez dehydrogenazę mrówczanową (FDH, EC 1.2.1.2),

- **[2-²H]-L-alaniny** – izotopomeru L-alaniny znakowanego deuterem otrzymanego przez redukcyjne aminowanie kwasu pirogronowego katalizowane przez AlaDH. Źródłem deuteru był otrzymany przeze mnie w toku wcześniejszych doświadczeń izotopolog [(4R)-²H]-NADH,
- **[2-²H]-fluoro-L-alaniny** – izotopomeru 3-fluoro-L-alaniny znakowanego deuterem, otrzymanego przez redukcyjne aminowanie kwasu 3-fluoropirogronowego katalizowane przez AlaDH. Ze względu na potencjalne zastosowanie 3-(1[¹⁸F]fluorometylo)-L-alaniny w medycynie nuklearnej do obrazowania guzów mózgu, opracowana przeze mnie metoda szybkiej enzymatycznej syntezy fluoropochodnej L-alaniny mogłaby w przyszłości być użyteczna w syntezie znaczników w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).
- **[2-²H]-L-tryptofanu** – izotopomeru L-tryptofanu znakowanego deuterem, będącego produktem reakcji sprzęgania indolu z 3-F-L-Ala z udziałem enzymu tryptofanazy. W toku dotychczasowych badań literatury nie odnotowałam wykorzystania fluoropochodnej L-alaniny w tego typu syntezie.

Drugą część pracy poświęciłam na badanie mechanizmu biotransformacji L-alaniny i jej fluoropochodnej katalizowanych przez dehydrogenazę L-alaninową. Do wyznaczania efektów izotopowych posłużyła mi metoda niekonkurencyjna, która opiera się na spektrofotometrycznym badaniu kinetyki reakcji enzymatycznych z udziałem lżejszych i cięższych izotopów tego samego pierwiastka; w przypadku przeprowadzonych przeze mnie badań były to izotopy wodoru: prot i deuter. KIE i SIE dla reakcji oksydacyjnej deminacji L-Ala i 3-F-L-Ala oraz redukcyjnego aminowania PA i 3-F-PA, jak również ich izotopomerów, wyznaczyłam poprzez obliczenie parametrów kinetycznych: V_{max} i K_M dla badanych reakcji w buforach protonowanym i deuterowanym, *Tabela 1. i 2.*

Związek	Medium reakcyjne	Kinetyczny efekt izotopowy KIE	
		na V_{max}	na V_{max}/K_M
L-alanina	¹ H ₂ O	1,2 ± 0,1	2,2 ± 0,1
	² H ₂ O	0,99 ± 0,07	2,1 ± 0,06
3-fluoro-L-alanina	¹ H ₂ O	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,3
	² H ₂ O	1,6 ± 0,1	2,5 ± 0,3
kwas pirogronowy	0,75 M bufor ¹ H ₂ O	1,1 ± 0,2	0,99 ± 0,03
	0,75 M bufor ² H ₂ O	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,05
kwas pirogronowy	0,025 M bufor ¹ H ₂ O	0,94 ± 0,2	0,91 ± 0,1
	0,025 M bufor ¹ H ₂ O	1,0 ± 0,4	0,83 ± 0,04
kwas 3-fluoropirogronowy	¹ H ₂ O	1,9 ± 0,2	1,7 ± 0,1
	² H ₂ O	1,4 ± 0,2	0,89 ± 0,1

Tabela 1. Kinetyczne efekty izotopowe dla reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę L-alaninową

Związek	Koenzym	Rozpuszczalnikowy efekt izotopowy SIE	
		na V_{max}	na V_{max}/K_M
L-alanina	NAD ⁺	2,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1
[2- ² H]-L-alanina	NAD ⁺	1,4 ± 0,1	1,7 ± 0,2
3-fluoro-L-alanina	NAD ⁺	1,0 ± 0,2	0,87 ± 0,06
3-fluoro-[2- ² H]-L-alanina	NAD ⁺	1,5 ± 0,2	1,7 ± 0,2
kwas pirogronowy 0,75 M bufor	NADH	0,9 ± 0,2	0,9 ± 0,04
	[(4R)- ² H]-NADH	0,87 ± 0,07	0,96 ± 0,04
kwas pirogronowy 0,025 M bufor	NADH	3,8 ± 0,6	3,7 ± 0,9
	[(4R)- ² H]-NADH	1,2 ± 0,4	0,98 ± 0,3
kwas 3-fluoropirogronowy	NADH	6,0 ± 0,9	1,5 ± 0,2
	[(4R)- ² H]-NADH	4,4 ± 0,3	0,82 ± 0,09

Tabela 2. Rozpuszczalnikowe efekty izotopowe dla reakcji katalizowanych przez dehydrogenazę L-alaninową

Co więcej, w celu wyjaśnienia pewnych detali mechanizmu, wyznaczyłam SIE dla redukcji kwasu 3-fluoropirogronowego do kwasu (R)-3-fluoromlekowego katalizowanej przez dehydrogenazę L-mleczanową. Tabela 3.

Substrat	Rozpuszczalnikowy efekt izotopowy SIE	
	na V_{max}	na V_{max}/K_M
Kwas 3-fluoropirogronowy	1,4 ± 0,2	1,3 ± 0,1

Tabela 3. Rozpuszczalnikowe efekty izotopowe dla reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę L-mleczanową

Wyznaczone wartości efektów izotopowych rzuciły nowe światło na mechanizmy reakcji katalizowanych przez dehydrogenazy L-alaninową i L-mleczanową. Wielkość efektów izotopowych wskazuje na złożoność mechanizmów działania tych enzymów i częściowe limitowanie szybkości reakcji poprzez poszczególne etapy całego procesu.

Wyznaczone przeze mnie wartości KIE w reakcji oksydacyjnej deaminacji L-Ala i 3-F-L-Ala katalizowanej przez AlaDH wskazują na to, iż przeniesienie anionu wodorkowego z substratu na koenzym NAD⁺ jest etapem wrażliwym na podstawienie izotopowe i częściowo limituje szybkość całego procesu. Przeprowadzone dotychczas badania nad mechanizmem działania AlaDH świadczą o tym, że głównym etapem decydującym o szybkości całej przemiany jest izomeryzacja utworzonego kompleksu AlaDH-NAD⁺ do formy zdolnej związać substrat. Ponadto, pewne etapy reakcji są zależne od pH medium reakcyjnego, co znajduje odzwierciedlenie w wielkościach efektów izotopowych.

Obecność podstawnika fluorowego o znacznej elektroujemności powoduje zmiany w otoczeniu wiązań, które ulegają przekształceniu podczas redukcyjnego aminowania 3-F-PA, co skutkuje w większości przypadków podwyższeniem wartości KIE. W rezultacie, rozpatrywany etap katalizy jest wrażliwy na podstawienie izotopowe i w większym stopniu decyduje o szybkości całego procesu niż w reakcji z udziałem PA.

Wyniki moich badań pozwoliły na wyjaśnienie pewnych aspektów mechanistycznych biotransformacji L-alaniny i jej fluoropochodnej. Oprócz charakteru poznawczego, zaproponowane metody mogą mieć znaczenie praktyczne i zostać wykorzystane na potrzeby medycyny nuklearnej, zwłaszcza w pozytonowej tomografii emisyjnej, PET, w której wykorzystuje się związki znakowane izotopami krótkożyciowymi.