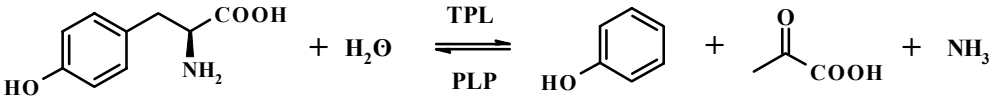
Streszczenie rozprawy doktorskiej mgra Wojciecha Augustyniaka

„SYNTEZY IZOTOPOMERÓW L-TYROZYNY I ICH WYKORZYSTANIE DO BADANIA MECHANIZMU DZIAŁANIA β-TYROZYNAZY”

Enzym β-tyrozynaza (inaczej fenololiaza tyrozynowa, TPL) katalizuje odwracalny hydrolityczny rozkład L-tyrozyny. Kofaktorem jest fosforan 5’-pirydoksalu (PLP).



Enzym jest ciekawym obiektem badań mechanistycznych, gdyż w wyniku jego działania rozrywane jest wiązanie pomiędzy alifatycznym i aromatycznym atomem węgla, co jest wyjątkowe w układach biologicznych. Dodatkowo proton z pozycji α jest częściowo przenoszony na atom węgla 4 powstającego fenolu.

Mechanizm reakcji nie jest dobrze poznany, brakowało np. systematycznych danych dotyczących kinetycznych efektów izotopowych (KIE) w badanej reakcji. W ramach swojej pracy postanowiłem wyznaczyć KIE wodoru (zarówno $^{1}H/^{2}H$, jak i $^{1}H/^{3}H$) i węgla ($^{12}C/^{14}C$). Aby wykonać takie badania musiałem najpierw otrzymać odpowiednio znakowane izotopomery i izotopologi L-tyrozyny.

Stosując kombinowane metody chemiczne i enzymatyczne otrzymałem izotopomery L-tyrozyny znakowane węglem ^{14}C w grupie karboksylowej, w pozycji α, w pozycji β, oraz w pozycji 1’ pierścienia aromatycznego. Jako źródła izotopu używałem handlowo dostępnego $K^{14}CN$.

Uzyskałem także izotopomery L-tyrozyny znakowane selektywnie deuterem w pozycjach α i β (selektywnie zarówno w pozycji 3*S* i 3*R*). Oprócz tego otrzymałem izotopologi tych związków znakowane trytem w pozycjach α, β (również selektywnie w pozycji 3*S* i 3*R*) i 2’,6’ pierścienia aromatycznego. Jako źródło znacznika wykorzystałem odpowiednio wodę deuterowaną lub trytową.

Większość uzyskanych przeze mnie znakowanych L-tyrozyn została uzyskana po raz pierwszy. Również w dużej większości przypadków użyłem nowatorskich metod syntetycznych.

Otrzymane pochodne użyłem do wyznaczenia KIE w reakcji katalizowanej przez TPL z *Citrobacter freundii*. KIE deuteru ($^{1}H/^{2}H$) wyznaczałem metodą niekonkurencyjną. Wyznaczyłem KIE deuteru na szybkość maksymalną (V) i na stosunek szybkości maksymalnej do stałej Michaelisa (V/K) w pozycjach wodoru α-H, β-H_2 (także w obecności fenolu), 2’,6’-H_2 i 3’,5’-H_2 L-tyrozyny. Oprócz tego wyznaczyłem rozpuszczalnikowe efekty izotopowe deuteru w badanej reakcji z L-tyrozyną i z [2-^{2}H]-L-tyrozyną.

KIE trytu ($^{1}H/^{3}H$) wyznaczyłem metodą konkurencyjną stosując metodę podwójnego znakowania. Jako standard wewnętrzny stosowałem ^{14}C w grupie karboksylowej. Wyznaczyłem KIE trytu na wartość V/K w pozycjach α-H, β*R*-H, β*S*-H , 2’,6’-H_2 i 3’,5’-H_2 L-tyrozyny.

Dodatkowo wyznaczyłem KIE węgla ($^{12}C/^{14}C$) również stosując metodę konkurencyjną. Jako standardu wewnętrznego używałem trytu w pozycji 3’,5’. Wyznaczyłem KIE węgla na wartość V/K w pozycjach α-C, β-C i 1’-C L-tyrozyny.

Przeprowadzone pomiary pozwoliły mi na odkrycie nieznanych wcześniej zjawisk w badanej reakcji. Stwierdziłem niezależność KIE deuteru w pozycji α i efektu rozpuszczalnikowego, co świadczy o zaangażowaniu protonu α i protonów z wody w tym samym stanie przejściowym reakcji. Wykryłem względne zmiany szybkości reakcji cząstkowych składających się na katalizę, oraz zaobserwowałem szybkie odrywanie protonu w pozycji α jedynie na początku procesu katalitycznego. Odkryłem rosnące znaczenie etapu odrywania protonu z pozycji β*S* w końcowych etapach reakcji. Zauważyłem dużą różnicę w znaczeniu obydwu prochiralnych atomów wodoru w pozycji β. Stwierdziłem, że atomy wodoru w pozycji 3’,5’ mają duże znaczenie podczas końcowych etapów reakcji.

Reasumując udało mi się osiągnąć cele postawione podczas realizacji pracy. Moje badania pozwoliły na wysnucie ciekawych obserwacji i wniosków w badanej reakcji rozkładu L-tyrozyny katalizowanego przez fenololiazę tyrozynową.