Wojciech Augustyniak

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

Rozprawa doktorska
przedstawiona Radzie Wydziału Chemii
Uniwersytetu Warszawskiego
w roku akademickim 2003/2004

Promotor: **dr hab. Marianna Kańska**

Warszawa, 2004

Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi,
pani ***dr hab. Mariannie Kańskiej****,*
za zaproponowanie tematu badań,
opiekę nad moją pracą, cenne dyskusje,
wielką pomoc organizacyjną,
oraz za cierpliwość podczas wykonywania pracy.

Równie serdecznie dziękuję panu
drowi Ryszardowi Kańskiemu
z Pracowni Radiochemii Wydziału Chemii UW
za umożliwienie mi wykonywania eksperymentów ze związkami radioaktywnymi
w swoim laboratorium, oraz pomoc i porady podczas wykonywania pracy.

Jestem ogromnie wdzięczny ***prof. Robertowi Phillipsowi*** *z University of Georgia, Athens, USA, za dostarczenie mi fenololiazy tyrozynowej z Citrobacter freundii i za cenne wskazówki.*

Wyrazy wdzięczności kieruję także do swoich koleżanek i kolegów z naszego zespołu, a szczególnie do ***dra Jacka Jemielity***, ***dra Jarosława Bukowskiego***, ***mgra Piotra Sucheckiego***, ***mgr Elżbiety Borody***, ***mgr Małgorzaty Kozłowskiej***, ***mgr Edyty Panufnik***, *a także do uczestników programu Krajowego Funduszu na rzecz Dzieci:* ***Radosława Lipińskiego***, ***Łukasza Jaremko***, ***Mariusza Jaremko***, ***Joanny Sekuły*** *i* ***Jarosława Prusa*** *za wspólną pracę i tworzenie miłej atmosfery w laboratorium.*

Pragnę również podziękować ***prof. Florisowi Rutjesowi*** *z Departmet of Organic Chemistry, Faculty of Science, University of Nijmegen w Holandii, oraz* ***Christien Schortinghuis*** *i pozostałym członkom grupy prof. Rutjesa za opiekę i pomoc podczas wykonywania eksperymentów z enzymami hydrolizującymi nitryle.*

Dziękuję ***mgr Agnieszce Brzezińskiej*** *(IBD PAN) za pomoc podczas wykonywania autoradiografii i przygotowywania rozprawy, za wielkie wsparcie, wyrozumiałość i przede wszystkim za to, że jest.*

Dziękuję ***dr Aleksandrze Wysłouch-Cieszyńskiej***, ***Lilii Żukowej, mgrowi Jackowi Olędzkiemu*** *(Zakład Biofizyki, IBB PAN) oraz* ***mgr Joannie Żuberek*** *(Zakład Biofizyki, Wydział Fizyki UW) za umożliwienie mi wykonania izolacji enzymów oraz analiz HPLC i MS w swoim zespole. Pragnę także podziękować* ***mgrowi Pawłowi Okulskiemu*** *i* ***mgrowi Grzegorzowi Wronie*** *(IBD PAN) za udostępnienie materiału biologicznego, oraz* ***Marcinowi Nowogródzkiemu*** *za dostarczenie odczynnika.*

Jestem wdzięczny ***prof. Piotrowi Panethowi*** *(Politechnika Łódzka) za cenne uwagi podczas interpretacji wyników.*

Wyrażam wdzięczność dla ***mgra Grzegorza Łacha*** *z Pracowni Chemii Kwantowej Wydziału Chemii UW za pomoc podczas obliczeń programem Matematica.*

Jestem ogromnie wdzięczny wszystkim pozostałym osobom, które nie zostały wymienione w podziękowaniach, ale również pomagały mi podczas pracy.

Składam podziękowanie
dla ***Komitetu Badań Naukowych***
za częściowe finansowanie pracy
z grantu promotorskiego
4 T09A 039 23.

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY 11

1. WSTĘP I CELE PRACY 15

2. PRZEGLĄD LITERATUROWY 18

2.1. ENZYM FENOLOLIAZA TYROZYNOWA 18

2.1.1. Ogólne informacje o fenololiazie tyrozynowej *18*

2.1.1.1. Występowanie, biosynteza i otrzymywanie TPL 18

2.1.1.2. Własności fizyczne białka TPL 19

2.1.1.3. Własności TPL jako biokatalizatora 22

2.1.1.4. Zastosowanie TPL 24

2.1.2. Mechanizm działania fenololiazy tyrozynowej *25*

2.1.2.1. Związanie kofaktora przez enzym *25*

2.1.2.2. Rozpoznanie substratu przez enzym 27

2.1.2.3. Kowalencyjne związanie substratu przez enzym – tworzenie zasady Schiffa PLP-tyrozyna 29

2.1.2.4. Odszczepienie protonu α - tworzenie chinoidowego produktu pośredniego 31

2.1.2.5. Protonowanie atomu węgla 1' – tworzenie cykloheksadienonowego produktu pośredniego 35

2.1.2.6. Eliminacja fenolu 37

2.1.2.7. Przekształcenie adduktu α-aminoakrylan – PLP w produkty 38

2.2. SYNTEZY L-TYROZYNY ZNAKOWANEJ IZOTOPAMI WĘGLA I WODORU 41

2.2.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla *41*

2.2.1.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w grupie karboksylowej 41

2.2.1.1.1. Synteza [1-^{11}C]- i [1-^{13}C]-L-tyrozyny 41

2.2.1.1.2. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny 41

2.2.1.2. Synteza L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pozycji 2 42

2.2.1.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w pozycji 3 43

2.2.1.3.1. Enzymatyczna synteza [3-^{11}C]- i [3-^{13}C]-L-tyrozyny 43

2.2.1.3.2. Synteza [3-^{11}C]-L-tyrozyny za pomocą katalizatora chiralnego 43

2.2.1.3.3. Synteza [3-^{13}C]-L-tyrozyny z użyciem chiralnego oksazinonu 44

2.2.1.4. Synteza L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pozycjach 3',5' i 4' 45

2.2.2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru *46*

2.2.2.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2 46

2.2.2.1.1. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny katalizowana przez fenololiazę tyrozynową 46

2.2.2.1.2. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny ... *46*
2.2.2.2. Synteza L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3 ... 46
2.2.2.2.1. Synteza [3*R*-^{2}H i -^{3}H]-L-tyrozyny ... 46
2.2.2.2.2. Synteza [2,3*R* i *S*-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny ... 47
2.2.2.2.3. Biosynteza [3*R*-^{2}H,^{3}H]-L-tyrozyny ... 49
2.2.2.3. Synteza L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pierścieniu aromatycznym ... 50
2.2.2.3.1. Synteza [2', 3',5',6'-$^{2}H_4$]-L-tyrozyny ... 50
2.2.2.3.2. Synteza [3',5'-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny ... 51
2.2.2.3.3. Synteza [2',6'-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny ... 51
2.3. KINETYCZNE EFEKTY IZOTOPOWE W BADANIACH MECHANIZMÓW REAKCJI ENZYMATYCZNYCH ... 52
2.3.1. Eksperymentalne podejścia do badania kinetycznych efektów izotopowych ... *53*
2.3.1.1. Pomiar kinetycznych efektów izotopowych metodą konkurencyjną ... 53
2.3.1.2. Pomiar kinetycznych efektów izotopowych metodą niekonkurencyjną ... 57
2.3.2. Interpretacja kinetycznych efektów izotopowych ... *58*
2.3.2.1. Określanie mechanizmu kinetycznego reakcji za pomocą kinetycznych efektów izotopowych ... 61
2.3.2.2. Zależność kinetycznych efektów izotopowych od pH ... 63
2.3.2.3. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru dla różnych kombinacji izotopów ... 63
2.3.3. Rozpuszczalnikowe efekty izotopowe ... *64*
2.3.4. Nieklasyczne zjawiska wykrywane za pomocą kinetycznych efektów izotopowych ... *66*
3. BADANIA WŁASNE ... **68**
3.1. SYNTEZY L-TYROZYNY ZNAKOWANEJ IZOTOPAMI WĘGLA I WODORU ... 68
3.1.1. Metody analityczne ... *70*
3.1.1.1. Spektroskopowa charakterystyka L-tyrozyny ... 70
3.1.1.2. Chromatograficzne badanie czystości tyrozyny ... 70
3.1.1.3. Oznaczanie ilości tyrozyny ... 71
3.1.1.4. Oznaczanie czystości optycznej tyrozyny ... 71
3.1.1.5. Metody określania położenia znacznika izotopowego w cząsteczce L-tyrozyny ... 72
3.1.1.5.1. Wymiana protonu w pozycji α L-tyrozyny katalizowana przez tryptofanazę 73
3.1.1.5.2. Oderwanie protonu z pozycji 3*S* katalizowane przez liazę fenyloalaninową 73
3.1.1.5.3. Eliminacja fenolu katalizowana przez fenololiazę tyrozynową ... 74

3.1.1.5.4. Wymiana atomów wodoru w pozycji 3',5' tyrozyny z wodą 74
3.1.2. Poszukiwanie metody syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla i wodoru . 75
3.1.2.1. Synteza poprzez transaminację katalizowaną przez transaminazę glutaminian:pirogronian 75
3.1.2.2. Synteza z fenolu katalizowana przez fenololiazę tyrozynową 76
3.1.2.2.1. Izolacja fenololiazy tyrozynowej z *Escherichia coli* 76
3.1.2.2.2. Synteza *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteiny 77
3.1.2.2.3. Synteza L-tyrozyny z fenolu – poszukiwanie dobrego donora reszty alifatycznej 78
3.1.2.3. Synteza z użyciem enzymów hydrolizujących nitryle 79
3.1.2.3.1. Próba syntezy tyrozyny 79
4.1.2.3.1.1. Synteza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu 80
3.1.2.3.1.2 Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu 81
3.1.2.3.1.3. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenyl)-propionamidu 82
3.1.2.3.1.4. Próba otrzymania tyrozyny z 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu 84
3.1.2.3.1.4.1. Synteza bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu 85
3.1.2.3.2. Próba syntezy fenyloalaniny 86
3.1.2.3.2.1. Synteza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu 86
3.1.2.3.2.2. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamidu 87
3.1.2.3.2.3. Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu 88
3.1.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej ^{14}C 89
3.1.3.1. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny 89
3.1.3.1.1. Izolacja monooksygenazy L-fenyloalaninowej z wątroby szczura 89
3.1.3.1.2. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny 90
3.1.3.2. Synteza [2-^{14}C]-L-tyrozyny 92
3.1.3.3. Synteza [3-^{14}C]-L-tyrozyny 93
3.1.3.4. Synteza [1'-^{14}C]-L-tyrozyny 95
3.1.4. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru 98
3.1.4.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2 98
3.1.4.1.1. Syntezy [2-^{2}H]-L-tyrozyny 98
3.1.4.1.1.1. Synteza kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego z kwasu [2-$^{2}H_2$]-malonowego 98
3.1.4.1.1.2. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny przy użyciu wymiany protonu katalizowanej przez tryptofanazę 99

