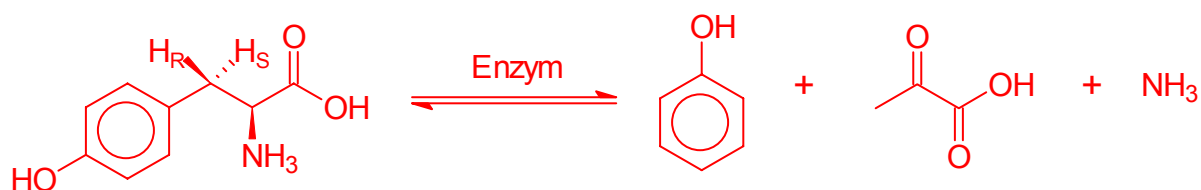


## STRESZCZENIE

Wykonano syntezę izotopomerów L-tyrozyny (L-Tyr) znakowanych podwójnie  $^{14}\text{C}$  i izotopami wodoru (D, T) w pozycjach 3*S* i 3*R* oraz selektywnie znakowanej trytem w pierścieniu benzenowym. Syntezę przeprowadzono kombinowanymi, chemicznymi i enzymatycznymi metodami z użyciem enzymów: liazy fenyloalaninowej (PAL, E.C. 4.3.5.1.) oraz 4-mono-oxygenazy L-fenyloalaninowej (EC 1.14.16.1). W pierwszym etapie otrzymano odpowiednie izotopomery L-fenyloalaniny (L-Phe) w wyniku katalizowanej przez enzym PAL addycji amoniaku do kwasu [1- $^{14}\text{C}$ ]-cy-namonowego. Następnie, przy udziale enzymu 4-mono-oxygenazy L-fenyloalaninowej, L-Phe, została przekształcona w podwójnie znakowaną L-Tyr (deuter lub tryt podłączony w pozycji 3*S* lub 3*R* oraz  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej). Wydajność syntezy otrzymanych izotopomerów L-Tyr była oznaczana metodami radiochemicznym i enzymatycznymi.

# WSTĘP

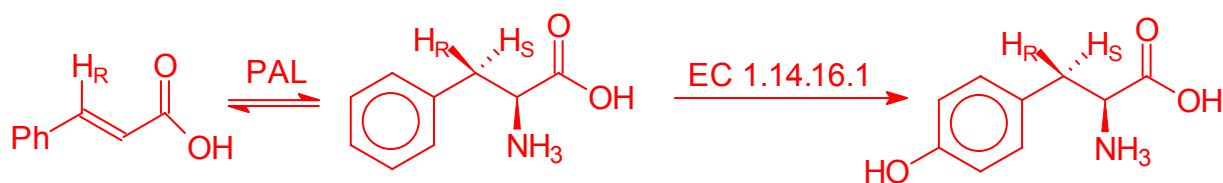
Liaza tyrozynowo-fenolowa (E.C. 4.1.99.2) katalizuje reakcję rozpadu L-tyrozyny (L-Tyr) na fenol, pirogronian i amoniak:



