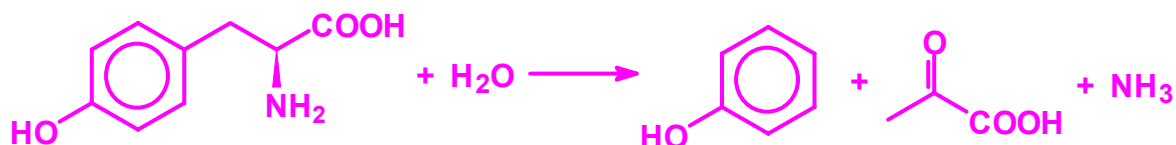


WSTĘP

Enzym fenololiza tyrozynowa (*TPL*, *E.C. 4.1.99.2.*) katalizuje reakcję rozkładu L-tyrozyny do fenolu, pirogronianu i amoniaku.

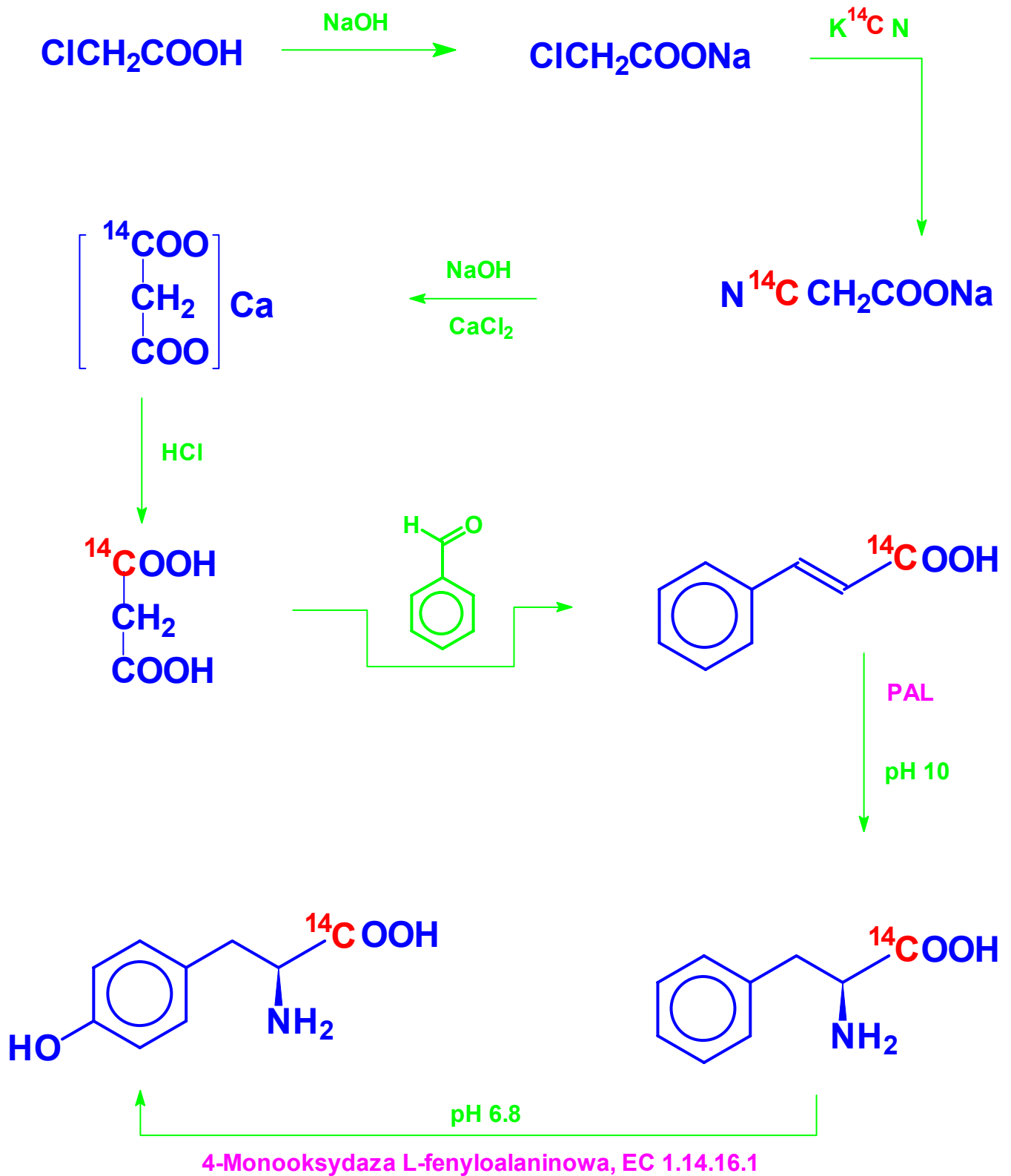


Substratem tej reakcji mogą być różne pochodne tyrozyny, jak też D-tyrozyna. Enzym ten katalizuje z niewielką wydajnością reakcje syntezy analogów tyrozyny z pochodnych fenolu i pirogronianu, seryny lub cysteiny. TPL katalizuje także racemizację niektórych aminokwasów [1].

