

Autoreferat rozprawy doktorskiej

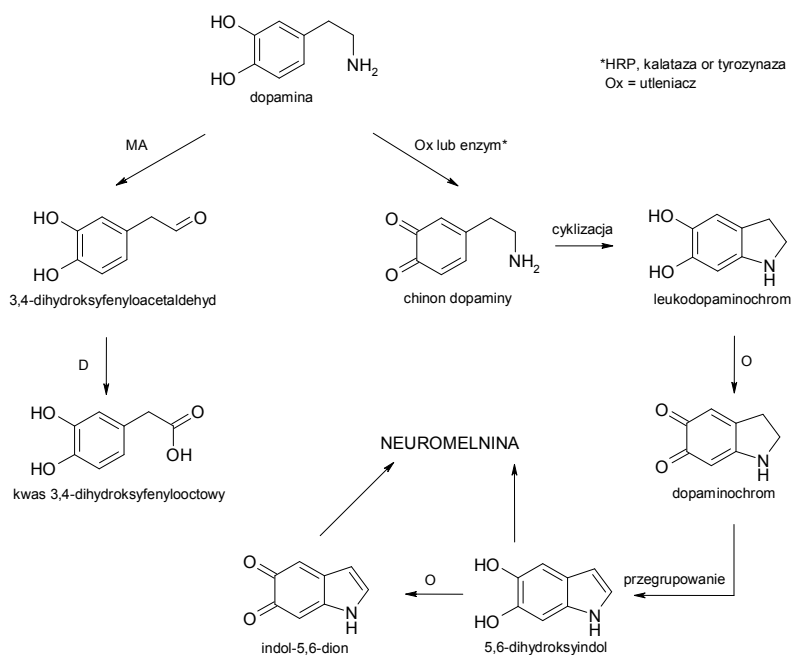
Badanie enzymatycznego utleniania L-DOPY i jej pochodnych metodami izotopowymi

promotor: prof. dr hab. Marianna Kańska

3',4'-Dihydroksyfenylo-L-alanina, znana jako L-DOPA, jest naturalnym aminokwasem, powstającym w wyniku hydroksylacji L-tyrozyny, katalizowanej przez enzym hydroksylazę tyrozynową (EC 1.14.16.2). Znaczenie biologiczne L-DOPY sprowadza się przede wszystkim do pośrednictwa w syntezie naturalnych pigmentów skóry - melanin oraz neuroprzekazników ośrodkowego układu nerwowego: dopaminy, norepinefryny i epinefryny.

Zaburzenia produkcji i metabolizmu L-DOPY oraz innych związków z ugrupowaniem katecholowym mogą być podłożem wielu patologii układu nerwowego, w tym chorób neurodegeneracyjnych m.in. choroby Parkinsona, Alzheimer'a czy schizofrenii. Postęp wymienionych schorzeń związany jest z pojawieniem się w organizmie stresu oksydacyjnego, wywołanego m.in. produktami enzymatycznego utleniania związków katecholowych (wolne rodniki, chinony czy neurotoksyczne aminochromy).

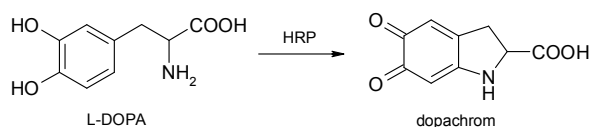
Mechanizm przemian, generujących reaktywne formy tlenu, jest złożony, a wiedza na jego temat wydaje się być wciąż ograniczona. Z jednej strony znane są reakcje katalizowane przez enzymy: monoaminooksydazę, MAO (EC 1.4.3.4) i dehydrogenazę aldehydową, DH (EC 1.2.1.3), które mogą prowadzić do mało toksycznych metabolitów, takich jak aldehydy i kwasy karboksylowe. Z drugiej strony możliwe są procesy samoutleniania związków z ugrupowaniem katecholowym, prowadzące do formowania neuromelanin, *Schemat 1*.