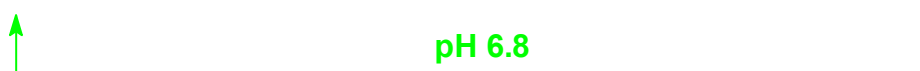
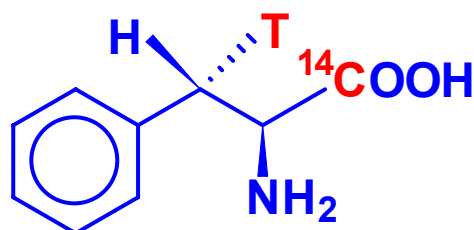
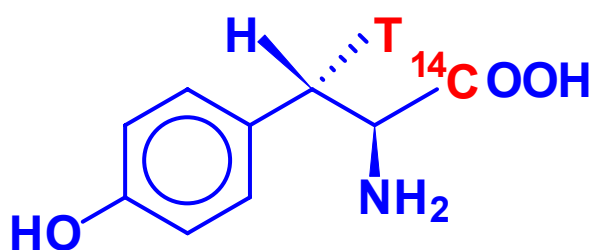
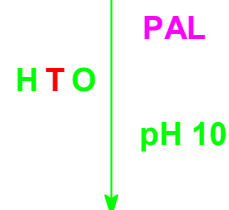
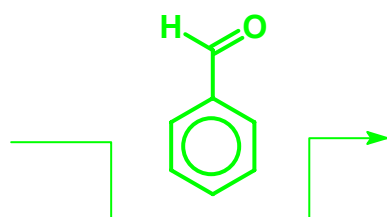
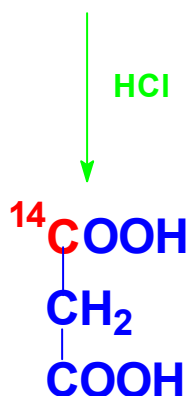
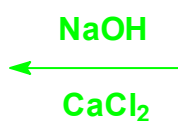
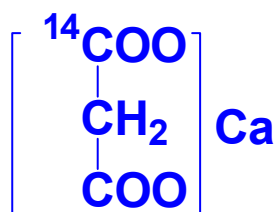
Mechanizm działania tego enzymu nie jest znany i do jego badania zamierzamy wykorzystać metodę kinetycznych efektów izotopowych (KIE) [1]. Do tego celu należy użyć, jako substratów reakcji, odpowiednich izotopomerów L-Tyr selektywnie znakowanych <sup>14</sup>C oraz deuterem i trytem. Znając wartości KIE dla deuteru i trytu można wnioskować o istnieniu efektu tunelowego [2] w danej reakcji opierając się o kryterium Saundersa [3]. Znakując cząsteczkę L-Tyr w różnych pozycjach i wyznaczając za każdym razem pierwszo- i drugorzędowy efekt izotopowy dla deuteru i trytu istnieje możliwość określenia ilości reaktywnych miejsc oraz ustalenia struktury stanu przejściowego. Planowane badania

wymagały użycia izotopomerów L-Tyr podwójnie znakowanych deuterem lub trytem w pozycji 3S i 3R oraz  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej. Obecność  $^{14}\text{C}$  w grupie karboksylowej odgrywała rolę wewnętrznego standardu radiometrycznego podczas ustalania KIE dla deuteru i trytu.

Startując z selektywnie znakowanej trytem L-fenylalaniny (L-Phe) przekształcono ją w  $[2',6'-^3\text{H}_2]$ -L-Phe wykorzystując enzym 4-monooksygenazę L-fenylalaninową (E.C. 1.14.16.1). Inne selektywnie znakowane izotopomery L-Tyr otrzymano kombinowanymi metodami tj. chemicznymi i enzymatycznymi [4,5]. Startując z selektywnie znakowanego kwasu  $[^{14}\text{C}]$ -cynamonowego uzyskiwano izotopomery L-Phe w wyniku stereoselektywnej addycji amoniaku katalizowanej przez enzym PAL (E.C. 4.3.1.5). Powstałe izotopomery L-Phe przekształcano w znakowane izotopomery L-Tyr w wyniku reakcji z enzymem 4-monooksygenazą L-fenylalaninową (E.C. 1.14.16.1).