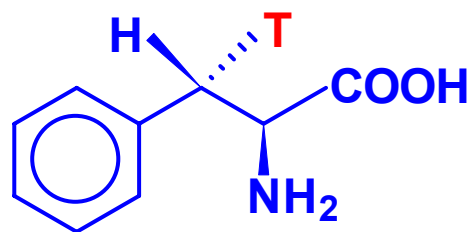
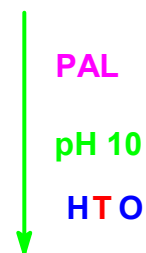
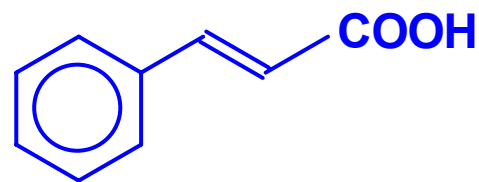
Mechanizm działania TPL (schemat obok) był już badany za pomocą spektroskopii [2-8]. Celem prezentowanych badań jest bardziej dokładne poznanie tego procesu poprzez pomiar kinetycznych efektów izotopowych (**KIE**) $^1\text{H}/^3\text{H}$ używając metody kompetycyjnej z wewnętrznym standardem ^{14}C .

W związku z tym należało otrzymać odpowiednie izotopomery L-tyrozyny *selektywnie znakowane* ^{14}C i ^3H , a następnie wyznaczyć wartości **KIE**.

