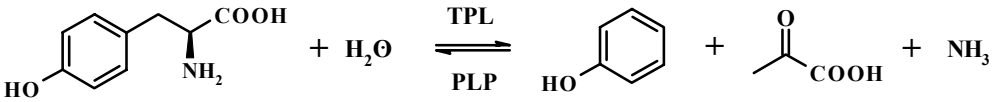
Autoreferat rozprawy doktorskiej mgra Wojciecha Augustyniaka

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

Enzym β-tyrozynaza (inaczej fenololiaza tyrozynowa, TPL; E.C. 4.1.99.2.) występuje głównie w Gram-ujemnych szczepach *Enterobacteriaceae*. Enzym katalizuje odwracalny hydrolityczny rozkład L-tyrozyny. Kofaktorem jest fosforan 5’-pirydoksalu (Schemat 1).



Schemat 1. Reakcja katalizowana przez TPL

TPL katalizuje także rozkład różnych pochodnych aminokwasowych zawierających odpowiednią grupę opuszczającą w pozycji β (np. pochodne L-seryny i L-cysteiny); fenololiaza tyrozynowa ma też aktywność racemazy alaninowej.

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, brakuje 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 (odpowiednio a, b, c oraz d na schemacie 2). Jako źródła izotopu używałem handlowo dostępnego $K^{14}CN$.

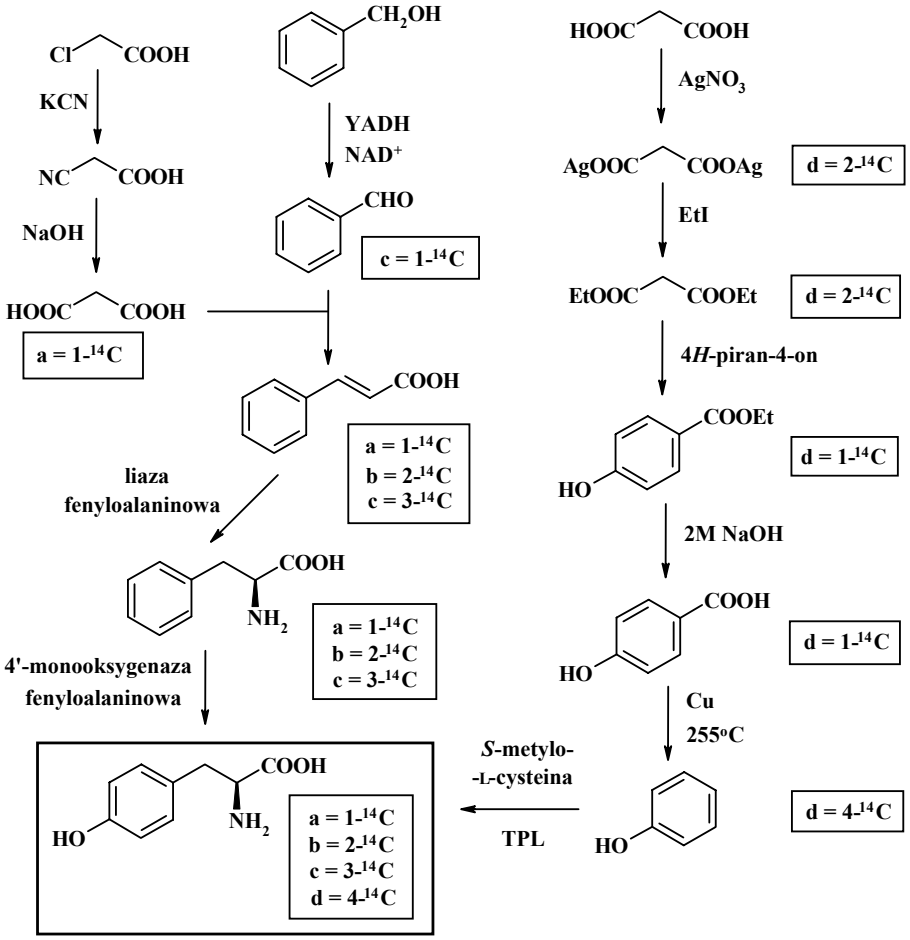
Uzyskałem także izotopomery L-tyrozyny znakowane selektywnie deuterem w pozycjach α i β w pozycji 3*R* i 3*S* (odpowiednio e, g oraz i na schemacie 3). Oprócz tego otrzymałem izotopologi tych związków znakowane trytem w pozycjach α, β (również selektywnie w pozycji 3*R* i 3*S*) i 2’,6’ pierścienia aromatycznego (odpowiednio f/f’, h, j/k oraz l/l’ na schemacie 3). Jako źródło znacznika wykorzystałem odpowiednio wodę deuterowaną lub trytową.

