

Wpływ inhibitorów na wartości kinetycznych efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez enzym fenololiazę tyrozynową

Wojciech Augustyniak, Marianna Kańska

Pracownia Peptydów, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

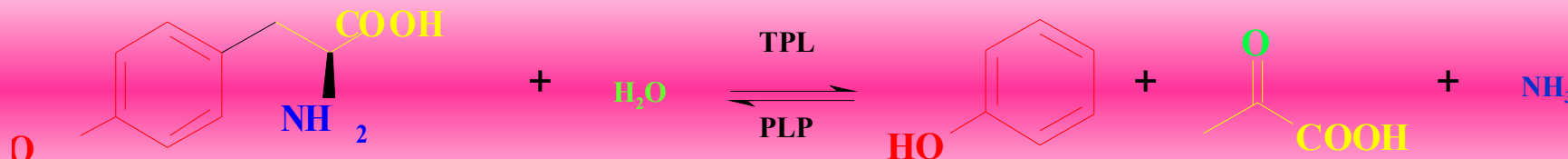


IV Krajowa Konferencja „Radiochemia i Chemia Jądrowa”
Kraków – Przegorzaty, 9-11 maja 2005

Plan wystąpienia

1. Wstęp:
 - ogólna charakterystyka fenololizazy tyrozynowej
 - mechanizm działania enzymu
2. Metody wyznaczania KIE w badanej reakcji za pomocą metody konkurencyjnej (radiochemia) i niekonkurencyjnej (pomiar kinetyki)
3. Wyniki badań nad wpływem rozpuszczalnika (H_2O vs D_2O), inhibitorów (fenol, L-fenylalanina, S-metylo-L-cysteina) i kwasu Lewisa (AlCl_3) na wartości kinetycznych efektów izotopowych w enzymatycznym rozkładzie tyrozyny
4. Podsumowanie i dyskusja wyników w kontekście mechanizmu reakcji katalizowanej przez fenololizazę tyrozynową