SYNTEZA [1-¹⁴C]-L-Tyr

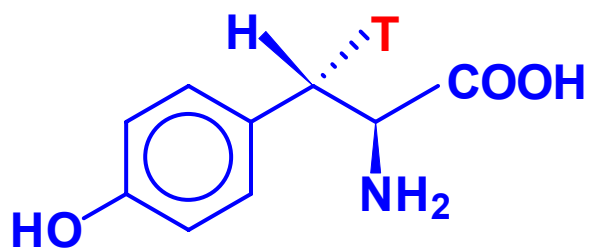


SYNTEZA [3S-³H₁]-L-Tyr

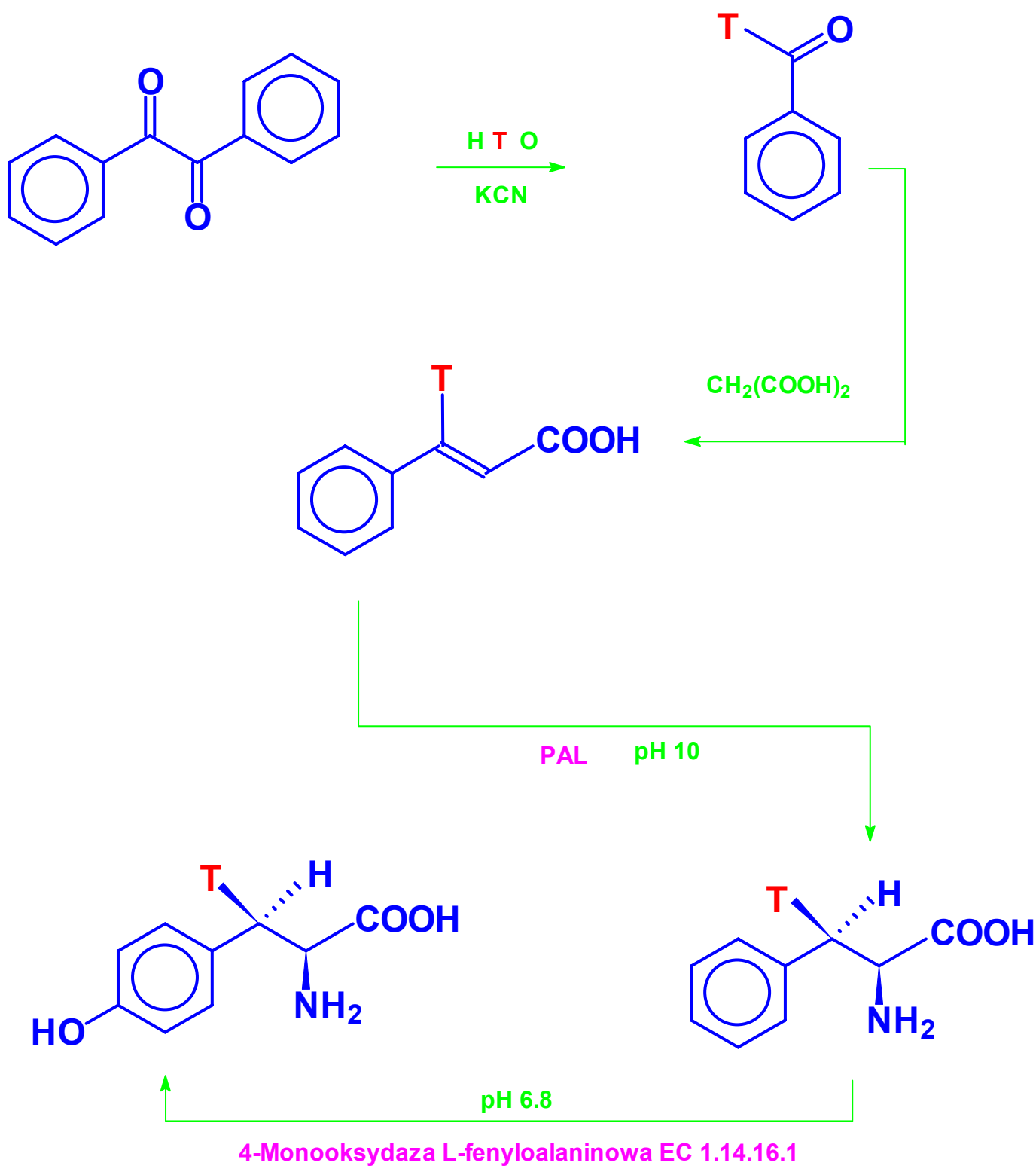


pH 6.8

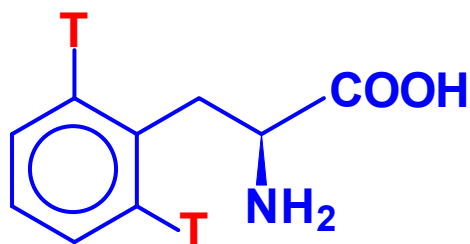
4-Monooksydaza L-fenylalaninowa EC 1.14.16.1



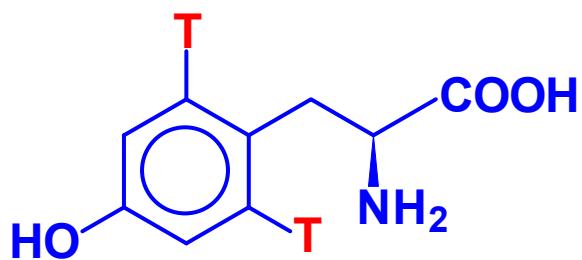
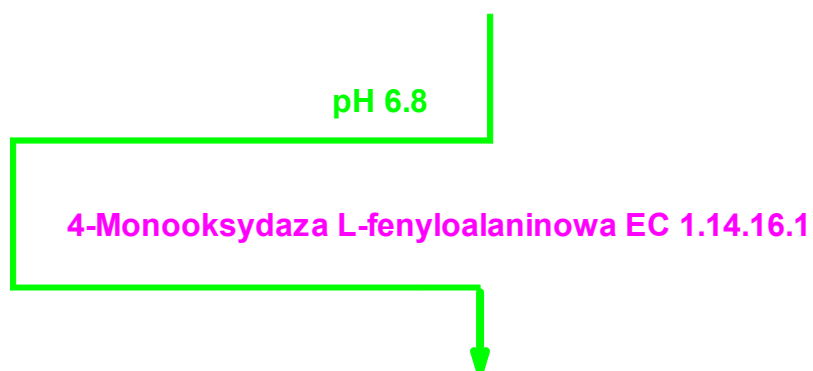
SYNTEZA [3R-³H₁]-L-Tyr