3.1.4.1.1.3. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny z fenolu i *S*-metylo-L-cysteiny katalizowana przez fenololiazę tyrozynową 100
3.1.4.1.2. Syntezy [2-^{3}H]-L-tyrozyny 101
3.1.4.1.2.1. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu [2-$^{3}H_2$]-malonowego 101
3.1.4.1.2.2. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny z użyciem wymiany protonu katalizowanej przez tryptofanazę 102
3.1.4.2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3*R* 103
3.1.4.2.1. Synteza [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny 103
3.1.4.2.2. Synteza [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny 104
3.1.4.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3*S* 104
3.1.4.3.1. Synteza [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny 104
3.1.4.3.2. Syntezy [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny 105
3.1.4.3.2.1. Synteza [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny z kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego. 105
3.1.4.3.2.2. Synteza [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu (*E*)-*p*-kumarowego 106
3.1.4.4. Syntezy [2',6'-$^{3}H_2$]-L-tyrozyny 107
3.1.4.4.1. Synteza [2',6'-$^{3}H_2$]-L-tyrozyny z [2',6'-$^{3}H_2$]-L-fenyloalaniny 107
3.1.4.4.2. Syntezy [2',6'-$^{3}H_2$]-L-tyrozyny z fenolu 107
3.2. BADANIE MECHANIZMU DZIAŁANIA FENOLOLIAZY TYROZYNOWEJ ZA POMOCĄ KINETYCZNYCH EFEKTÓW IZOTOPOWYCH WĘGLA I WODORU 109
3.2.1. Wyznaczanie kinetycznych efektów izotopowych za pomocą radiometrii 109
3.2.2. Wyznaczanie kinetycznych efektów izotopowych za pomocą pomiarów kinetyki .. 111
3.2.3. Wyniki i wnioski z wielkości zmierzonych kinetycznych efektów izotopowych w reakcji rozkładu L-tyrozyny katalizowanej przez TPL 113
3.2.3.1. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru 113
3.2.3.1.1. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 2 113
3.2.3.1.2. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 3 117
3.2.3.1.3. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 2',6' 121
3.2.3.1.4. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 3',5' 123
3.2.3.2. Kinetyczne efekty izotopowe ^{12}C/^{14}C 124
3.2.3.2.1. Kinetyczny efekt izotopowy ^{12}C/^{14}C w pozycji 2 124
3.2.3.2.2. Kinetyczny efekt izotopowy ^{12}C/^{14}C w pozycji 3 126
3.2.3.2.2. Kinetyczny efekt izotopowy ^{12}C/^{14}C w pozycji 1' 126
3.2.4. Rozważania nad ogólnym mechanizmem działania fenololiazy tyrozynowej 127
3.2.5. Perspektywy badania mechanizmu działania fenololiazy tyrozynowej 131

4. PODSUMOWANIE 133

BIBLIOGRAFIA 137

DOROBEK NAUKOWY AUTORA ROZPRAWY 143

WYKAZ SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

% - procent

‘ – minuta

^{o} – stopień kątowy

A – absorbancja, lub alanina

Å – angstrem

Ac – acetyl

ARG – arginina

ASN – asparagina

ASP – kwas asparaginowy

α – helikalna struktura polipeptydu, lub kinetyczny efekt izotopowy

Boc – *tert*-butyloksykarbonyl

Bq – bekerel

Bz – benzyl

β – kartkowa struktura peptydu

C. freundii – Citrobacter freundii

cAMP – cykliczny 3’,5’-monofosforan adenozyny

CD – dichroizm kołowy

cm – centymetr

C_f – forward commitment

C_r – reverse commitment

^{o}C – stopień Celsjusza

D – kwas asparaginowy lub deuter

$D^0_{20,w}$ – współczynnik dyfuzji w wodzie przy 20 stopniach Celsjusza

D-AAO – oksydaza D-aminokwasowa

DBU – 1,8-diazabicyklo[4.3.0]non-5-en

DCC – *N*,*N*-dicykloheksylokarbodiimid

d.e. – nadmiar diastereomeryczny

DEPC – pirowęglan dietylu

DMF – *N*,*N*-dimetyloformamid

DMSO – dimetylosulfotlenek

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DTT – D,L-ditiotreitol

E – enzym lub kwas glutaminowy

EA – kompleks enzym-α-aminoakrylan

EC – skrót stosowany do formalnej nomenklatury enzymów

E. coli – Escherichia coli

e.e. – nadmiar enancjomeryczny

E. herbicola – Erwinia herbicola

EQ – kompleks enzym-chinoid

eq – równowaga

ES – kompleks enzym-substrat

ESI – elektrorozpylanie

Et – etyl

F – fenyloalanina

f – stopień przereagowania

FAD – dwunukleotyd flawinowy

G – glicyna

g – gram

GC/MS – chromatograf gazowy sprzężony ze spektrometrem mas

GLU – kwas glutaminowy

GLY – glicyna

GPT – transamina glutaminian : pirogronian

H – histydyna, lub herc

h – godzina

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa

I – izoleucyna

IRMS – isotope ratio mass spectrometry

K – lizyna, stała równowagi lub stała Michaelisa

k – stała szybkości reakcji

kcal – kilokaloria

k_{cat} – stała katalityczna

kDa – kilodalton

kG – kilogram na centymetr kwadratowy

K_i – stała inhibicji

KIE – kinetyczny efekt izotopowy

K_m – stała Michaelisa

LB – pożywka o niskim stężeniu buforu

LDH – dehydrogenaza L-mleczanowa

M – mol na litr

m – mili, lub masa

Me – metyl

min – minuta

ml – mililitr

MOM – metokysmetyl

MS – spektrometria mas

μ – mikro

N – asparagina

NAD^+ - utleniona forma dwunukleotydu nikotynamido-adninowego

NADH – zredukowana forma dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego

NADPH – zredukowana forma fosforanu dwunukleotydu nikotynamido-adeninowego

NaHMDS – heksametylodisilazan sodu

N-końcowa – od aminowego końca peptydu

nm – nanometr

NMR – magnetyczny rezonans jądrowy

P – produkt

p – wzbogacenie izotopowe

PAL – amoniakoliaza fenyloalaninowa

pH – ujemny logarytm z aktywności protonów

Ph – fenyl

pK_a – stała dysocjacji kwasowej

PLP – fosforan 5'-pirydoksalu

PMO – 4'-monooksygenaza fenyloalaninowa

Q – glutamina

Q-TOF – kwadrupol z analizatorem czasu przelotu

R – arginina, lub radioaktywność właściwa

R_f – współczynnik retencji

rfx – wrzenie pod chłodnica zwrotną

RNA – kwas rybonukleinowy

rpm – obrót na minutę

S – seryna, substrat, lub svedberg

s – sekunda

$s^0_{20,w}$ – współczynnik sedymentacji w wodzie przy 20 stopniach Celsjusza

SOPC – *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteina

stęż. – stężony

T – treonina lub tryt

t – czas

^{t}Bu – *tert*-butyl

TFA – kwas trifluorooctowy

THF – tetrahydrofuran

TLC – chromatografia cienkowarstwowa

TMS – tetrametylosilan

TPL – fenololiaza tyrozynowa

tpl – gen kodujący sekwencję fenololiazy tyrozynowej

Tris – tri-(hydroksymetylo)-metyloamina

Ts – tosyl

TYR – tyrozyna

TyrR – białko aktywujące biosyntezę fenololiazy tyrozynowej

U – jednostka aktywności enzymatycznej lub równomiernie znakowany

UV – światło ultrafioletowe

V – walina lub szybkość maksymalna reakcji

v – objętość, lub szybkość reakcji

VIS – światło widzialne

V_{max} – szybkość maksymalna

Y – tyrozyna

YADH – dehydrogenaza alkoholowa z drożdży

z – ładunek

1. WSTĘP I CELE PRACY

„To co znane, nie jest jeszcze przez to, że jest znane, czymś poznanym" – powiedział niegdyś Friedrich Hegel, wielki filozof niemieckiego oświecenia. Chęć lepszego poznania świata jest motorem wielu działań ludzkości od jej zarania. Ta ludzka żądza wiedzy wynikająca z chęci zmieniania świata jest podstawą rozwoju nauki. Jedną z głównych dziedzin zgłębianych przez naukowców jest tajemnica życia. Natura ciągle zazdrośnie strzeże swych sekretów, jednak naukowcy coraz głębiej poznają jej tajemnice.

Maszyneria życia, podstawy procesów biologicznych są bardzo silnie badane, szczególnie od czasu narodzin biologii molekularnej w drugiej połowie ubiegłego wieku. Pomimo wielu informacji o działaniu układów żywych, osiągnięcia nauki ciągle przypominają złożenie przypadkowych wyrazów wielkiego dzieła literackiego. Do zrozumienia sensu całego utworu ciągle jest jednak bardzo daleko, co unaoczniły popularne w ostatnich latach projekty poświęcone badaniom genomu ludzkiego.

W żywym organizmie podstawową rolę odgrywa nie tylko sama informacja genetyczna, ale także jej odczytywanie, w którym znaczącą rolę odgrywają enzymy (biokatalizatory). Sam sposób działania biocząsteczek katalitycznych interesował biochemików od bardzo dawna; fascynująca była regulacji aktywności w zależności od różnych zjawisk środowiskowych, ale także selektywność enzymów i chemiczny mechanizm ich działania.