Fenololiza tyrozynowa

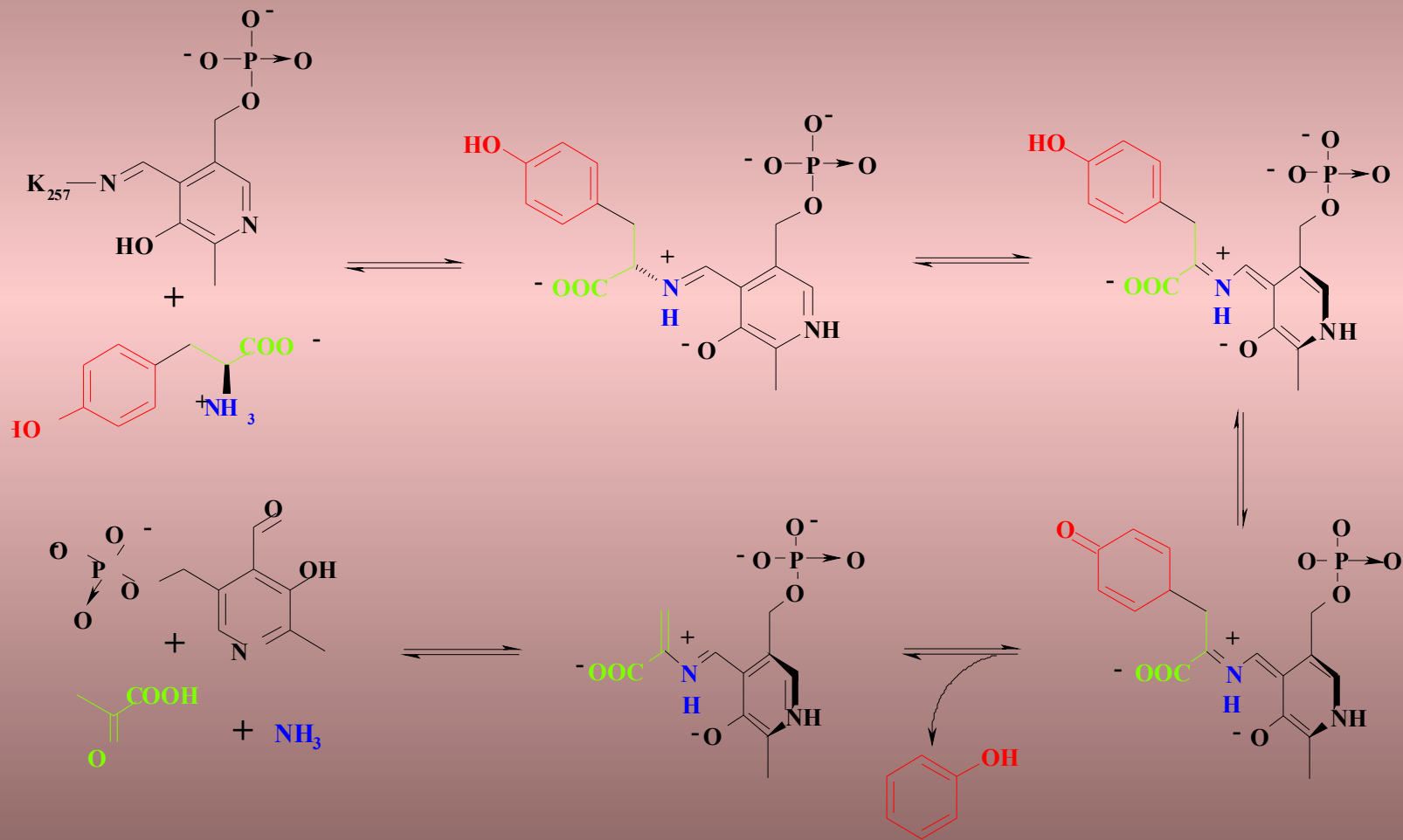


- podczas reakcji ulega rozerwaniu wiązanie pomiędzy alifatycznym i aromatycznym atomem węgla
- proton z pozycji α jest częściowo przenoszony na atom węgla 1' reszty aromatycznej
- katalizuje także reakcję syntezy L-tyrozyny z pochodnych fenolu i pirogronianu, racemizację alaniny, wymianę atomu wodoru α w kilku L-aminokwasach oraz deaminację atomu węgla α
- do aktywności katalitycznej konieczne są kationy jednowartościowe (K⁺, Rb⁺, Cs⁺ lub NH₄⁺); jony Na⁺ i Li⁺ to inhibitory TPL

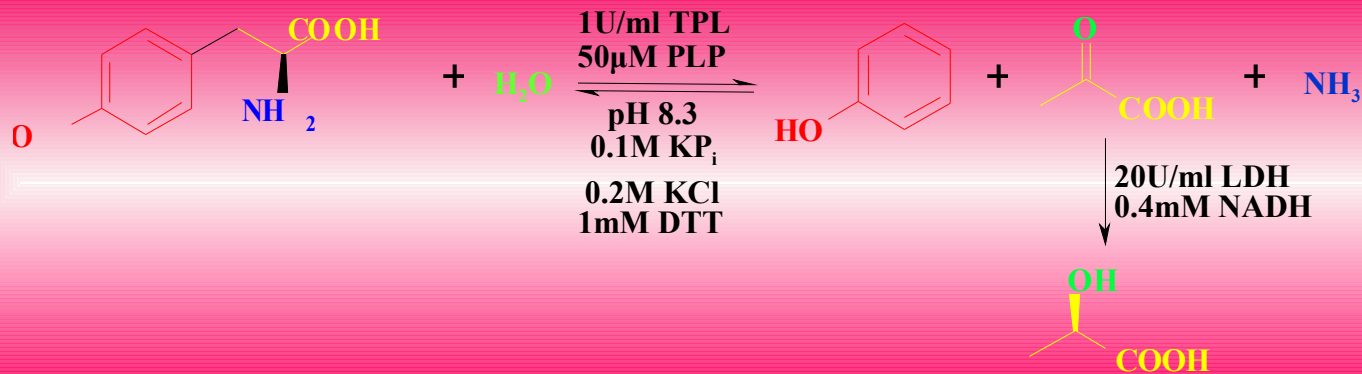
Fenololiza tyrozynowa

- **inaczej:** β -tyrozynaza, TPL, E.C. 4.1.99.2
- **występowanie:** Gram-ujemne
Enterobacteriaceae i niektóre stawonogi
- **budowa:** białko α/β
wymiary 135Å x 60Å x 144Å
4 podjednostki po 51kDa
znana struktura krystalograficzna
- **zastosowanie:**
biotechnologiczne otrzymywanie dopy
oznaczanie PLP w materiale biologicznym
utylizacja odpadów fenolowych

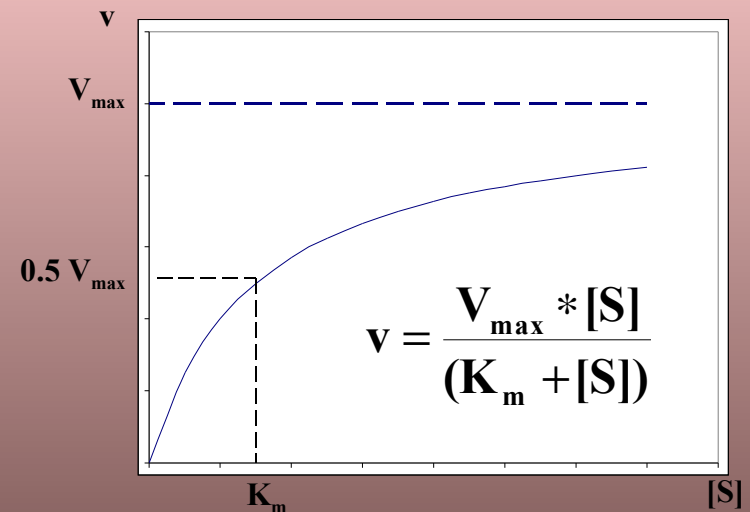
Mechanizm działania TPL



Wyznaczanie KIE metodą niekonkurencyjną



- Dodatek NADH i dużego nadmiaru LDH czyni reakcję nieodwracalną i umożliwia bezpośredni pomiar kinetyki poprzez spektrofotometryczny pomiar spadku absorpcji przy 340nm
- Pomiar szybkości reakcji dla różnych stężeń L-tyrozyny umożliwia wyznaczenie V_{\max} i K_m z równania Michaelisa-Menten



