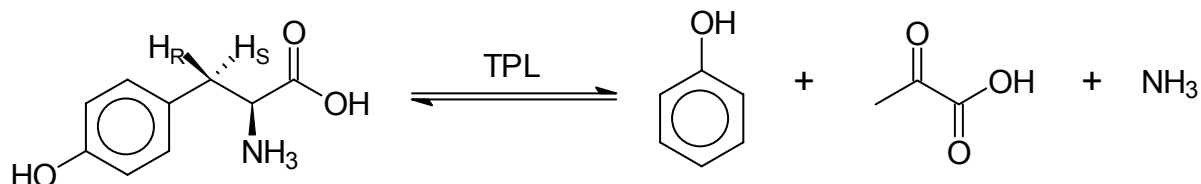


**KINETYCZNE EFEKTY IZOTOPOWE TRYTY W REAKCJI ELIMINACJI
KATALIZOWANEJ PRZEZ β -TYROZYNAZĘ**

W. Augustyniak, P. Suchecki, R. Kański, M. Kańska

Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

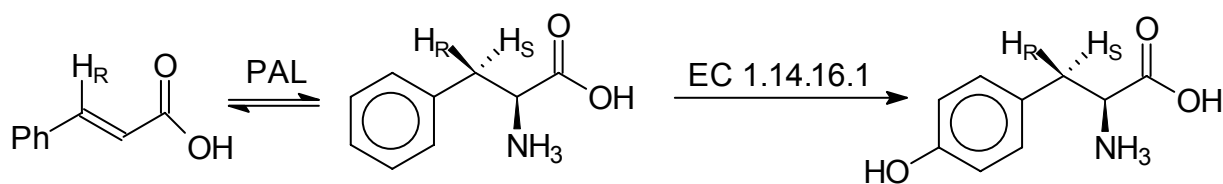
Enzym liaza tyrozynowo-fenolowa, TPL, (EC 4.1.99.2) w obecności kofaktora tj. fosforanu pirydoksalu, PLP, katalizuje reakcję rozpadu L-tyrozyny, L-Tyr, na fenol, pirogronian i amoniak:



Enzym TPL katalizuje także reakcje odwrotną, gdzie substratami mogą być różne pochodne fenolu (fluorowcopochodne) oraz L-seryna, L-cysteina, S-metylo-L-cysteina, a także kwas 2-oksobutanowy bądź L-2-aminobutanowy. Dzięki tej reakcji można otrzymywać dużą gamę pochodnych tyrozyny. TPL wykazuje także aktywność racemazy alaninowej.

Te ciekawe własności katalityczne TPL wynikają z mechanizmu działania TPL. Na podstawie różnych badań zaproponowano mechanizm reakcji prowadzący do tworzenia zasady Schiffa z udziałem grupy aldehydowej kofaktora PLP i grupy aminowej z aminokwasu, następującym oderwaniem protonu z pozycji 2 i odszczerpieniem fenolu oraz hydrolizie utworzonej iminy.

W tej pracy podjęto próbę weryfikacji tych danych za pomocą wyznaczenia kinetycznych efektów izotopowych (KEI) wodoru w czasie reakcji rozpadu L-Tyr. W tym celu otrzymano serie selektywnie znakowanych izotopami wodoru lub węgla ¹⁴C izotopomerów L-Tyr; a mianowicie [2',6'-³H₂]-L-Tyr, [3S-³H, 1-¹⁴C]-L-Tyr, [3R-³H]-L-Tyr, [1-¹⁴C]-L-Tyr i [2-¹⁴C]-L-Tyr. Znakowane ¹⁴C-L-tyrozyny służyły jako wewnętrzne standardy w metodzie podwójnego znakowania. Syntezy selektywnie znakowanych izotopomerów L-Tyr prowadzono kombinowanymi metodami zarówno chemicznymi jak i enzymatycznymi. Substratem pośrednim były odpowiednie izotopomery kwasu cynamonowego, które za pomocą stereoselektywnej addycji amoniaku, katalizowanej przez enzym PAL (EC 4.3.1.5), przekształcano w odpowiednie izotopomery L-feniloalaniny, L-Phe. W następnym etapie L-Phe była utleniana do L-Tyr za pomocą enzymu 4'-monooksygenazy L-feniloalaninowej (EC 1.14.16.1).



Uzyskane izotopomery L-Tyr użyto do wyznaczenia KEI w reakcji katalizowanej przez enzym TPL.