U podstaw wspomnianych zjawisk leżą fundamentalne własności biokatalizatorów:

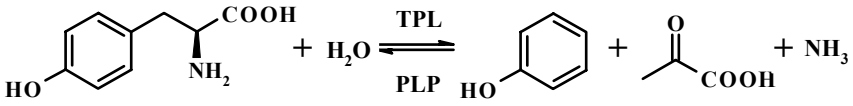
- chiralność i określona struktura przestrzenna centrum katalitycznego enzymu, które umożliwiają staranne wyselekcjonowanie nie tylko substratu, ale także katalizowanego przekształcenia;
- pozbawianie substratu otoczki koordynacyjnej wody, co powoduje inny chemizm reakcji od stosunkowo dobrze znanych chemikowi procesów w roztworze;
- przestrzenna bliskość określonych grup reaktywnych centrum aktywnego substratu umożliwia zajście niekiedy bardzo nietypowych dla badacza reakcji.

Obecnie bardzo silnie rozwijają się badania molekularnych podstaw katalizy. Nieocenione w tego typu eksperymentach są metody spektroskopowe (np. spektroskopia UV-VIS, elektronowy rezonans paramagnetyczny, magnetyczny rezonans jądrowy, spektroskopia Mössbauera, etc.), krystalograficzne, a także spektrometria mas. Takie techniki otwierają możliwości badania zmian strukturalnych w enzymie podczas cyklu katalitycznego.

Poznanie mechanizmów reakcji enzymatycznych umożliwia zastosowanie enzymów w różnych dziedzinach działalności ludzkiej – od badań czysto naukowych, przez analizę

i syntezę związków biologicznie aktywnych, terapię i diagnostykę medyczną, utylizację odpadów, aż po przemysł gorzelniczy... Obecnie silnie rozwija się zastosowanie biokatalizatorów w przemysłowej syntezie organicznej, w której niejednokrotnie niezbędne są łagodne warunki reakcji i wysoka selektywność procesów. Enzymy umożliwiają wydajne i selektywne przekształcenia w środowisku wodnym (ale także niekiedy w rozpuszczalnikach organicznych) i w temperaturze pokojowej, bądź niewiele wyższej.

Ciekawym obiektem badań mechanistycznych wydawała mi się liaza tyrozyna-fenol (inaczej: fenololiaza tyrozynowa, TPL, β-tyrozynaza) katalizująca odwracalną reakcję hydrolitycznego rozkładu L-tyrozyny do fenolu, pirogronianu i amoniaku w obecności fosforanu 5'-pirydoksalu jako kofaktora (Schemat 1).



Schemat 1. Reakcja katalizowana przez TPL

TPL katalizuje dość rzadką w naturze reakcję rozerwania wiązania pomiędzy atomem węgla aromatycznym i alifatycznym. Ciekawy jest także fakt, że proton z pozycji 2 jest częściowo przenoszony na atom węgla 4 tworzącego się fenolu.

W ramach swojej pracy doktorskiej postawiłem sobie za cel zbadanie mechanizmu działania TPL. Do badania mechanizmu działania fenololiazy tyrozynowej postanowiłem wykorzystać metodę kinetycznego efektu izotopowego (KIE). Metoda KIE pozwala na zbadanie szeregu ciekawych szczegółów mechanistycznych reakcji. Jest ona jednak niezbyt często stosowanym narzędziem w badaniach reakcji chemicznych. Głównymi przeszkodami ograniczającymi powszechność stosowania metody KIE w badaniach reakcji chemicznych są konieczność uprzedniego otrzymania związków specyficznie znakowanych, praca z izotopami radioaktywnymi, oraz wymóg dużej precyzji pomiarów. W literaturze naukowej brakuje systematycznych danych dotyczących efektów izotopowych dla reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową. Zmierzenie wartości KIE wodoru i węgla podczas reakcji powinno pozwolić mi na wysnucie ciekawych wniosków dotyczących mechanizmu rozkładu L-tyrozyny katalizowanej przez TPL.

Do badań KIE wykorzystam metody stosowane w naszym zespole badawczym:

- konkurencyjną z podwójnym znakowaniem do określenia efektów $^{1}H/^{3}H$ dla wszystkich nielabilnych atomów wodoru w cząsteczce L-tyrozyny; i $^{12}C/^{14}C$ dla atomów węgla bezpośrednio zaangażowanych w mechanizm reakcji (tj. w pozycjach 2, 3 i 1');

- niekonkurencyjną za pomocą pomiarów kinetyki reakcji dla L-tyrozyny znakowanej i nieznakowanej w celu określenia KIE $^{1}H/^{2}H$ we wszystkich stabilnych pozycjach wodoru.

Aby wykonać badania KIE należy dysponować odpowiednio znakowanymi izotopomerami i izotopologami L-tyrozyny znakowanej specyficznie (a niekiedy stereospecyficznie) ^{14}C, ^{2}H i ^{3}H. Planuję zsyntetyzować L-tyrozyny znakowane:

- węglem-14 w pozycjach 1, 2, 3 i 1';
- deuterem we wszystkich pozycjach nielabilnych;
- trytem również we wszystkich pozycjach nielabilnych.

Metody syntezy, które będę stosował w swojej pracy mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w tomografii pozytonowej, w której bardzo często stosuje się metody enzymatyczne celem jak najszybszego otrzymania związku biologicznie czynnego znakowanego izotopem krótkożyciowym celem wykonania badań diagnostycznych.

W rozdziale 2 dokonam przeglądu literaturowego dotyczącego:

- istotnych informacji dotyczących badanego obiektu – fenololiazy tyrozynowej ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu jej działania (2.1.);
- syntez L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla i wodoru (2.2.);
- podstaw badania mechanizmów reakcji enzymatycznych za pomocą kinetycznych efektów izotopowych (2.3.).

W rozdziale 3 opiszę wyniki i interpretację własnych badań. Rozdział będzie składał się z opisu:

- wykonanych syntez znakowanej L-tyrozyny (3.1.);
- badań KIE i ich interpretacji (3.2.).

Dysertację zakończę podsumowaniem (4.).

2. PRZEGLĄD LITERATUROWY

2.1. Enzym fenololiaza tyrozynowa

2.1.1. Ogólne informacje o fenololiazie tyrozynowej

2.1.1.1. Występowanie, biosynteza i otrzymywanie TPL

Fenololiaza tyrozynowa (β-tyrozynaza, TPL; E.C. 4.1.99.2) jest enzymem występującym głównie u Gram-ujemnych *Enterobacteriaceae*, a zwłaszcza *Escherichia*, *Erwinia*, *Aerobacter* i *Proteus* (Kumagai *et al.*, 1970c; Enei *et al.*, 1972; Nagasawa *et al.*, 1985), a także u części stawonogów, np. w *Oxidus gracillus* (Duffey & Blum, 1977), czy w *Leptoglossus phyllopus* (Duffey *et al.*, 1977; Antson *et al.*, 1993). Enzym ten katalizuje reakcję rozkładu L-tyrozyny do pirogronianu, fenolu i amoniaku (Brot *et al.*, 1965). TPL należy do rodziny alfa wśród białek zależnych od PLP (Alexander *et al.*, 1994). Kofaktorem tego enzymu jest fosforan pirydoksalu (PLP).

Istnienie TPL stwierdzono m. in. w *Erwinia herbicola*, *Citrobacter freundii* (dawniej *Escherichia intermedia*), *Citrobacter intermedius*, *Escherichia coli*, *Proteus morganii* (Nagasawa *et al.*, 1985), *Clostridium tetranomorphum* (Brot *et al.*, 1965), czy *Symbiobacterium sp.*, (Hirahara *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997). W *E. herbicola* jest on obecny głównie we frakcji periplazmatycznej (McKenzie *et al.*; 1980), co może być spowodowane oddzieleniem (w celu łatwiejszej regulacji) od enzymów szlaku biosyntezy tyrozyny znajdujących się we frakcji cytoplazmatycznej. W pozostałych wymienionych organizmach obecność TPL stwierdzono głównie we frakcji cytoplazmatycznej, a nie w periplazmatycznej, gdzie jest duża aktywność alkalicznej fosfatazy. Enzym ten rozkłada PLP i uniemożliwia działanie TPL (Nagasawa *et al.*, 1985).

Biosynteza TPL zachodzi najwydajniej w pH 7.0-7.5 i w temperaturze 27-32^{o}C; głównie następuje ona po 26-30h (faza stacjonarna wzrostu bakterii). Biosynteza ta jest indukowana przez L- i D-tyrozynę, ale także przez inne aminokwasy. Biosyntezę TPL stymuluje także PLP, oraz jony Fe^{3+}. Fenol, który hamuje również wzrost bakterii, jest inhibitorem ekspresji liazy (Enei *et al.*, 1973). Podanie alternatywnych źródeł węgla (np. glukozy) gra podobną rolę, co jest typowe dla biosyntezy enzymów szlaków katabolicznych aminokwasów (Suzuki *et al.*, 1995).

Gen *tpl* jest aktywowany bezpośrednio poprzez kooperatywne związanie trzech dimerów białka TyrR i zgięcie DNA przed ramką odczytu tak, aby możliwy był kontakt TyrR z polimerazą RNA. Agregacja TyrR zachodzi w obecności tyrozyny, co jest ważne regulacyjnie (Suzuki *et al.*, 1995; Smith & Somerville, 1997; Katayama *et al.*, 1999;

Katayama *et al.*, 2000). Oprócz tego aktywację wspomagają czynnik integracyjny gospodarza (IHF) i białkowy receptor cAMP (CRP), które również wyginają DNA w tym obszarze (Bai & Somerville, 1998). Nie stwierdzono synergizmu aktywacji *tpl* pomiędzy TyrR i CRP (Smith & Somerville),

β-tyrozynazę udało się dotychczas wyizolować w czystej postaci z *C. freundii* (enzym krystalizuje w postaci heksagonalnych pręcików; Kumagai *et al.*, 1970c) i z *E. herbicola* (krystalizuje w postaci dwunastościanów; Kumagai *et al.*, 1972; Pletnev *et al.*, 1996). Procedura oczyszczania składa się z sonikacji celem zniszczenia ścian komórkowych, wytrącania siarczanem (VI) amonu, wytrącania kwasów nukleinowych siarczanem (VI) protaminy, chromatografii na DEAE-Sephadex, DEAE-Sephacel, DEAE-celulozie, Octyl-Sepharose, hydroksyapatytach, Sephadex G-150, Sephacryl S-300, Cibacron Blue F3GA-agarozie, immobilizowanym PLP i wytrącania kryształków TPL siarczanem amonu.

Enzym uzyskiwano również metodami biologii molekularnej (Ikeda *et al.*, 1975; Meadows *et al.*, 1976; Meadows & Cantwell, 1980; Iwamori *et al.*, 1992; Antson *et al.*, 1993; Hirahara *et al.*, 1993; Foor *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1997).