Wyznaczanie KIE metodą konkurencyjną

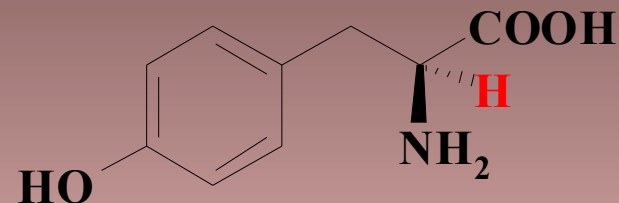


- Po rozdziale produktów i substratów za pomocą chromatografii jonowymiennej wyznaczano radioaktywność właściwą wyjściowych substratów (R_0), produktów (R_p) i stopień konwersji (f); KIE obliczano używając równanie Yankwicha-Tonga:

$$\alpha = \frac{\ln\left(1 - f \cdot \frac{R_0}{R_p}\right)}{\ln(1 - f)}$$

- Metoda podwójnego znakowania, $1-^{14}C$ jako standard wewnętrzny
- NADH i LDH przekształcają nietrwały pirogronian w trwały L-mleczan

Efekty izotopowe w pozycji 2



Kinetyczny efekt izotopowy H/D

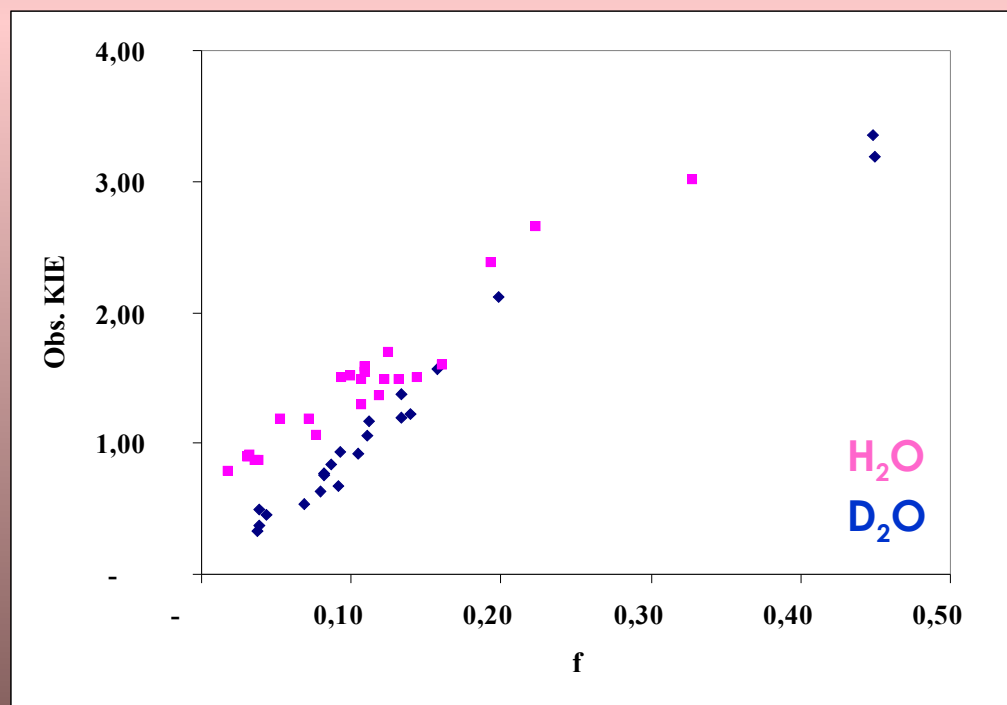
	α_V	$\alpha_{V/K}$
H ₂ O	3.34 ± 0.25	2.42 ± 0.29
D ₂ O	3.28 ± 0.13	2.24 ± 0.61

- Atom wodoru α i cząsteczka wody biorą udział w tym samym stanie przejściowym
- Oderwanie protonu α ma większe znaczenie dla szybkości reakcji, niż jego następcza wymiana z rozpuszczalnikiem

Rozpuszczalnikowy efekt izotopowy H/D

	α_V	$\alpha_{V/K}$
L-tyrozyna	1.49 ± 0.06	1.81 ± 0.25
[2- ² H]-L-tyrozyna	1.46 ± 0.11	1.67 ± 0.31