Schemat 1. Procesy utleniania związków katecholowych na przykładzie dopaminy

Według jednej z hipotez, działanie halucynogenne dopachromu i jego pochodnych czyni wymienione związki wysoce reaktywnymi neurotoksynami, które uwydatniają symptomy chorób, takich jak schizofrenia. Jednocześnie obniżony poziom dopaminy czy też L-DOPY może być przyczyną parkinsonizmu bądź choroby Alzheimer'a. Stąd wynika moje szczególne zainteresowanie poznaniem wczesnych stadiów reakcji utleniania związków katecholowych, prowadzących do formowania neurotoksycznych metabolitów, jakimi są dopachrom i jego pochodne. Poznanie mechanizmu wspomnianej reakcji może być etapem kluczowym w zrozumieniu podłoża chorób neurodegeneracyjnych i walce z ich przyczynami.

W ramach mojej pracy doktorskiej postawiłam sobie za zadanie przebadanie pod kątem mechanistycznym biotransformacji L-DOPY i innych związków z ugrupowaniem katecholowym do dopachromu lub jego pochodnych, Schemat 2.



Schemat 2. Utlenianie związków katecholowych katalizowane przez peroksydazę chrzanową (HRP) na przykładzie L-DOPY

Reakcja ta katalizowana jest przez enzym należący do klasy oksydoreduktaz - peroksydazę chrzanową, HRP (EC 1.11.1.7). Do badania mechanizmu powyższej przemiany wykorzystałam niezbyt często stosowane metody kinetycznych (KIE) i rozpuszczalnikowych (SIE) efektów izotopowych, które mogą dostarczyć istotnych informacji na temat tworzenia bądź rozrywania wiązań w etapie decydującym o szybkości reakcji chemicznej. Zastosowanie wymienionych metod narzuca konieczność uprzedniego otrzymania związków znakowanych izotopami stabilnymi i/bądź promieniotwórczymi, których oferta handlowa jest niezwykle ograniczona. Dlatego też szczególnie ważnym elementem mojej pracy było zoptymalizowanie warunków reakcji i synteza odpowiednich izotopomerów L-DOPY oraz jej pochodnych.

Pierwsza część mojej pracy badawczej polegała na optymalizacji warunków syntez w skali mikro, metod kontroli postępu reakcji oraz technik oczyszczania izotopomerów L-DOPY, dopaminy i norepinefryny znakowanych izotopami wodoru - deuterem oraz trytem – a następnie otrzymania wymienionych izotopomerów. W ramach pracy doktorskiej zoptymalizowałam bądź opracowałam metody syntezy:

- izotopomerów dopaminy i L-DOPY, znakowanych deuterem i/lub trytem w pozycjach 2', 5', 6' pierścienia aromatycznego na drodze wymiany izotopowej katalizowanej kwasem, tj. **[2',5',6'-²H₃]-dopaminy oraz [2',5',6'-²H₃]-, [2',5',6'-³H₃]- i [2',5',6'-²H₃/^βH₃]-L-DOPY,**
- izotopomerów L-tyrozyny, znakowanych deuterem oraz trytem w pozycjach 3' i 5' pierścienia aromatycznego, jako prekursorów do syntezy odpowiednich izotopomerów L-DOPY, tj. **[3',5'-²H₂]- i [3',5'-³H₂]-L-tyrozyny,**
- izotopomeru L-DOPY, znakowanego w pozycji 5' pierścienia aromatycznego na drodze odwrotnej wymiany izotopowej w [2',5',6'-²H₃]-L-DOPIE lub enzymatycznej hydroksylacji [3',5'-²H₂]-L-tyrozyny, tj. **[5'-²H]-L-DOPY,**

- izotopomeru L-DOPY, znakowanego podwójnie deuterem w pozycji 3 łańcucha alifatycznego w wyniku enzymatycznej hydroksylacji [3,3-²H₂]-L-tyrozyny, tj. [3,3-²H₂]-L-DOPY.

Ponadto w syntetycznej części opracowałam szybką metodę otrzymywania norepinefryny z 3,4-dihydroksybenzaldehydu i NaCN, która może służyć jako reakcja prekursorowa do znakowania tej aminy izotopami węgla zarówno stabilnymi, jak i promieniotwórczymi. Stwarza to możliwość wykorzystania tej metody w medycynie nuklearnej, szczególnie do pozyskania związków użytecznych w pozytonowej tomografii emisyjnej (PET).