2.1.1.2. Własności fizyczne białka TPL

Enzym jest bardziej stabilny w mniej oczyszczonej formie; jego aktywność nie zmienia się znacząco przez miesiąc przechowywania w warunkach chłodniczych. Dla przechowywania optymalne jest pH 6.0-7.0.

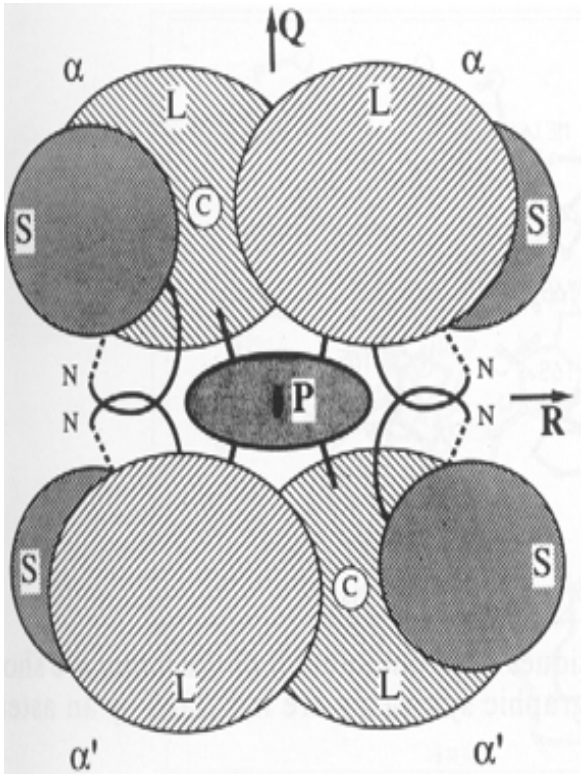
Reakcje z udziałem fenololiazy tyrozynowej można prowadzić w temperaturach do 40^{o}C; powyżej 50^{o}C aktywność enzymu gwałtownie spada.

Otrzymane białka TPL z *C. freundii* i *E. herbicola* chrakteryzowały się masami molowymi 170 i 259 kDa, współczynnikami sedymentacji $s^{o}_{20,w}$ 7.77 i 8.24S, współczynnikami dyfuzji $D_{20,w}$ $4.42*10^{-7}$ i $3.08*10^{-7}cm^2/s$ (Kumagai *et al.*, 1970b) oraz współczynnikiem absorpcji 0.837 ml/(mol*cm) przy 278nm (Nagasawa *et al.,* 1981).

Fenololiazę tyrozynową można immobilizować na Sepharose aktywowanej CNBr (Fukui *et al.*, 1975), zamykać w mikrokapsułkach (taki enzym używano do syntezy L-tyrozyny; Lloyd-George *et al.*, 1993), w agarozie, żelatynie, w karageninie (Voivodov *et al.*, 1987), czy też w liposomach (Pierson & Meadows, 1981).

Znana jest struktura przestrzenna białka, wykazuje ona symetrię $P2_12_12_1$. Wymiary to około 135 x 60 x 144Å. TPL należy do białek typu α/β, składa się z 4 identycznych podjednostek; każda zawiera 14 α–helis (leżących głównie w zewnętrznych częściach struktury liazy) i 16 nici należących do struktur β–kartek. Podjednostka zawiera ramię *N*-końcowe (19 reszt aminokwasowych), małą (reszty aminokwasowe 20-48 i 333-456;

4-niciowa antyrównoległa β–kartka) i dużą domenę (reszty 57-310; β–kartka typu mieszanego złożona z 7 nici) i region łączący wspomniane domeny (najdłuższa, 20-aminokwasowa helisa w białku; Rysunki 1 i 2).

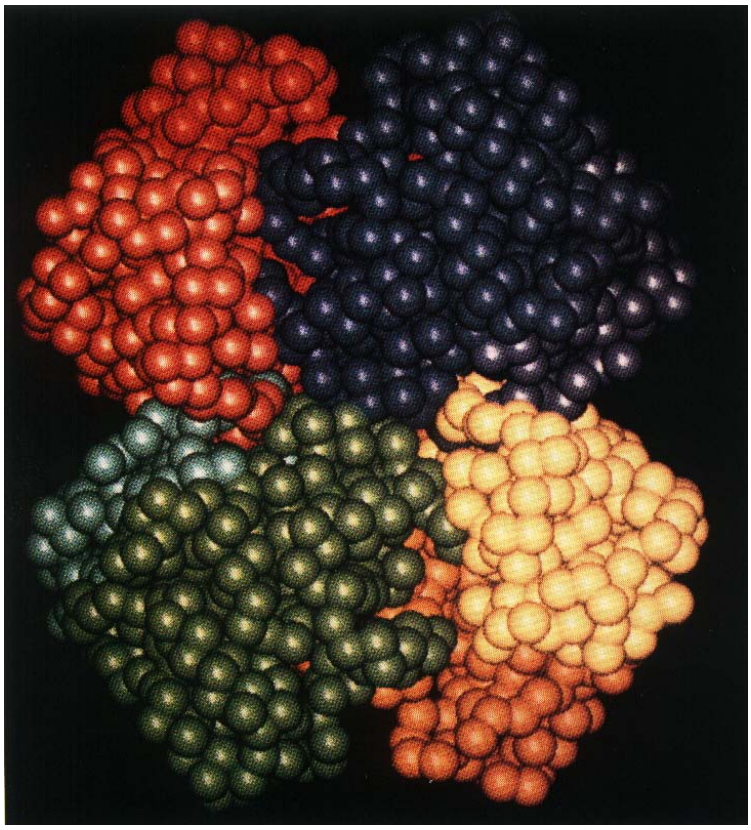


Rysunek 1. Domeny TPL (L – duża domena, S – mała domena, α, α' – podjednostki, N – koniec *N*-terminalny łańcucha, C – centrum aktywne, P, Q, R – dwukrotne osie symetrii; Antson *et al.*, 1993).

Umożliwiają one uformowanie tetrameru (dimeru dimerów). 34% reszt aminokwasowych znajduje się w α–helisach, 17% w β–kartkach i 16% w β–skrętach (czasem zawierających helisy typu 3_{10}; Antson *et al.*, 1992; Antson *et al.*, 1993; Sundararaju *et al.*, 1997).

Jeden mol TPL wiąże 2 mole PLP (Demidkina *et al.*, 1987; Sundararaju *et al.*, 2000) i zawiera 10 moli grup tiolowych (Sawada *et al.*, 1975). 1 cząsteczka TPL zawiera 2 centra aktywne (Demidkina *et al.*, 1987).

Enzym jest aktywowany jonami jednododatnimi, które zwiększają ilość uprotonowanej aktywnej formy TPL, co objawia się wzrostem absorpcji przy 420nm w widmie CD. Do aktywności katalitycznej są konieczne jony amonowe (najbardziej efektywna aktywacja, prawdopodobnie dzięki tworzeniu dodatkowych wiązań wodorowych), potasowe, rubidowe, ewentualnie cezowe (nieco słabsza aktywacja). Jony sodowe są inhibitorem reakcji eliminacji, a jony litowe hamują uboczną reakcję transaminacji prowadzącą do kwasu 3-(*p*-hydroksyfenylo)-pirogronowego, ale nie mają wpływu na reakcję eliminacji (Demidkina & Myagkikh, 1989).

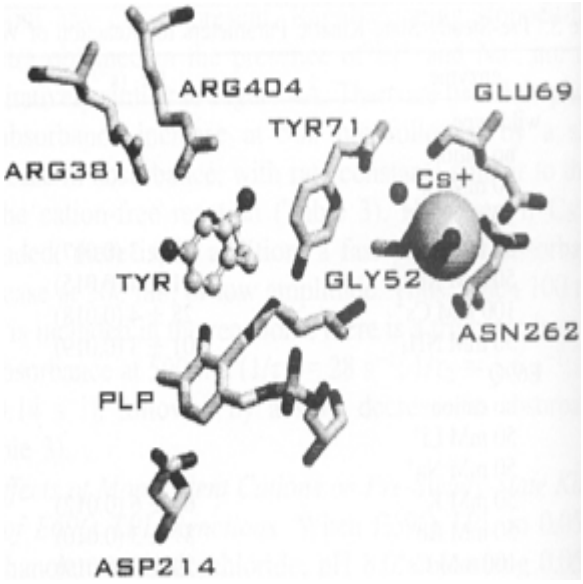


Rysunek 2. Struktura TPL przedstawiająca poszczególne reszty aminokwasowe jako sfery o promieniu 3Å wokół atomów węgla α (duże domeny poszczególnych podjednostek mają kolory czerwony, niebieski, zielony i żółty, odpowiadające im małe domeny są przedstawione w odcieniach tych kolorów; Antson *et al.*, 1993).

Jony aktywujące są kompleksowane (liczba koordynacyjna 7) przez atomy tlenu wiązań peptydowych reszt glicyny 52 i asparaginy 262 jednej podjednostki, oraz atomy tlenu grupy ∈-karboksylowej kwasu glutaminowego 69 drugiej podjednostki i 3 cząsteczek wody (w β-tyrozynazie wyizolowanej z *C. freundii*; Rysunek 3).

Jedna z tych cząsteczek wody tworzy wiązanie wodorowe z resztą lizyny 256. Ta struktura znajduje się blisko centrum aktywnego. Wiązanie kationów jest procesem wolnym, toteż pełną aktywność wykazuje liaza po uprzedniej preinkubacji w obecności wspomnianych kationów.

Mutant E69Q jest również aktywowany tymi kationami i wykazuje podobne własności katalityczne do enzymu typu dzikiego; co oznacza, że ładunek ujemny kwasu glutaminowego 69 nie jest konieczny do aktywacji TPL. Taka mutacja nie zmienia parametrów strukturalnych. Fluorescencja zmienionego białka (naświetlanie światłem o długości fali 420nm, emisja 505nm) zmienia się po dodaniu kationów jednowartościowych. Dla odmiany mutant E69D wykazuje bardzo małą aktywność katalityczną, co świadczy o bardzo ważnej roli przestrzennej tego miejsca w przyjęciu natywnej struktury przez białko. Potwierdzeniem jest brak zmiany we fluorescencji po dodaniu jonów jednowartościowych.