Obserwowany kinetyczny efekt izotopowy H/T



Badania NMR

¹H-NMR

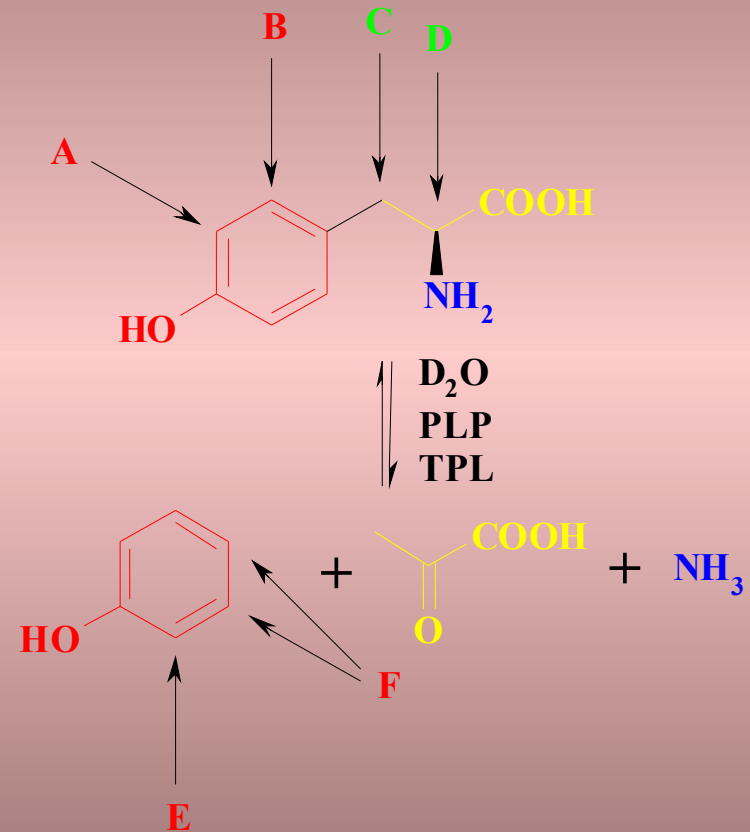
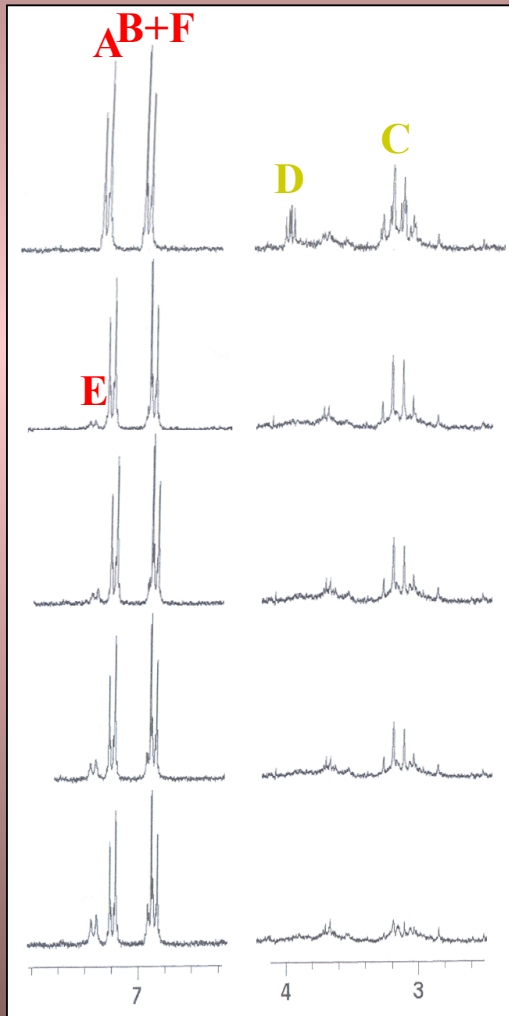
start

15'

45'