SYNTEZA [2',6'-³H₂]-L-Tyr

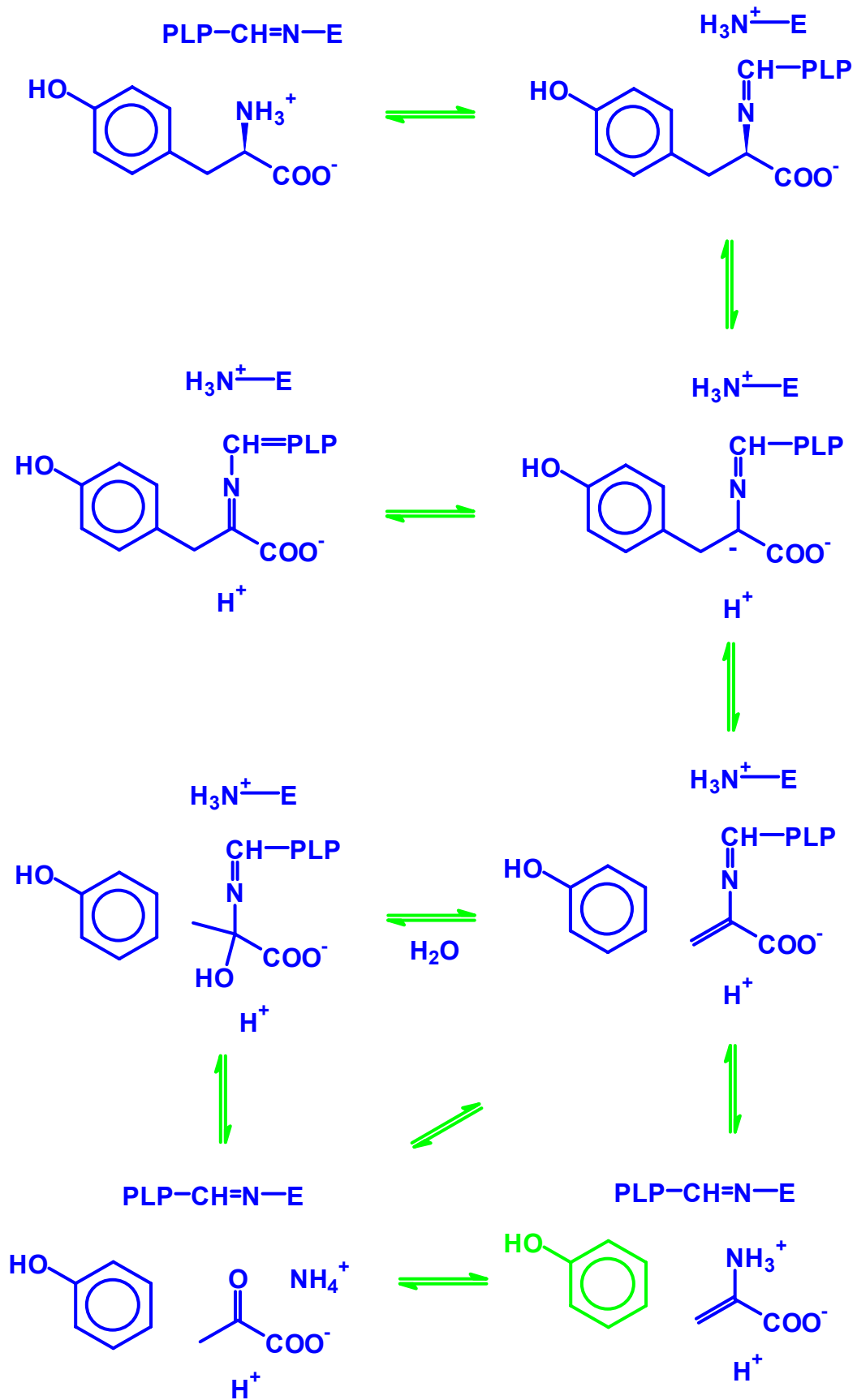


[2',6'-³H₂]-L-Phe

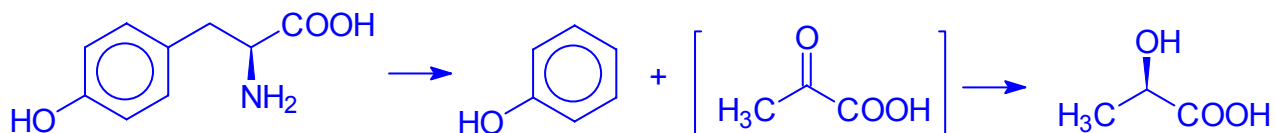


[2',6'-³H₂]-L-Tyr

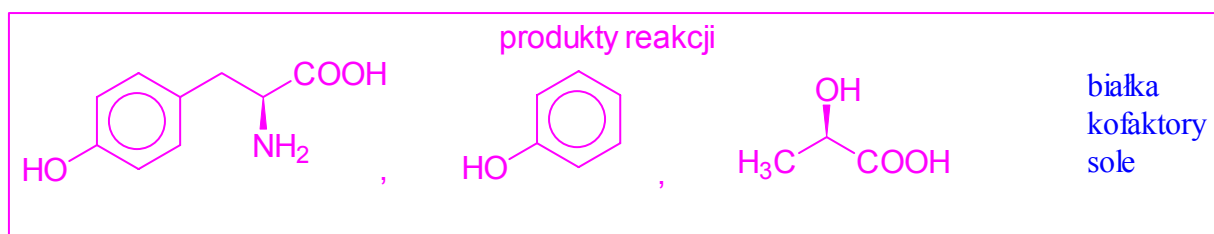
MECHANIZM DZIAŁANIA β -TYROZYNAZY



WYDZIELANIE PRODUKTÓW Z MIESZANINY POREAKCYJNEJ



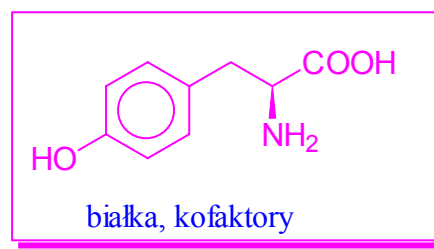
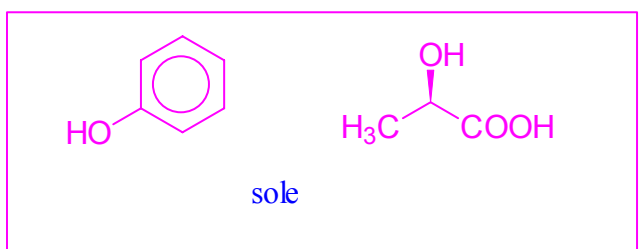
HCl, temp.



AMBERLIT IR-120 (H⁺)

1. H₂O

2. 0,3M NH₃



POMIAR RADIOMETRYCZNY, LSC

WYZNACZONE WARTOŚCI $^1\text{H}/^3\text{H}$ KIE W REAKCJI KATALIZOWANEJ PRZEZ β -TYROZYNAZĘ

Tablica 1. $^1\text{H}/^3\text{H}$ KIE, $k/^{3S}k$, dla $[1-^{14}\text{C}, 3S-^3\text{H}]$ -L-tyrozyny

Frakcja reakcji f	$k/^{3S}k$ obliczony z:			
	R_0, R_r, R_p	R_0, R_r, f	R_0, R_p, f	R_r, R_p, f
0,2524	0,9772	1,0001	0,9903	0,9417
0,3464	0,9512	0,9791	0,9626	0,9736
0,4008	0,9669	0,9700	1,0071	0,9725
0,4449	-	0,9756	1,0138	0,9427
Śr. $k/^{3S}k$	0,9651 ± 0,0131	0,9756 ± 0,0196	0,9903 ± 0,0228	0,9576 ± 0,0178

Tablica 2. $^1\text{H}/^3\text{H}$ KIE, $k/(^{2',6'})k$, dla $[1-^{14}\text{C}, 2',6'-^3\text{H}_2]$ -L-Tyr.