Rysunek 3. Struktura centrum aktywnego TPL związanego z jonem cezowym (Sundararaju *et al.*, 2000).

Kationy działają hamująco w stężeniach powyżej 100mM, prawdopodobnie wskutek utrudnienia oddysocjowania pirogronianu. Szczególnie jest to uzasadnione w przypadku jonów amonowych, które są produktem reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową (Sundararaju *et al.*, 2000).

Jony magnezowe aktywują TPL wyizolowany z *Clostridium tetranomorphum*, ale są inhibitorem enzymu z *C. freundii*, podobnie jak jony miedzi (II) i wapnia (Brot & Weissbach, 1970).

2.1.1.3. Własności TPL jako biokatalizatora

Reakcja rozkładu L-tyrozyny przez liazę tyrozyna-fenol zachodzi najwydajniej w 0.05M buforze fosforanowym o pH 8.2, ale można stosować zakres pH od 7.8 do 8.8 (Kumagai *et al.*, 1970b). Reakcja ta zachodzi też w buforach 0.1M Mes (kwas 2-(*N*-morfolino)-etanosulfonowy; pH 5.5-6.5), Hepes (kwas *N*-(2-hydroksyetylo)-piperazyno-*N*′-etanosulfonowy; pH 7.8-8.0), Taps (kwas 3-[[tris-(hydroksymetylo)-metylo]-amino]-propanosulfonowy; pH 8.0-9.0), trietanoloaminowym (pH 8.0) lub w Ches (kwas 2-(*N*-cykloheksylamino)-etanosulfonowy; pH 9.0-10.0; Kiick & Phillips, 1988). Optymalna temperatura dla reakcji to 30^{o}C (Yamada *et al.*, 1968).

Parametry tej reakcji to: a) stała Michaelisa od $1.3*10^{-4}$ do $7.6*10^{-4}$M (Muro *et al.*, 1978; Faleev *et al.*, 1981) względem L-tyrozyny; i od $1.3*10^{-6}$ do $9.0*10^{-6}$ M (Faleev *et al.*, 1981) względem PLP; b) stała katalityczna od 0.5 do 3.5s^{-1} (Muro *et al.*, 1978); c) stała dysocjacji kompleksu enzym-substrat $5.4*10^{-4}$M (Muro *et al.*, 1978); d) prawdopopodo-

bieństwo rozpadnięcia się kompleksu enzym-substrat na enzym i substrat jest 4.7 razy większe niż prawdopodobieństwo zajścia reakcji (Kiick & Phillips, 1988).

Liaza tyrozyna-fenol katalizuje bardzo wiele reakcji. TPL katalizuje rozkład analogów L-tyrozyny: *o*- i *m*-hydroksy-, *o*- i *m*-fluoro-, *o*- i *m*-chloro-, *o*- i *m*-bromo-, *o*-jodo-, *o*- i *m*-metylo, jak i 3-hydroksy-4-okso-1(*H*)-pirydynoalaninę (Nagasawa *et al.*, 1981). Przekształca ona L-cysteinę, *S*-metylo-, *S*-etylo-, *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteinę, D- i L-serynę, *O*-benzoilo-L-serynę, *O*-acetylo-L-serynę (*O*-acylo-L-seryny ulegają nieodwracalnemu rozkładowi; Phillips, 1987), 3-chloro- L-alaninę w kwas pirogronowy (Kumagai *et al.*, 1970c); oraz kwasu 1-amino-2-(4-hydroksyfenylo)-etylofosfinowego do kwasu 1-oksoetylofosfinowego, ale analog fosfonowy nie ulega tej reakcji (Faleev *et al.*, 2000). β-tyrozynaza katalizuje także reakcję wymiany pierścienia fenolowego w układach L-tyrozyna/rezorcynol lub pirokatechol, w wyniku której powstają odpowiednie izomery L-dopy (Sawada *et al.*, 1975).

TPL pozwala na otrzymanie L-tyrozyny z fenolu, pirogronianu i amoniaku w wyniku działania reakcji odwrotnej. Analogicznie można otrzymać pochodne L-tyrozyny z pirokatecholu, rezorcynolu (Yamada *et al.*, 1972; Foor *et al.*, 1993; Park *et al.*, 1998), *o*- i *m*-krezolu, *o*- i *m*-chloro (Sawada *et al.*, 1975), *o*- i *m*-fluoro-, *o*- i *m*-bromo-, *o*- i *m*-metylo-, *o*- i *m*-metyloksy-, *o*-etylo, *o*-etyloksyfenolu, kwasu salicylowego (Nagasawa *et al.*, 1981), 2- i 3-azafenolu (Watkins & Phillips, 2001a).

Analogi L-tyrozyny można również otrzymać z fenolu, pirokatecholu, pirogalolu i hydroksychinonu zastępując kwas pirogronowy D- lub L-seryną, alaniną, *S*-metylo-L-cysteiną, L-cysteiną, lub 3-chloro-L-alaniną (Sawada *et al.*, 1975; Rapp *et al.*, 1975). W podobny sposób otrzymano (2*S*,3*R*)-3-metylotyrozynę (Kim & Cole, 1999).

Za pomocą TPL można przeprowadzić reakcję odwrotną do rozkładu L-cysteiny i *S*-metylo-L-cysteiny, ale nie udało się przeprowadzić analogicznej reakcji dla seryny (Palcic *et al.*, 1987). Powyższą metodą można uzyskać kwas 1-amino-2-(4-hydroksyfenylo)-etylofosfinowy (Faleev *et al.*, 2000).

β-tyrozynaza katalizuje także reakcję racemizacji D- i L-alaniny (Kumagai *et al.*, 1970a; Chen *et al.*, 1993), oraz także deaminację L-tyrozyny, L-seryny, L-fenyloalaniny i L-*m*-tyrozyny do odpowiednich ketokwasów (Demidkina *et al.*, 1987; Mouratou *et al.*, 1999).

TPL wymienia protony w pozycji α w aminokwasach o nienaładowanych grupach bocznych z rozpuszczalnikiem (Faleev *et al.*, 1988).

PLP próbowano zastąpić jego analogami 2'-hydroksymetylo- i *N*-tlenkiem. Związki te jednak reagowały gorzej – takie reakcje charakteryzują się niższymi szybkościami

maksymalnymi, mniejszymi stałymi Michaelisa substratu i wyższymi stałymi Michaelisa względem analogów PLP (Kumagai *et al.*, 1973).

Inhibitorami kompetycyjnymi fenololiazy tyrozynowej są oczywiście substraty omówionych reakcji. Fenol i jego pochodne w stężeniu powyżej 100mM powodują denaturację białek i są inhibitorami niekompetycyjnymi enzymu (Nagasawa *et al.*, 1981; Phillips, 1987). To zjawisko powoduje też zatrzymanie wzrostu bakterii przy podaniu dużych ilości L-tyrozyny wskutek tworzenia się dużych ilości fenolu (Enei *et al.*, 1973).

Inhibitorami TPL są też: hydrochinon, *p*-floro-, -chloro-, -bromo-, -jodo-, -metylo-, -amino-, –nitro-, *o*-jodo-, -*tert*-butylo-, -*sec*-butylo-, -etyloksy-, -amino-, -nitro-, *m*-amino-, -nitrofenol, 2,3-dihydroksy-, 2,3,4-trihydroksypirydyna, chlorobenzen, kwas benzoesowy (inhibitor kompetycyjny), kwas 3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionowy (Sundararaju *et al.*, 1997), anizol, salicylamid (Nagasawa *et al.*, 1981), kwas asparaginowy i glutaminowy (Mouratou *et al.*, 1999) oraz estry i amidy aminokwasów aromatycznych. Aminokwasy naładowane dodatnio w łańcuchu bocznym nie są inhibitorami TPL (Faleev *et al.*, 1988).

2.1.1.4. Zastosowanie TPL

β-tyrozynazę stosuje się głównie do syntezy L-dopy, która jest ważnym neurotransmiterem. W tym celu można używać również żywych komórek bakterii (Kupletskaia, 1979). Foor *et al.*, 1993, zastosowali konstrukt *E. coli* zaopatrzony w geny *tutA* (kodujący TPL) i *tutB* (kodujący permeazę tyrozynową) z *E. herbicola*. Stosowano także enzym immobilizowany w karageninie (Voivodov *et al.*, 1987).

Liazę używa się również do otrzymywania znakowanej L-tyrozyny. Tak otrzymano np. [4'-^{13}C]-L-tyrozynę z [1-^{13}C]-fenolu, [3',5'-$^{13}C_2$]-L-tyrozynę z [2,6-$^{13}C_2$]-fenolu, [4'-^{18}O]-L-tyrozynę z [^{18}O]-fenolu, [^{15}N]-L-tyrozynę z ^{15}NH3, [2',3',5',6'-$^{2}H_4$]-L-tyrozynę z [U-$^{2}H_6$]-fenolu (Walker *et al.*, 1986), [2-^{2}H]-L-tyrozynę oraz jej 3-fluoropochodną z D_2O (Kiick & Phillips, 1988), [2,3,3-$^{2}H_3$]-3'-fluoro-L-tyrozynę z D_2O (Faleev et al., 1996b).

Szczególnie ciekawe zastosowanie dla fenololiazy tyrozynowej znaleziono w syntezie L-tyrozyny i L-dopy znakowanych izotopami krótkożyciowymi stosowanymi w tomografii pozytonowej. Wykorzystując TPL otrzymano: [2'-^{18}F]-L-dopę z 4-[^{18}F]-katecholu (Kaneko *et al.*, 1999), L-[^{13}N]-tyrozynę z $^{13}NH_3$ (Watanabe *et al.*, 1991), L-[1-^{11}C]-tyrozynę z D,L-[1-^{11}C]-alaniny (Bjurling *et al.*, 1990a), oraz jej izotopolog znakowany w pozycji *β* (Bjurling *et al.*, 1990b).

TPL używano do badań nad nowotworami, stwierdzono pewien cytostatyczny efekt na komórkach nowotworowych (Meadows *et al.*, 1976; Elmer *et al.*, 1979).