Większość uzyskanych przeze mnie znakowanych izotopomerów i izotopologów L-tyrozyny 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 poprzez pomiar parametrów kinetycznych reakcji. W pomiarach wykorzystałem możliwość sprzężenia reakcji z enzymatyczną redukcją kwasu pirogronowego, w wyniku której utlenianiu ulega NADH, co umożliwia spektrofotometryczny pomiar kinetyki reakcji. 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 za pomocą pomiarów radioaktywności właściwej produktów i substratów reakcji stosując metodę podwójnego znakowania. Jako standard

wewnętrzny (substytut ilości związku) stosowałem ^{14}C w grupie karboksylowej. Do rozdzielenia produktów reakcji od substratów używałem chromatografii jonowymiennej. Wyznaczyłem KIE trytu na wielkość V/K w pozycjach α-H, β*R*-H, β*S*-H , 2',6'-H_2 i 3',5'-H_2 L-tyrozyny.

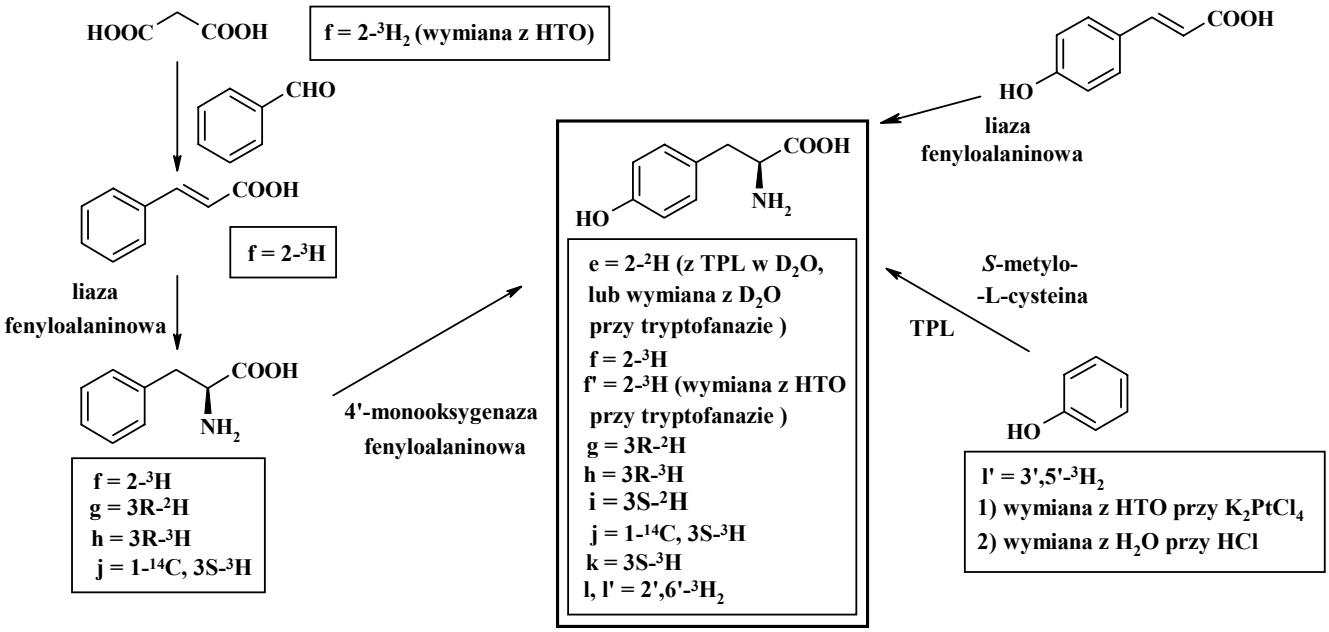


Schemat 2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej ^{14}C

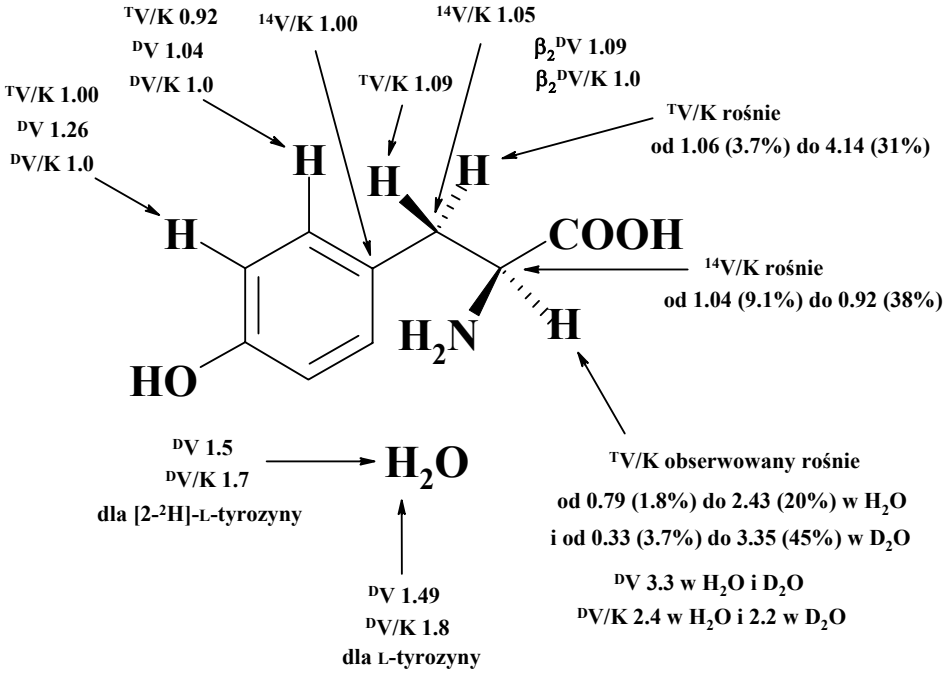
Dodatkowo wyznaczyłem KIE węgla ($^{12}C/^{14}C$) również stosując metodę konkurencyjną. Jako standardu wewnętrznego używałem trytu w pozycji 3',5'. Wyznaczyłem KIE węgla na wielkość V/K w pozycjach α-C, β-C i 1'-C L-tyrozyny. Wielkości wyznaczonych KIE przedstawiłem na schemacie 4.

Przeprowadzone pomiary pozwoliły mi na odkrycie nieznanych wcześniej zjawisk w badanej reakcji. Stwierdziłem niezależność KIE deuteru w pozycji α i efektu rozpuszczalnikowego od siebie, 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, co objawiało się wzrostem obserwowanego KIE w pozycjach α-H, β*S*-H i α-C L-tyrozyny. 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, co powoduje różne wartości KIE dla wspomnianych atomów. Porównując KIE deuteru na wielkości V i V/K w pozycji 3',5' stwierdziłem, że atomy wodoru w tej pozycji mają prawdopodobnie duże znaczenie podczas końcowych etapów reakcji, np. podczas oddysocjowania fenolu. Na podstawie własnych obserwacji zaproponowałem model kinetyczny reakcji.

Reasumując, udało mi się osiągnąć zamierzone cele. Moje badania pozwoliły na wykonanie interesujących obserwacji i wysnucie ciekawych wniosków w badanej reakcji rozkładu L-tyrozyny katalizowanego przez fenololiazę tyrozynową.



Schemat 3. Synteza L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru



Schemat 4. Wyznaczone wielkości KIE w reakcji rozkładu tyrozyny katalizowanej przez TPL