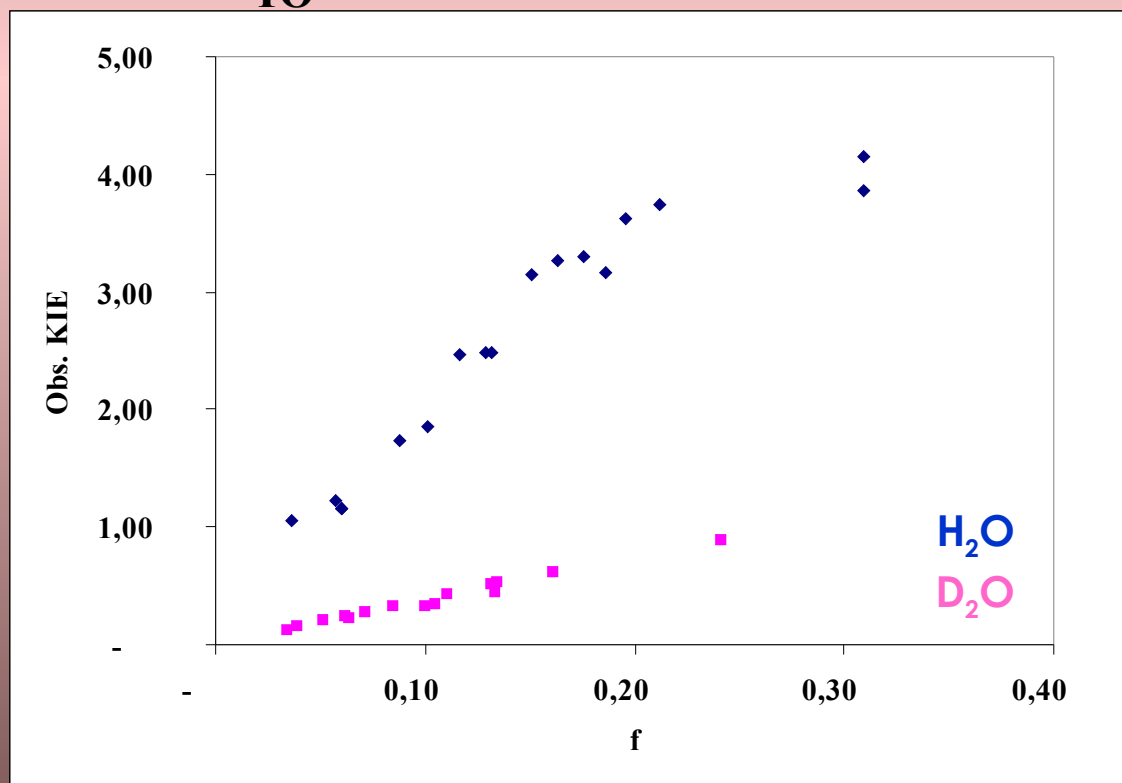
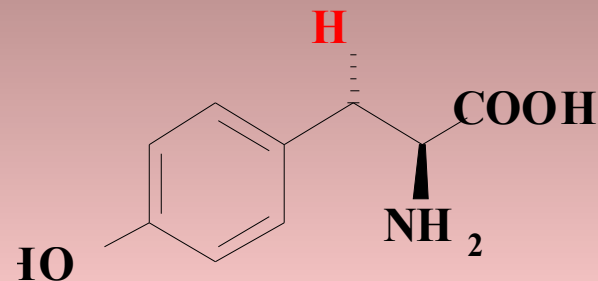
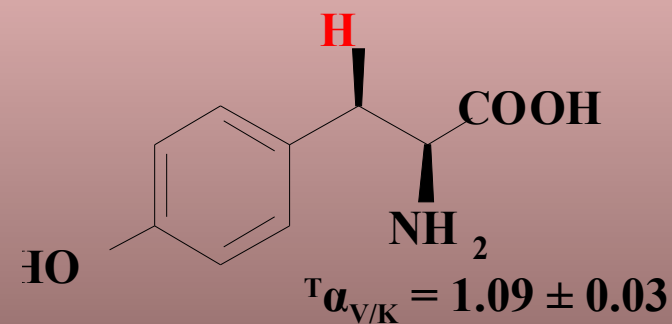
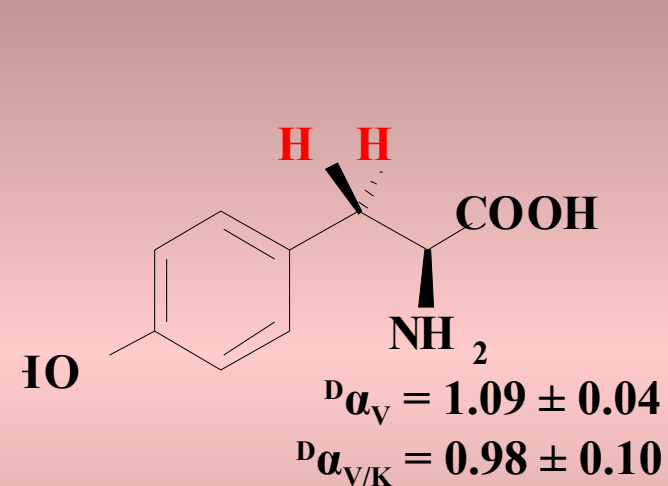
90'

180'