Innym zastosowaniem enzymu było oznaczanie PLP w materiale biologicznym (Meadows *et al.*, 1977),

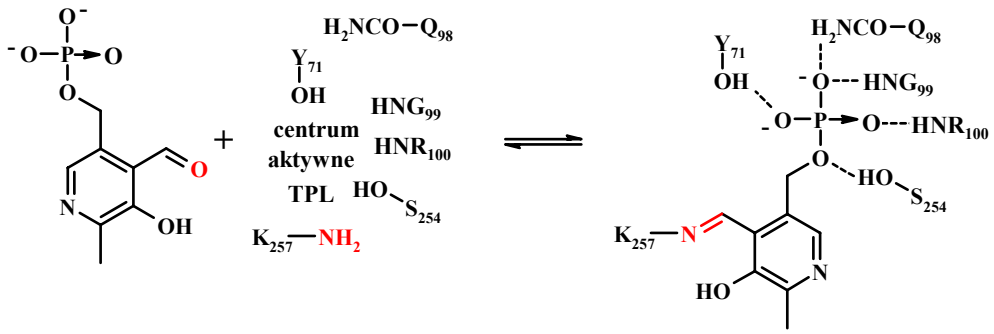
Fenololiazę tyrozynową używano pod kątem utylizacji odpadów fenolowych (Lloyd-George *et al.*, 1993).

2.1.2. Mechanizm działania fenololiazy tyrozynowej

Mechanizm działania liazy tyrozyna-fenol był przedmiotem wielu badań. Wykorzystywano do nich głównie spektroskopię i badania izotopowe. Badania prowadzono głównie na enzymie z *C. freundii*. Jeśli podane są wyniki uzyskane w badaniach na TPL uzyskanym z innego organizmu, jest to zaznaczone.

2.1.2.1. Związanie kofaktora przez enzym

Pierwszym etapem procesu jest związanie kofaktora przez enzym (Schemat 2).



Schemat 2. Wiązanie PLP przez TPL

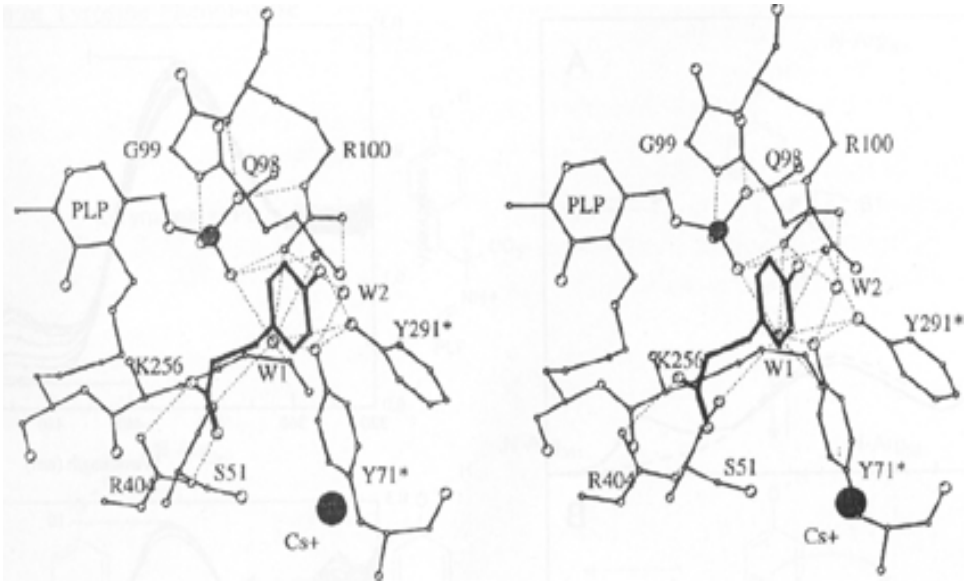
PLP wiąże się grupą aldehydową do grupy *ε*–aminowej reszty lizyny 257 znajdującej się w centrum aktywnym enzymu; powstaje wówczas zasada Schiffa (Kumagai *et al.*, 1975; Antson *et al.*, 1993). Objawia się to pasmami absorpcji z maksimami przy 420-430 i 335-340nm (Muro *et al.*, 1978; Chen & Phillips, 1993). Reszta lizyny 257 znajduje się w niedozwolonym miejscu mapy Ramachandrana (Antson *et al.*, 1993).

Potwierdzeniem jest reakcja holoenzymu liazy z $NaBH_4$, w wyniku której redukcji ulega wiązane azometinowe, co powoduje zanik pasma absorpcji przy 430nm (Kumagai *et al.*, 1975). Po całkowitej hydrolizie zredukowanego holoenzymu uzyskano *N*-pirydoksylową pochodną lizyny. Otrzymano także analogiczną pochodną peptydu zawierającego omawianą resztę lizyny celem identyfikacji jej położenia w łańcuchu peptydowym (Antson *et al.*, 1993). Stwierdzono też, że redukcja zachodzi po stronie *re* względem atomu węgla w pozycji 4' PLP. Taka redukcja inaktywuje TPL (Palcic *et al.*, 1987).

Centrum aktywne znajduje się pomiędzy dużą i małą domeną podjednostki TPL oraz dużą domeną drugiej podjednostki. Miejsce wiążące kofaktor jest hydrofobowe i otoczone

N-końcowymi łańcuchami dwóch podjednostek (łańcuchy takie ułatwiają powiązanie małych domen ze sobą) oraz dwoma nićmi struktury β dużej domeny. Struktura i lokalizacja tego miejsca są podobne do centrów aminotransferaz. W konformacji zamkniętej obydwie domeny znajdują się bliżej siebie, niż w konformacji otwartej.

Badania krystalograficzne kompleksu TPL z kwasem 3-(4'-hydroksyfenylo)-propionowym wykazały, że hydrofobowe centrum aktywne jest tworzone przez reszty tyrozyny 71, waliny 283 i metioniny 288 jednej podjednostki oraz fenyloalanin 36, 123, 448 i metioniny 379 drugiej podjednostki (Phillips *et al.*, 1997; Rysunek 4).



Rysunek 4. Schemat stereo centrum aktywnego TPL związanego z kwasem *p*-hydroksyfenylopropionowym (pogrubione linie; wiązania wodorowe przedstawiono linią przerywaną; W1 i W2 – cząsteczki wody; Sundararaju *et al.*, 1997).

Mutacja F448H uniemożliwia przybranie konformacji zamkniętej wskutek względnie dużej polarności reszty histydyny; w konformacji zamkniętej musiałaby ona znaleźć się w hydrofobowym środowisku (Demidkina *et al.*, 2002).

Grupa fosforanowa PLP wytwarza wiązanie wodorowe z fenolowym atomem wodoru reszty tyrozyny 71 (mutant TPL Y71F wiąże kofaktor znacznie słabiej od natywnego enzymu). Być może zmiany konformacyjne wywoływane kationami jednowartościowymi są przenoszone z reszty kwasu glutaminowego 69 do centrum aktywnego właśnie poprzez wspomnianą resztę tyrozyny (Sundararaju *et al.*, 2000). Wiązania wodorowe mogą tworzyć atomy tlenu reszty fosforanowej PLP z amidowymi atomami wodoru wiązań peptydowych z reszt glicyny 99, argininy 100 oraz z grupy ε-amidowej glutaminy 98 i z grupy hydroksylowej seryny 254. Taką strukturę tworzy białko związane z anionem siarczanowym (VI) (Antson *et al.*, 1993).

2.1.2.2. Rozpoznanie substratu przez enzym

Drugim etapem procesu jest rozpoznanie substratu przez enzym. Związanie substratu jest możliwe po uprzedniej aktywacji enzymu kationami jednowartościowymi. (Sundararaju *et al.*, 2000). Badania metodą zatrzymanego przepływu wykazały, że proces asocjacji enzymu i substratu jest dwucząsteczkowy i relatywnie szybki (Muro *et al.*, 1978).

Proces rozpoznania jest ułatwiany przez grupy guanidynowe reszt arginin 283 i 381 w sekwencji TPL z *C. freundii*, które umożliwiają wprowadzenie cząsteczki tyrozyny do hydrofobowego centrum aktywnego. Mutanty TPL R381I, R381A i R381V znacznie słabiej rozpoznają L-tyrozynę jako substrat, choć wiążą PLP, odrywają proton α i katalizują reakcję eliminacji z substratów posiadających dobre grupy opuszczające (np. *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteina, 3-chloroalanina, *O*-benzylo- i *O*-benzoilo-L-seryna; Phillips *et al.*, 1997; Sundararaju *et al.*, 1997; Mouratou *et al.*, 1999).

Istotne jest uprotonowanie centrum aktywnego; stwierdzono istnienie dwóch grup kwasowo-zasadowych w centrum o pK_a od 7.6 do 8.1 w zależności od źródła enzymu (reszta argininy 381 ma pK_a około 8 w centrum aktywnym). Stała katalityczna maleje wraz z obniżeniem pH, co może oznaczać, że protonowanie kompleksu enzym-substrat hamuje katalizę (Faleev *et al.*, 2003). Zarówno enzym uprotonowany, jak i nieuprotonowany wiążą substrat; ale tylko forma nieuprotonowana przeprowadza reakcję. Stopień uprotonowania białka TPL niezbędny do katalizowania reakcji może być różny w różnych organizmach (Kiick & Phillips, 1988).

Bardzo ważna podczas rozpoznania substratu jest grupa hydroksylowa fenolu (Faleev *et al.*, 1987). Guanidynowy atom azotu reszty argininy 381 i hydroksyl treoniny 124 tworzą wiązania wodorowe z fenolowym atomem wodoru w cząsteczce tyrozyny. pK_a tego hydroksylu wynosi 10.5, więc w warunkach reakcji tyrozyna wchodzi w reakcję jako jon obojnaczy. Okazało się jednak, że kwasowo-zasadowa forma hydroksylu fenolowego nie ma większego znaczenia dla reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową, albowiem badania na analogach L-tyrozyny podstawionych fluorem w pierścieniu aromatycznym (hydroksyle fenolowe mają wtedy znacznie niższe pK_a) pokazały, że ulegają one reakcji w porównywalny sposób z naturalnym substratem (Faleev *et al.*, 2003). Z kolei 3'-azatyrozyna (posiadająca ładunek ujemny na tlenie w grupie aromatycznej) wiązała się znacznie silniej z TPL od 2'-azatyrozyny (posiada niezjonizowany hydroksyl), ale żaden z tych związków nie ulegał β-eliminacji, choć następowało oderwanie protonu α (Watkins & Phillips, 2001b).