Frakcja reakcji f	$k/(^{2',6'})k$ obliczony z:
	R_0, R_p, f
0,1034	1,0066
0,1359	1,0100
0,1936	1,0023
0,2554	1,0213
Śr. $k/(^{2',6'})k$	1,0103 ± 0,0070

LITERATURA

1. Nagasawa, T., Utagawa, T., Goto, J., Kim, C. J., Tani, Y., Kumagai, H., Yamada, H., *Eur. J. Biochem.*, 33-40, **117**, 1981.
2. Palcic, M. M., Shen, S. J., Schleicher, H., Kumagai, H., Sawada, S., Yamada, H., Floss, H. G., *Z. Naturforsch.*, 307-318, **42c**, 1987.
3. Chen, H.; Phillips, R. S.; *Biochemistry*, 11591-11599, **32**, 1993.
4. Chen, H.; Gollnick, P.; Phillips, R. S.; *Eur. J. Biochem.*, 540-549, **229**, 1995.
5. Phillips, R. S.; von Tersch, R. L.; Secundo, F.; *Eur. J. Biochem.*, 658-663, **244**, 1997.
6. Bazhulina, N. P.; Morozov, Y. V.; Papisova, A. I.; Demidkina, T. V.; *Eur. J. Biochem.*, 1830-1836, **267**, 2000.
7. Faleev, N. G.; Zhukov, Y. N.; Khurs, E. N.; Gogoleva, O. I.; Barbolina, M. V.; Bazhulina, N. P.; Belikov, V. M.; Demidkina, T. V.; Khomutov, R. M.; *Eur. J. Biochem.*, 6897-6902, **267**, 2000.
8. Sundararaju, B.; Chen, H.; Shilcutt, S.; Phillips, R. S.; *Biochemistry*, 8546-8555, **39**, 2000.