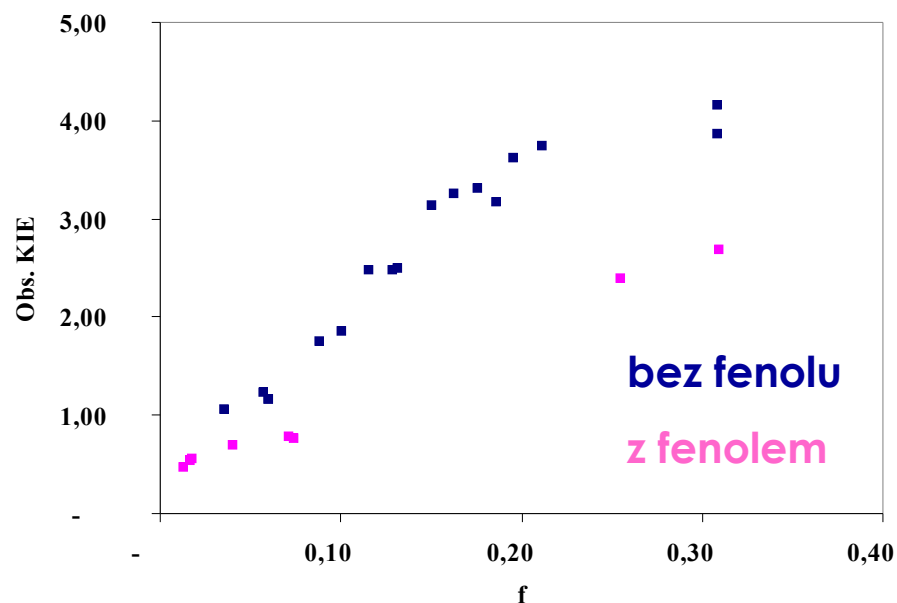
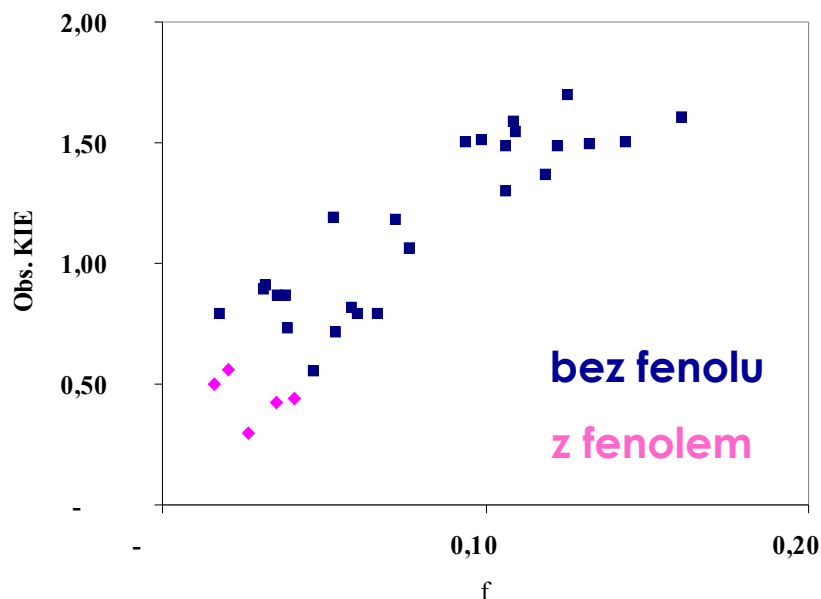
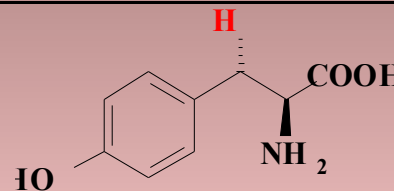
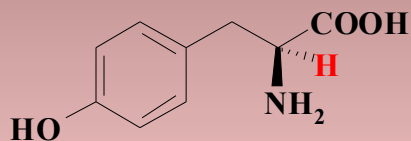


□ Wymiana protonów w pozycji 3 nie zachodzi w widoczny sposób po dodaniu do układu dehydrogenazy mleczanowej i LDH

Efekty izotopowe w pozycji 3



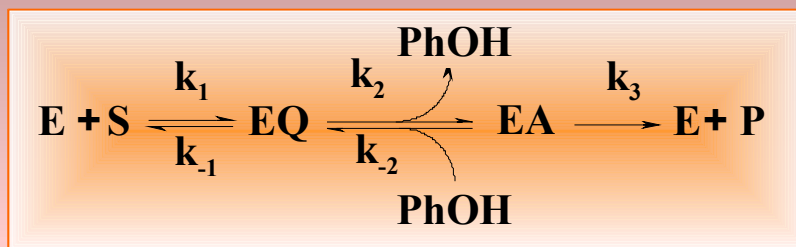
Wpływ produktów reakcji na KIE H/T



- Obserwowany KIE H/T w pozycjach 2 i 3S nie zależy od obecności:
- pozostałych produktów reakcji (kwas pirogronowy, amoniak)
 - produktu ubocznego reakcji (kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy)

Stałe inhibicji fenolem

	$K_i (V_{max})$ [μM]	$K_i (V_{max}/K_m)$ [μM]
L-tyrozyna	67 ± 6	64 ± 8
[2- ^2H]-L-tyrozyna	131 ± 13	83 ± 7
[3- $^2\text{H}_2$]-L-tyrozyna	97 ± 6	59 ± 6



V_{max}

V_{max}/K_m

Szybkości reakcji:

$$V_{max} = \frac{k_3 * k_2 * [E]}{k_2 + k_3 + k_{-2} * [\text{PhOH}]}$$

$$V_{max} / K_m = \frac{k_3 * k_2 * k_1 * [E]}{k_3 * k_2 + k_3 * k_{-1} + k_{-1} * k_{-2} * [\text{PhOH}]}$$