W drugiej części pracy badawczej skupiłam się na badaniu mechanizmu powstawania aminochromów w reakcjach utleniania L-DOPY i jej pochodnych katalizowanych przez enzym HRP. Wykorzystałam w tym celu jedno z najpotężniejszych narzędzi stosowanych do badań mechanistycznych, a mianowicie metodę kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych. KIE i SIE dla deuteru wyznaczyłam za pomocą niekonkurencyjnej metody pomiarów spektrofotometrycznych, prowadząc reakcje utleniania L-DOPY, dopaminy, norepinefryny i ich izotopomerów znakowanych deuterem. Pozwoliło mi to na obliczenie parametrów kinetycznych: V_{max} oraz K_M badanych reakcji w buforach protonowanym i deuterowanym, na podstawie których otrzymałam liczbowe wartości KIE oraz SIE, *Tabela 1*.

Tabela 1. KIE i SIE dla reakcji utleniania L-DOPY i jej pochodnych katalizowanych przez peroksydazę chrzanową (HRP)

izotopomer	bufor	KIE na V_{max}	KIE na V_{max}/K_M	SIE na V_{max}	SIE na V_{max}/K_M
DA	¹ H ₂ O/ ² H ₂ O	-	-	3,1 ± 0,3	3,4 ± 0,4
[2',5',6'- ² H ₃]-DA	¹ H ₂ O	1,3 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	3,2 ± 0,1
	² H ₂ O	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2		
NE z H ₂ O ₂	¹ H ₂ O/ ² H ₂ O	-	-	2,0 ± 0,3	1,4 ± 0,1
NE bez H ₂ O ₂	¹ H ₂ O/ ² H ₂ O	-	-	3,9 ± 0,5	3,8 ± 0,3
L-DOPA	¹ H ₂ O/ ² H ₂ O	-	-	2,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1
[2',5',6'- ² H ₃]-L-DOPA	¹ H ₂ O	1,1 ± 0,1	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,2	1,6 ± 0,1
	² H ₂ O	1,3 ± 0,1	2,1 ± 0,1		
[5'- ² H]-L-DOPA	¹ H ₂ O	2,2 ± 0,1	3,2 ± 0,1	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1
	² H ₂ O	2,2 ± 0,2	2,7 ± 0,2		
[3,3- ² H ₂]-L-DOPA	¹ H ₂ O	1,3 ± 0,1	1,7 ± 0,1	-	-

Przeprowadzone badania efektów izotopowych rzuciły nowe spojrzenie na mechanizm działania HRP we wczesnych stadiach biosyntezy melanin, obejmujących reakcje utleniania związków z ugrupowaniem katecholowym do odpowiednich aminochromów. Brak efektów izotopowych lub nieduże wartości KIE oraz SIE w badanych reakcjach potwierdziły przypuszczenia o złożonym mechanizmie działania wspomnianego enzymu.

Interesujący był postęp reakcji dla norepinefryny z udziałem HRP bez dodatku H₂O₂ do medium inkubacyjnego. Jak wiadomo H₂O₂ jest kofaktorem niezbędnym do aktywności enzymu. Wyznaczone w tym

przypadku relatywnie duże wartości SIE na V_{\max} oraz V_{\max}/K_M (bliskie 4) w porównaniu ze średnio o połowę mniejszymi odpowiednimi wielkościami dla reakcji przebiegającej w obecności H_2O_2 , potwierdziły przypuszczenie tworzenia się endogenego nadtlenu wodoru w trakcie utleniania norepinefryny, który następnie zostaje wykorzystany przez enzym. Ponadto protony do syntezy H_2O_2 muszą pochodzić z rozpuszczalnika (o czym świadczy wartość efektu izotopowego), a więc rozpuszczalnik ma tutaj istotny wpływ na przebieg reakcji enzymatycznej.

Wartości KIE bliskie jedności (brak efektu izotopowego), szczególnie dla izotopomerów, znakowanych deuterem w pozycjach 2', 5' i 6' pierścienia aromatycznego, wskazują, że zamknięcie pierścienia w trakcie przejścia związku katecholowego w aminochrom nie jest etapem decydującym o szybkości reakcji. Potwierdzają to również małe wartości drugorzędowych KIE, wyznaczone dla izotopomeru $[5\text{'-}^2\text{H}]\text{-L-DOPY}$.

Wyniki otrzymane w trakcie moich badań, rzuciły nowe światło na pewne aspekty mechanistyczne w reakcji enzymatycznego utleniania L-DOPY i jej pochodnych do odpowiednich aminochromów. Jednocześnie podczas eksperymentów nasunęły się nowe pytania, które wciąż czynią ten temat bardzo atrakcyjnym.