Stosunek szybkości katalitycznej do stałej Michaelisa dla L-tyrozyny jest o 3 rzędy wielkości (enzym z *E. herbicola*) wyższy niż w przypadku L-seryny, L-cysteiny i L-alaniny, co świadczy o znaczeniu układu aromatycznego podczas procesu rozpoznawania substratu

(Demidkina *et al.*, 1987). Stała Michaelisa rośnie wraz ze wzrostem promieni van der Waalsa podstawników w pozycji *orto* i *meta* analogów L-tyrozyny, podczas gdy szybkość reakcji maleje. Generalnie *m*-podstawione analogi L-tyrozyny są lepszymi substratami od *o*-izomerów (wyjątkiem jest fluoropochodna), ale też są one silniejszymi inhibitorami kompetycyjnymi. Natomiast bardzo duże podstawniki uniemożliwiają zajście reakcji ze względów przestrzennych (Nagasawa *et al.*, 1981). Liaza związana z L-tyrozyną podstawioną w reszcie aromatycznej małymi podstawnikami może przybierać konformację zamkniętą; wtedy V_{max} nie zależy od pH. W przypadku większych podstawników enzym nie może przybrać zamkniętej konformacji, a jego V_{max} zależy od pH (Faleev et al., 1996b).

W szeregu nierozgałęzionych aminokwasów alifatycznych stała inhibicji rośnie wraz ze wzrostem hydrofobowości łańcucha bocznego. Również zwiększenie objętości grup alifatycznych powoduje osłabienie inhibicji. Arginina i lizyna nie są inhibitorami enzymu; kwas glutaminowy i asparaginowy są silniejszymi inhibitorami od aminokwasów alifatycznych (Faleev *et al.*, 1988). Obecność grupy nukleofilowej w łańcuchu bocznym zwiększa powinowactwo aminokwasu do enzymu.

Grupa karboksylowa jest bardzo istotna w procesie rozpoznawania substratu, gdyż tyramina nie jest inhibitorem enzymu (Faleev *et al.*, 1988). Karboksyl jest wiązany elektrostatycznie przez resztę argininy 404 silnie konserwowany w białkach PLP-zależnych (Sundararaju *et al.*, 1997; Faleev *et al.*, 2000).

Próba upodobnienia centrum aktywnego TPL do centrum analogicznego enzymu tryptofanazy (indololiazy tryptofanowej) poprzez mutacje R381I/F448H nie dała białka o aktywności tryptofanazy. Oznacza to, że w rozpoznaniu substratu biorą udział także aminokwasy spoza centrum aktywnego (Phillips *et al.*, 2003).

Kryształy TPL wiążą substrat słabiej, niż enzym rozpuszczony, stała dysocjacji tyrozyny jest około 10 razy większa w stanie krystalicznym, co pokazały badania za pomocą polaryzacyjnej mikrospektrofotometrii adsorpcyjnej (Phillips *et al.*, 2002).

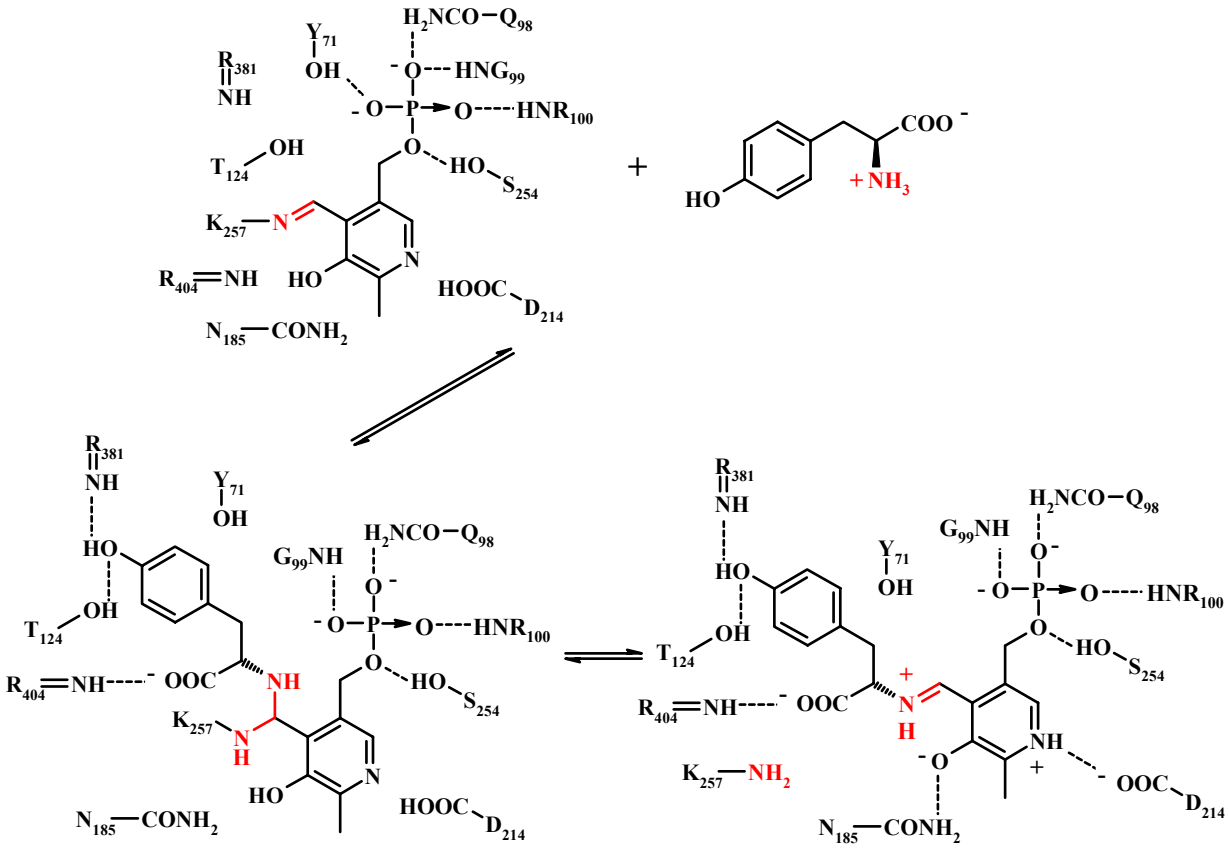
Podczas racemizacji L-alaniny katalizowanej przez TPL pasmo absorpcji przy 500nm (pochodzące od chinoidowego związku przejściowego powstałego po oderwaniu protonu α) zwiększa się w obecności jonów potasowych, natomiast w przypadku izomeru D absorpcja zwiększa się przy niewielkich stężeniach potasu, ale maleje przy większych stężeniach. Fenol (niekompetycyjny inhibitor reakcji racemizacji) silniej wiąże się do aldiminy tworzonej przez L-alaninę, niż do analogicznego związku tworzonego przez izomer D. Wiązanie nie następuje w miejscu katalitycznym enzymu, jak to ma miejsce podczas reakcji rozkładu tyrozyny. Zaobserwowane różnice pomiędzy racemizacją enancjomerów alaniny pozwalają

przypuszczać, że fenololiaza tyrozynowa posiada różne miejsca rozpoznające obydwa izomery i/lub różne konformacje enzymu są konieczne do tych procesów.

4-hydroksypirydyna powoduje zmniejszenie absorpcji przy 500nm w początkowym szybkim procesie wiązania, które jest wolniejsze niż można się spodziewać dla procesu kontrolowanego dyfuzyjnie. Prawdopodobnie jest to efekt preferencyjnego wiązania nieuprzywilejowanej termodynamicznie formy ketonowej tego związku. 4-hydroksypirydyna w formie ketonowej tworzy wiązania wodorowe pomiędzy atomem tlenu a amidowym atomem wodoru reszty waliny 337, oraz pomiędzy atomem wodoru protonującym atom azotu i atomem tlenu grupy karbonylowej reszty alaniny 187 (Chen & Phillips, 1993).

2.1.2.3. Kowalencyjne związanie substratu przez enzym – tworzenie zasady Schiffa PLP-tyrozyna

Kolejnym etapem procesu katalitycznego jest związanie kowalencyjne L-tyrozyny z PLP poprzez transaldiminowanie – zastąpienie grupy *ε*–aminowej reszty lizyny 257 z TPL przez grupę *α*–aminową substratu w zasadzie Schiffa (Schemat 3).



Schemat 3. Tworzenie zasady Schiffa PLP-tyrozyna

Reakcja ta biegnie poprzez wytworzenie pośredniej *gem*-diaminowej pochodnej z PLP oraz reszty lizyny i L-tyrozyny. Taka pochodna absorbuje silnie przy długości fali 340nm, szczególnie w przypadku difluorowych (zwłaszcza 2',6'-; wyjątkiem jest 3',5'-izomer)

pochodnych L-tyrozyny, które mogą oddziaływać z resztą fenyloalaniny 123 z centrum aktywnego. Jest to efekt steryczny (Phillips *et al.*, 1997).

Następnie *gem*-diamina przekształca się w addukt PLP-L-tyrozyna. W badaniach metodą zatrzymanego przepływu ten etap jest identyfikowany jako wolny, jednocząsteczkowy proces. Powstająca aldimina daje negatywne pasmo absorpcji przy 420-425nm, oraz w widmie CD przy 323-342nm (przy czym L izomer alaniny stosowanej jako substrat wykazuje wyższe wartości absorpcji, niż jego enancjomer; Chen & Phillips, 1993), które należy przypisać tautomerom – ketoenaminie i enoliminie (Bazhulina *et al.*, 2000). Kationy jednowartościowe powodują także przesunięcie równowagi tautomerycznej na korzyść aktywnej katalitycznie ketoenaminy (Demidkina & Myagkikh, 1989).

Uprotonowanie atomu azotu L-tyrozyny warunkuje aktywność katalityczną tego adduktu (Sundararaju *et al.*, 2000). Uprotonowany jest też pirydynowy atom azotu (pK_a 6.2-6.4, ale bliskość grupy karboksylowej z reszty kwasu asparaginowego 214 znacznie zwiększa tę wartość) cząsteczki PLP, a grupy hydroksylowa w pozycji 3' PLP jest zdeprotonowana. Atom tlenu z tej pozycji PLP tworzy wiązanie wodorowe z resztą asparaginy 185. Mutant N185A tworzy bardzo mało zasady Schiffa PLP-tyrozyna, reakcja zatrzymywała się na powstającej w dużej ilości pochodnej *gem*-diaminowej (Barbolina *et al.*, 2000).