Początkowe szybkości reakcji:

$$V_{max} = \frac{k_2 * k_3 * [E]}{k_2 + k_3}$$

$$V_{max} / K_m = \frac{k_2 * k_1 * [E]}{k_2 + k_{-1}}$$

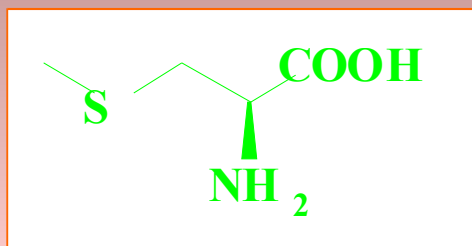
Stałe inhibicji:

$$K_i(V_{max}) = \frac{k_2 + k_3}{k_{-2}}$$

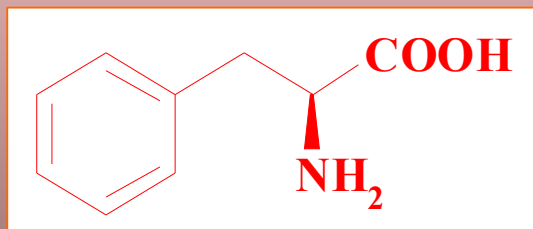
$$K_i(V_{max}/K_m) = \frac{k_3 * (k_2 + k_{-1})}{k_{-2} * k_{-1}}$$

$$\frac{V}{V_i} = 1 + \frac{[\text{PhOH}]}{K_i}$$

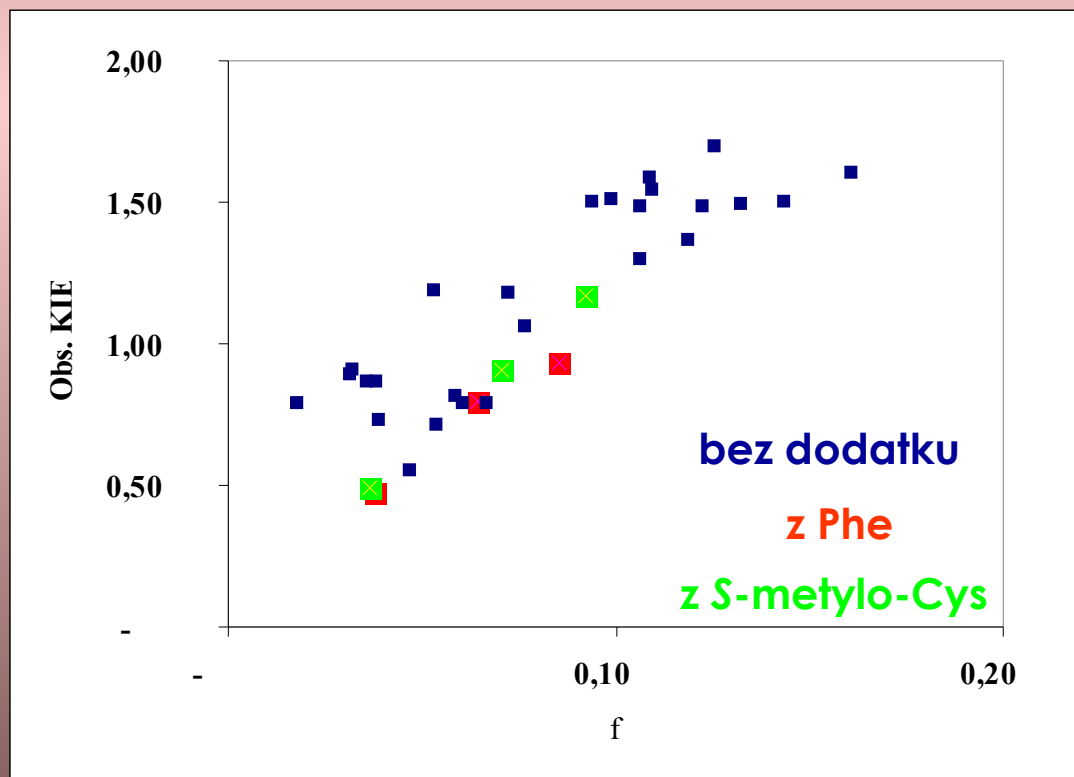
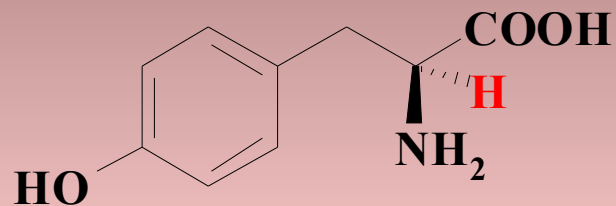
Wpływ aminokwasów na KIE H/T w pozycji 2