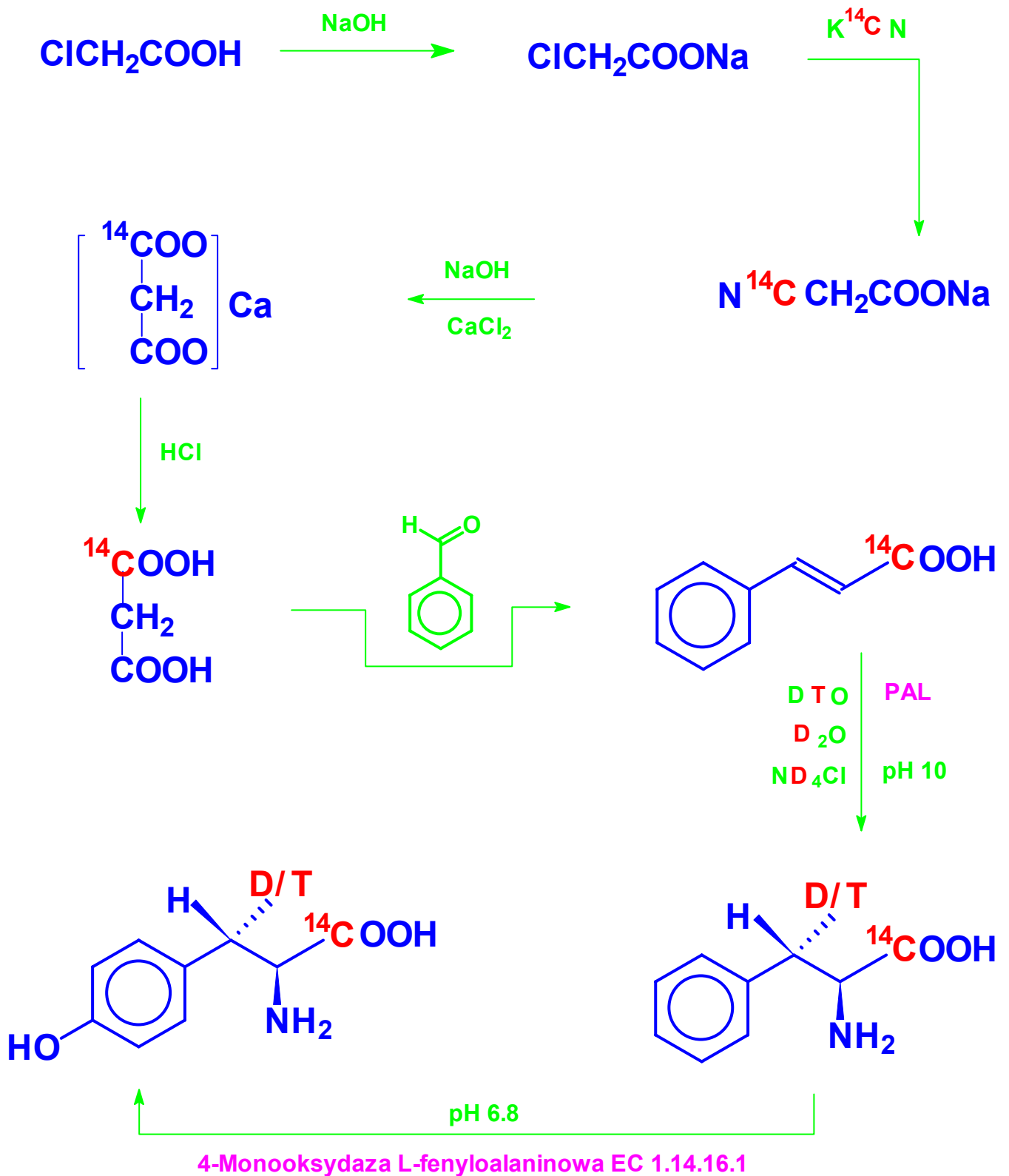


# SYNTEZA [3S-<sup>3</sup>H]-[1-<sup>14</sup>C]-L-Tyr

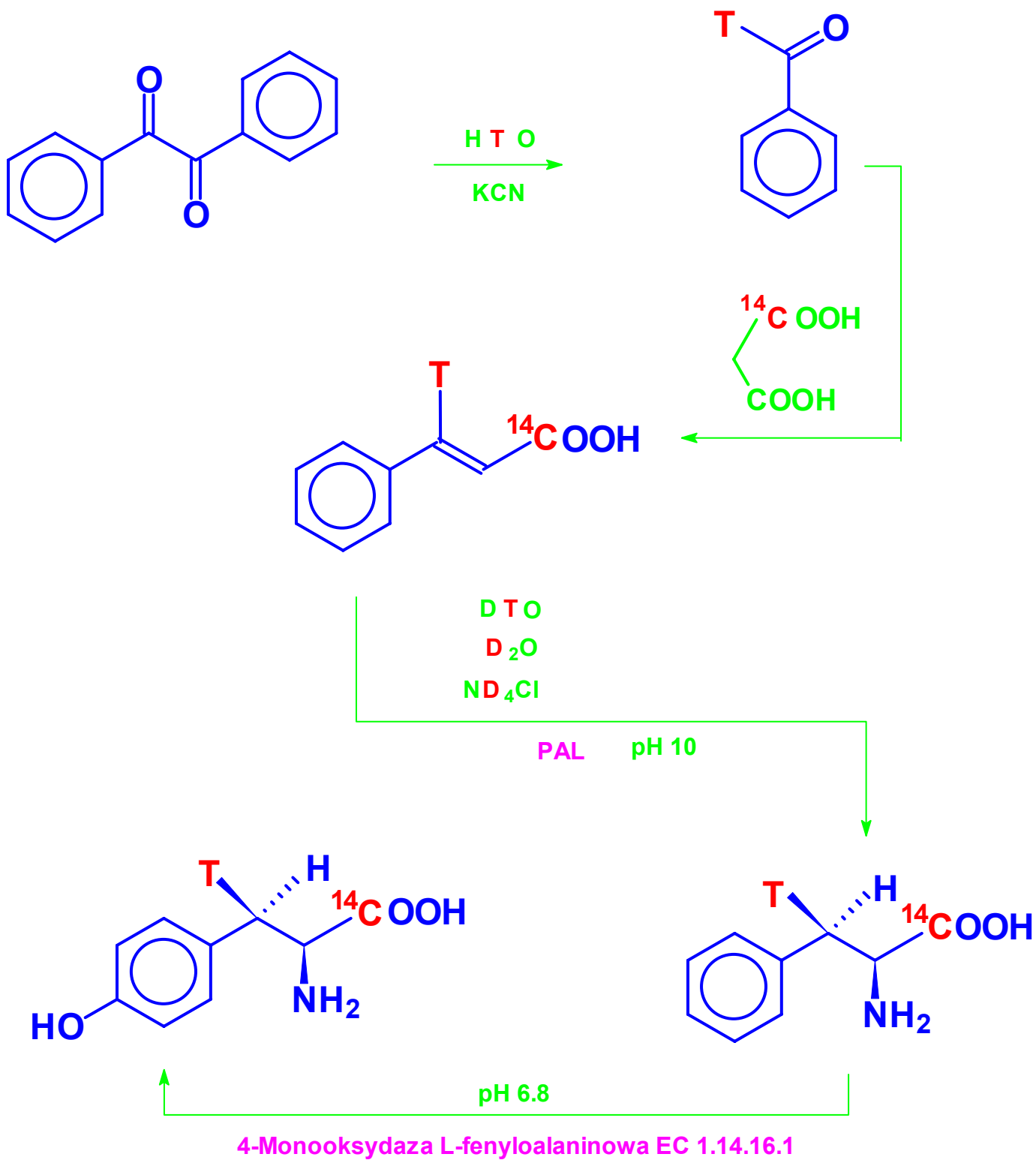


4-Monooksydaza L-fenylalaninowa, EC 1.14.16.1

# SYNTEZA [3S-<sup>3</sup>H/<sup>2</sup>H][1-<sup>14</sup>C]-L-Tyr



# SYNTEZA [3R-<sup>3</sup>H][1-<sup>14</sup>C]-L-Tyr



## PODSUMOWANIE

Niektóre, znakowane związki przejściowe (L-Phe, kwas cynamonowy) otrzymano wg procedur opisanych wcześniej [4,5]. Produkty końcowe wydzielano i oczyszczano za pomocą chromatografii kolumnowej i TLC. Czystość otrzymanych aminokwasów sprawdzano metodami enzymatycznymi i TLC. Wydajność radiochemiczną ustalano mierząc aktywność preparatów licznikiem z ciekłym scyntylatorem. Wydajność chemiczną ustalano metodami enzymatycznymi i spektroskopowymi.

W dalszym ciągu kontynuujemy pracę nad syntezą innych izotopomerów L-Tyr, a szczególnie znakowanych izotopem  $^{14}\text{C}$  w różnych pozycjach łańcucha bocznego.

## LITERATURA

- 1.F. Cook (editor), *Enzyme Mechanism from Isotope Effects*, CRS, Boca Raton, Ann Harbor, Boston, London, 1991.
- 2.W. P. Huskey, R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 5704 (1983).
- 3.W. H. Saunders, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 164 (1985).
- 4.J. Jemielity, M. Kańska, R. Kański, *Isotopes Environ. Health Stud.* **34**, 335 (1998).
5. J. Bukowski, J. Szul, R. Kański, M. Kańska, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **243**, 635 (2000).