

Warszawa, dn. 2. 12. 2013 r.

Mgr Sylwia Dragulska
Wydział Chemii UW
Pracowania Chemii Biomolekuł

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

Synteza znakowanych tryptamin i badanie mechanizmu ich biotransformacji metodami izotopowymi

Promotor: prof. dr hab. Marianna Kańska

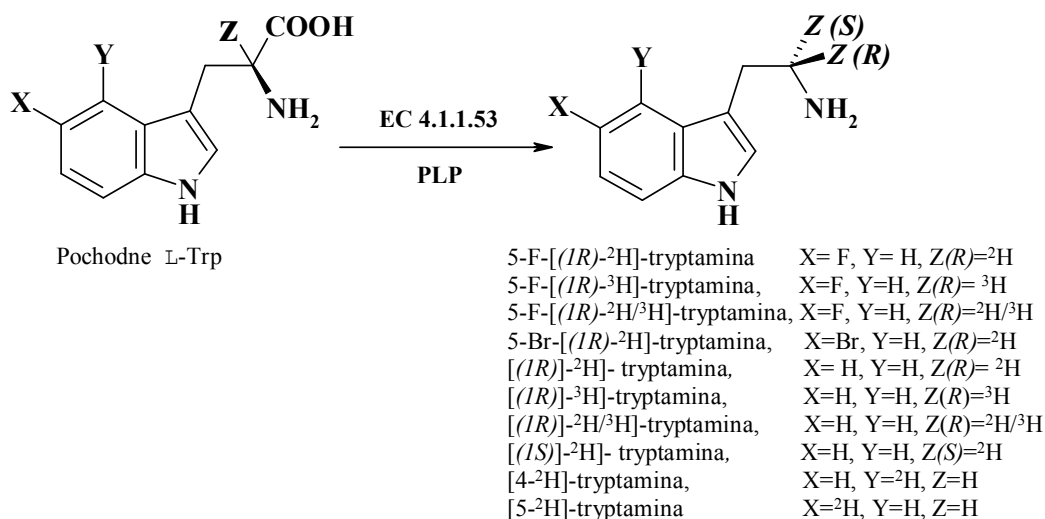
Tryptamina, Tra, jest przedstawicielem indolowych amin biogennych nazywanych ogólnie rodziną tryptamin. Posiada ona istotne znaczenie biologiczne, biochemiczne i medyczne ze względu na to, że stanowi strukturalny szkielet dla wielu związków pełniących fundamentalną rolę w organizmie np. serotoniny (neurotransmitera układu serotonergicznego w ośrodkowym układzie nerwowym) czy melatoniny (hormonu koordynującego procesy fizjologiczne organizmu).

Tra jest produktem biotransformacji egzogenego aminokwasu, L-tryptofanu, L-Trp. Powstaje na drodze enzymatycznej przemiany L-Trp katalizowanej przez dekarboksylazę L-tryptofanową (TDC, EC 4.1.1.28). Następnie ulega biodegradacji do aldehydu 3-indolilooctowego (3-IAL) w wyniku enzymatycznej deaminacji katalizowanej przez enzym oksydazę monoaminową typu A (MAO A, EC 1.4.3.4). Enzym ten odgrywa kluczową rolę w ośrodkowym układzie nerwowym koordynując metabolizm wielu amin biogennych pełniących znaczącą rolę biologiczną w organizmie tj. serotoniny, dopaminy czy adrenaliny. Z tego względu uważa się, że MAO jest zaangażowany w procesy patologiczne o podłożu neurologicznym np. choroby neurodegeneracyjne (choroba Parkinsona, choroba Alzheimera), ale także depresję czy schizofrenię. Badanie mechanizmu działania tego enzymu pozwala na zrozumienie roli, jaką odgrywa ten enzym w różnego rodzaju schorzeniach i anomaliach ośrodkowego układu nerwowego. Ponadto jest źródłem cennych informacji w opracowywaniu nowych rozwiązań medycznych zapobiegających procesom chorobotwórczym.

Celem mojej rozprawy doktorskiej było badanie mechanizmu enzymatycznych deaminacji metabolitów L-tryptofanu tj. tryptaminy i jej pochodnych katalizowanych przez oksydazę monoaminową typu A. Do badania mechanizmu reakcji utleniania zastosowałam metodę kinetycznych (KIE) i rozpuszczalnikowych (SIE) efektów izotopowych, która wymaga użycia związków

selektywnie znakowanych. Z tego względu w ramach mojej pracy doktorskiej wyróżniłam dwie części syntetyczną i kinetyczną.

W pierwszej części opracowałam metody enzymatycznej dekarboksylacji L-Trp i jego pochodnych katalizowanych przez dekarboksylazę L-fenylalaninową (EC 4.1.1.53) wiodące do otrzymania izotopomerów tryptaminy (Rys. 1).



Rys. 1.

Synteza izotopomerów tryptaminy i jej halogenowych pochodnych znakowanych izotopami wodoru w łańcuchu bocznym oraz pierścieniu indolowym

Wszystkie próby syntezy, oczyszczenia i wydzielenia produktów wykonałam na związkach natywnych w mikroskali, a następnie wykonałam syntezy związków znakowanych. Otrzymałam znakowane deuterem w pozycjach (*IR*) i (*IS*) izotopomery tryptaminy tj. [(*IR*)-²H]-tryptaminę i [(*IS*)-²H]-tryptaminę oraz jej halogenowe pochodne znakowane deuterem w pozycji (*IR*) tj. 5-F-[(*IR*)-²H]-tryptaminę i 5-Br-[(*IR*)-²H]-tryptaminę. Ponadto na drodze wieloetapowych syntez, z ostatnim etapem enzymatycznej dekarboksylacji, otrzymałam znakowane deuterem w pierścieniu indolowym izotopomery tryptaminy tj. [4-²H]-tryptaminę i [5-²H]-tryptaminę. Otrzymałam również znakowane izotopami promieniotwórczymi tj. trytem i węglem C-14 izotopomery tryptaminy tj. [(*IR*)-³H]-tryptaminę, [(*IR*)-²H/³H]-tryptaminę, 5-F-[(*IR*)-³H]-tryptaminę, 5-F-[(*IR*)-²H/³H]-tryptaminę oraz [2-¹⁴C]-tryptaminę.