- Ulega α -deprotonacji
- Ulega β -eliminacji

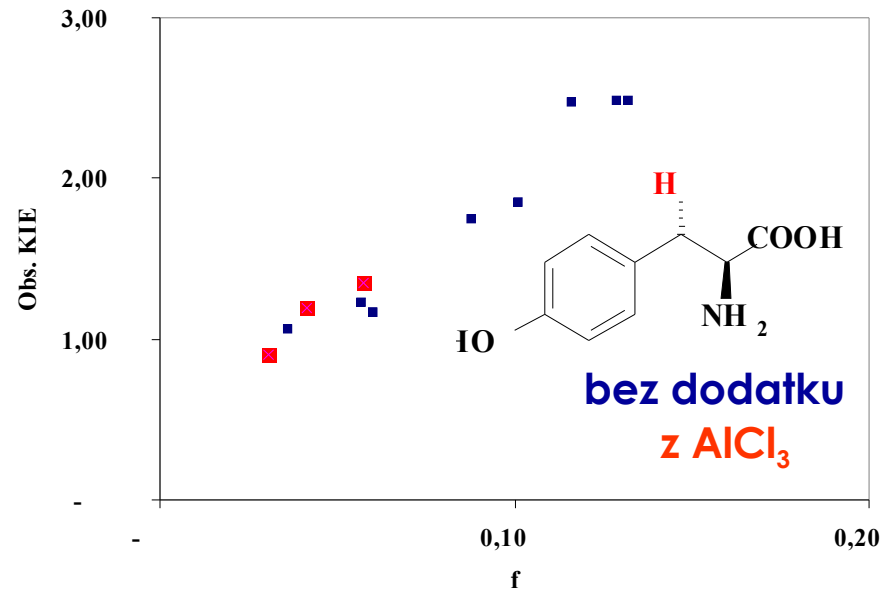
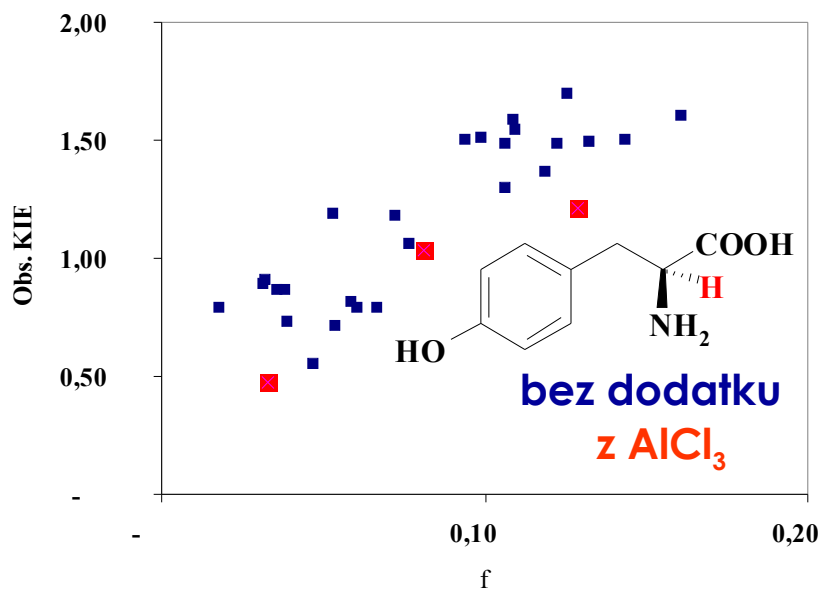


- Ulega α -deprotonacji
- Nie ulega β -eliminacji



Wpływ kwasów Lewisa na wartości KIE H/T

Kwasy Lewisa przyspieszają tworzenie zasady Schiffa pomiędzy tyrozyną a PLP w roztworze



□ Pomiar parametrów kinetycznych reakcji w obecności Al³⁺ okazał się niemożliwy. Początkowo reakcja biegnie z szybkością zbliżoną do procesu bez dodatku soli glinu. Później następuje maksymalnie 2.5-krotne spowolnienie procesu (przy 2mM AlCl₃), prawdopodobnie wskutek wytworzenia się zasady Schiffa.

Podsumowanie

Reakcja hydrolytycznego rozkładu tyrozyny katalizowana przez fenololiazę tyrozynową:

- ❑ zachodzi z wymianą protonów α i β z wodą
- ❑ biegnie przez etapy których względne szybkości zmieniają się w miarę trwania procesu; np. szybkość oderwania α - i β -protonów maleje drastycznie w trakcie reakcji
- ❑ jest reakcją w której podstawienie protonów wody deuteronami nie powoduje dużej zmiany względnej szybkości deprotonacji względem eliminacji fenolu na atomie węgla α . Odmienna sytuacja ma miejsce podczas deprotonacji w pozycji β , gdzie woda deuterowana zdecydowanie bardziej promuje proces deprotonacji niż to ma miejsce dla zwykłej wody
- ❑ różnicuje diastereotopowe atomy wodoru w pozycji β , które zachowują się odmiennie podczas całego procesu
- ❑ jest reakcją w której zmiany względnych szybkości poszczególnych etapów nie są powodowane pojawianiem się produktów oddysocjujących od enzymu
- ❑ może być warunkowana tworzącym się przejściowo podczas reakcji α -aminoakrylanem związanym z PLP
- ❑ zachodzi wolniej w obecności kwasów Lewisa, ale względne szybkości poszczególnych etapów pozostają bez istotnych zmian w obecności takich kwasów

Podziękowania

- ❑ dla dra Ryszarda Kańskiego (Pracownia Radiochemii na Wydziale Chemii UW) – za umożliwienie wykonania eksperymentów radiochemicznych i pomoc w ich realizacji
- ❑ dla prof. Roberta Phillipsa (University of Georgia, Athens, USA) – za dostarczenie TPL i cenne dyskusje
- ❑ dla koleżanek z zespołu – za tworzenie dobrej atmosfery w grupie
- ❑ dla organizatorów IV Krajowej Konferencji „Radiochemia i Chemia Jądrowa” – za umożliwienie nam zaprezentowania wyników badań

Dziękuję za uwagę!