Druga część pracy dotyczyła badania mechanizmu reakcji utleniania tryptaminy i jej pochodnych katalizowanych przez oksydazę monoaminową A. Do wyznaczenia kinetycznego efektu izotopowego deuteru wykorzystałam metodę niekonkurencyjną polegającą na przeprowadzeniu niezależnych pomiarów parametrów kinetycznych związku natywnego i znakowanego. Wyznaczyłam parametry kinetyczne reakcji utleniania tryptamin natywnych i znakowanych w pozycjach (*IR*) i (*IS*), halogenowych pochodnych natywnych i znakowanych w pozycji (*IR*) i 5-OH-tryptaminy buforach protonowanym i deuterowanym. Na podstawie parametrów kinetycznych wyznaczyłam wartości liczbowe rozpuszczalnikowych efektów izotopowych (SIE) dla tryptaminy, [(*IR*)-²H]-tryptaminy,

[(*IS*)-²H]-tryptaminy, 5-F-tryptaminy 5-F-[(*IR*)-²H]-tryptaminy oraz 5-OH tryptaminy. Dla związków znakowanych deuterem wyznaczyłam również wartości liczbowe kinetycznego efektu izotopowego (KIE) deuteru na szybkość maksymalną (V_{\max}) i stosunek szybkości maksymalnej do stałej Michaelisa (V_{\max}/K_M) w pozycjach (*IR*) i (*IS*). Pomiar KIE i SIE prowadziłam metodą spektrofotometryczną. Wartości liczbowe SIE i KIE przedstawiłam odpowiednio w tabeli 1 i tabeli 2.

Tabela 1. Rozpuszczalnikowy efekt izotopowy dla reakcji utleniania tryptaminy i jej pochodnych katalizowanych przez MAO A

Związek/medium reakcyjne	Rozpuszczalnikowy efekt izotopowy SIE	
	na V_{\max}	na V_{\max}/K_M
Tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	3,6	4,6
[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	4,9	2,28
[(<i>IS</i>)- ² H]-tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	4,12	2,37
5-F-tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	2,56	3,9
5-F-[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	1,33	1,9
5-OH-tryptamina w $H_2O/{}^2H_2O$	1,66	1,11

Tabela 2. Kinetyczny efekt rozpuszczalnikowy dla reakcji utleniania tryptaminy i jej pochodnych katalizowanych przez MAO A

Związek/medium reakcyjne	Kinetyczny efekt izotopowy KIE	
	na V_{\max}	na V_{\max}/K_M
[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w H_2O	4,2	23,7
[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w 2H_2O	5,68	11,7
[(<i>IS</i>)- ² H]-tryptamina w H_2O	1,39	2,7
[(<i>IS</i>)- ² H]-tryptamina w 2H_2O	1,58	1,39
5-F-[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w H_2O	3,6	3,6
5-F-[(<i>IR</i>)- ² H]-tryptamina w 2H_2O	1,89	1,78

Przeprowadzone przez mnie badania kinetyczne reakcji utleniania tryptaminy i jej pochodnych oraz uzyskane wartości parametrów i efektów kinetycznych pozwalają ocenić wpływ izotopu i jego rolę na tworzenie się kompleksów przejściowych. Ponadto na podstawie wyników eksperymentalnych oraz danych teoretycznych mogę powiedzieć, że spośród 3 proponowanych mechanizmów deaminacji monoamin katalizowanych przez MAO A (rodnikowy, polarny oraz wodorkowy) ten ostatni jest najbardziej prawdopodobnym. Duże wartości pierwszorzędowego kinetycznego efektu izotopowego w pozycji (*IR*) i niska wartość KIE dla (*IS*) potwierdza stereospecyficzne działanie enzymu MAO A

wobec konfiguracji absolutnej (*R*), jak również sugeruje, że wodór w pozycji (*1R*) odgrywa istotną rolę w tworzeniu kompleksu aktywnego w etapie determinującym szybkość reakcji utleniania.

Przeprowadzone przeze mnie badania mają charakter nie tylko informacyjny, ale również praktyczny, gdyż zaproponowane przeze mnie metody syntezy selektywnie znakowanych związków mogą być wykorzystane w medycynie nuklearnej do otrzymania związków biologicznie czynnych znakowanych krótkożyciowymi izotopami, które powszechnie stosowane są, jako znaczniki w bezinwazyjnej metodzie diagnostycznej tj. emisyjnej tomografii pozytonowej (PET).

Dodatkowo badania prowadziłam również na halogenowych pochodnych tryptaminy (stwierdzając przydatność tych związków, jako substratów do enzymatycznej deaminacji katalizowanej przez MAO A), w tym również z podstawnikiem fluorowym. Stwierdzenie podatności fluoropochodnych tryptamin ma istotne znaczenie, gdyż związki znakowane ^{18}F są bardzo często wykorzystywane w technice PET.