Aktywny katalitycznie układ ładunków jest zachowywany w zakresie pH od 6.5 do 8.7 w obecności jonów potasowych. Jony sodowe powodują zmianę tego układu – poprzez inne związanie reszty kwasu glutaminowego 69 i następcze przesunięcie pobliskiej reszty tyrozyny 71 ważnej dla związania adduktu PLP-substrat; oraz przez inną geometrię kompleksowania cząsteczki wody tworzącej wiązanie wodorowe z resztą lizyny 256, co powoduje przesunięcie lizyny 257 wiążącej powyższy addukt. Obydwa zjawiska powodują oddalenie grupy karboksylowej reszty kwasu asparaginowego 214 od pirydynowego atomu azotu w PLP i zmniejszenie wartości pK_a na tym atomie (Bazhulina *et al.*, 2000).

Atom wodoru w pozycji α substratu układa się w położeniu *syn* względem grupy fenolowej, i *anti* względem grupy karboksylowej. Płaszczyzna powstałej zasady Schiffa jest ułożona prostopadle do wiązania węgiel-wodór w pozycji α, co umożliwia rozpad tego wiązania. Ładunek ujemny grupy karboksylowej jest konieczny do przybrania takiej konformacji wskutek oddziaływań elektrostatycznych, gdyż amidy aminokwasów aromatycznych wprawdzie są inhibitorami enzymu, ale atom wodoru nie ulega odszczepieniu (Faleev *et al.*, 1988).

Związanie aminokwasu przez holoenzym chroni TPL przed całkowitą inaktywacją poprzez redukcję $NaBH_4$. Zredukowana zasada Schiffa PLP-aminokwas może ulec wymianie

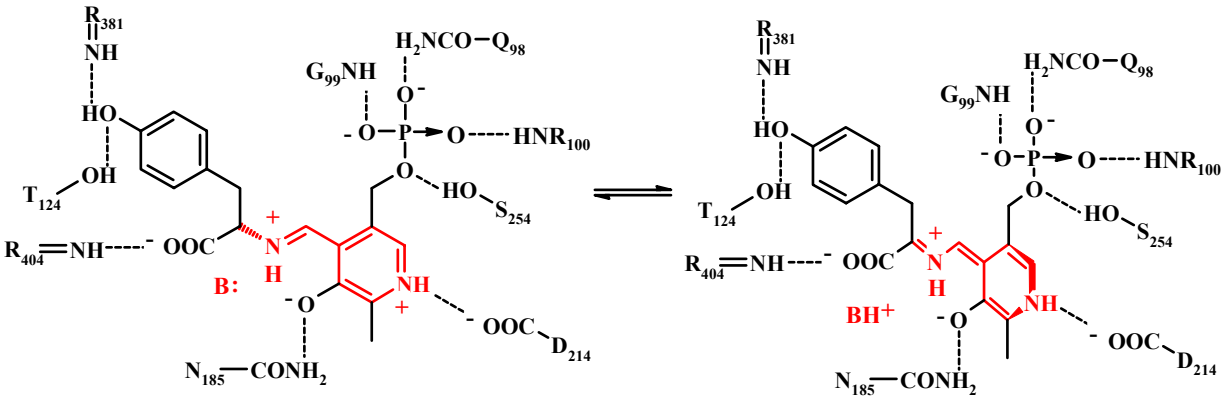
poprzez dyfuzję, podczas gdy w analogicznym przypadku dla holoenzymu nie jest to możliwe – wiązanie PLP-białko jest kowalencyjne (Kumagai *et al.*, 1975).

2.1.2.4. Odszczepienie protonu α - tworzenie chinoidowego produktu pośredniego

Kolejny etap reakcji – odszczepienie protonu (Schemat 4) z pozycji α L-tyrozyny jest katalizowane przez zasadę o pK_a 7.6 (enzym wyizolowany z *C. freundii*) – 7.8 (enzym z *E. herbicola*), co wywnioskowano z zależności stosunku maksymalnej stałej szybkości katalitycznej do stałej Michaelisa od pH (Kiick & Phillips, 1988).

Powstały chinoidowy związek przejściowy (nietrwały w roztworze) daje pasmo absorpcji w 495-507nm z maksimum przy 497nm (Muro *et al.*, 1978). Pasmo zanika w miarę coraz dłuższej inkubacji tyrozyny z PLP i TPL wskutek zużywania się substratu i bardzo wolnej reakcji odwrotnej. Używając D- i L-alaniny nie obserwuje się takiego zjawiska, gdyż produktem reakcji jest drugi enancjomer aminokwasu, który ulega reakcji odwrotnej z podobną szybkością (Kumagai *et al.*, 1970; Muro *et al.*, 1978). Proces deprotonacji jest stabilizowany rezonansowo, albowiem powstały ładunek ujemny na atomie węgla w pozycji α jest rozkładany na koplanarne wiązanie azometinowe i układ aromatyczny PLP (Palcic *et al.*, 1987).

Oderwanie protonu powoduje dużą zmianę w strukturze centrum aktywnego. Płaszczyzna PLP ulega obrotowi o 25° względem osi przechodzącej przez atomy węgla 2' i 5' w pierścieniu pirydynowym. Reszta asparaginy 185 tworzy wiązanie wodorowe z atomem tlenu 3' PLP (powstałe podczas wytwarzania zasady Schiffa; mutant N185A destabilizował powstający podczas deprotonacji chinoidowy związek przejściowy, który tworzył się wolniej i ulegał szybszej β-eliminacji niż w enzymie niezmutowanym; Barbolina *et al.*, 2000).



Schemat 4. Tworzenie chinoidowego produktu pośredniego

Układ PLP-substrat posiada 2 grupy naładowane ujemnie (karboksylową i atom tlenu 3' PLP) oddziałujące elektrostatycznie z resztą argininy 404 i z atomem azotu substratu.

Dzieki temu analog fosfinowy (kwas 1-amino-2-(4-hydroksyfenylo)-etylofosfinowy) może ulegać reakcji wskutek rozkładu ładunku podobnego do L-tyrozyny. Analog fosfonowy nie może ulegać takiej reakcji, gdyż ładunek ujemny cząsteczki wytworzony po oderwaniu protonu jest zbyt duży i powoduje destabilizację cząsteczki. Poza tym grupa fosfonowa ma geometrię tetraedryczną; podczas, gdy grupa fosfinowa ma strukturę planarną podobną do geometrii grupy karboksylowej (Faleev *et al.*, 2000).

Blisko węgla α znajdują się reszty lizyn 257 i 256 (znajdującej się również w pobliżu skmpleksowanego kationu jednowartościowego, który może obniżyć pK_a grupy aminowej), hydroksyle tyrozyn 71 i 291, grupa amidowa glutaminy 98 i guanidynowa argininy 100, oraz cząsteczka wody, która może być zasadą odszczepiająca proton (Sundararaju *et al.*, 1997). Reszta histydyny 343 silnie konserwowana ewolucyjnie jest istotna dla deprotonacji. Znajduje się ona blisko reszty lizyny 257 wiążącej PLP w holoenzymie.

Mutant TPL H343A wykazuje gorsze własności katalityczne (niższe są stała katalityczna, jak i jej stosunek do stałej Michaelisa) od enzymu dzikiego typu. Jest to efektem destabilizacji układu PLP-substrat powstałego po oderwaniu protonu. Wspomniany mutant również słabiej katalizuje wymianę izotopową protonu pozycji α z wodą deuterowaną. Efekty izotopowe $^1H/^2H$ w pozycji 2 na stałą katalityczną i jej stosunek do stałej Michaelisa są niezależne od pH w enzymie typu dzikiego, podczas gdy inaczej jest w białku zmutowanym. Wspomniane efekty są wtedy wyższe, albowiem mutacja zmienia wpływ poszczególnych etapów na sumaryczną szybkość reakcji. Wolniej zachodzi oderwanie protonu, a szybsze jest jego przyłączenie. Kompleks zmutowany enzym – substrat ma kontakt z rozpuszczalnikiem. Stąd wynika zależność maksymalnej szybkości katalitycznej od pH. Zmutowane białko wykazało także dużo niższą absorpcję przy 500nm po dodaniu PLP i substratu, niż enzym niezmutowany. Te dane pozwalają przypuszczać, że reszta histydyny w pozycji 343 nie jest niezbędna do zajścia reakcji, ale jej rola prawdopodobnie polega na ułatwieniu zmian konformacyjnych w enzymie po związaniu substratu.

Prawdopodobnie ta reszta histydyny ulega inaktywacji podczas reakcji z DEPC (Chen *et al.*, 1995a). Do 1 cząsteczki enzymu może się dowiązać nawet 8 reszt etyloksykarbonylowych, ale taki enzym jest nieaktywny. Natomiast po związaniu 2 reszt fenololiaza tyrozynowa zachowuje dużą część swej aktywności. Reszty etyloksykarbonylowe wiążą się do reszt histydyn, albowiem tylko taka modyfikacja jest odwracalna dodaniem hydroksyloaminy.

TPL zmodyfikowany dwoma resztami etyloksykarbonylowymi wiąże kofaktor i substrat, ale nie katalizuje odszczepienia protonu z pozycji α, co objawia się brakiem pasma absorpcji przy 500nm. Natomiast jest ono obecne podczas przeprowadzania reakcji odwrotnej do rozkładu tyrozyny, choć L-tyrozyna nie jest syntetyzowana. Nie jest również katalizowana

wymiana protu z pozycji α substratu na tryt pochodzący z wody. Dowodem na obecność reszty histydyny w centrum aktywnym enzymu jest utrudniona modyfikacja za pomocą DEPC w obecności PLP i alaniny wskutek utrudnionego dostępu reagenta do reszty histydyny. Zdolność tworzenia zasady Schiffa PLP-substrat jest niższa w przypadku zmodyfikowanego TPL – być może wskutek zmian konformacyjnych lub częściowej inaktywacji grupy ε-aminowej reszty lizyny w centrum aktywnym (Kumagai *et al.*, 1975).

Redukując kompleks enzym-substrat $NaBH_4$ zauważono, że redukcja, podobnie jak wiązanie substratu, zachodzi głównie po stronie *si* względem atomu węgla w pozycji 4' PLP. Po takiej redukcji uzyskano pirydoksynową pochodną tyrozyny. Podobne eksperymenty wykonano dla D- i L-alaniny. *si*-selektywność redukcji była podobna dla obydwu enancjomerów alaniny. Może to wynikać z szybkiego deprotonowania atomu węgla w pozycji α, co powoduje szybką racemizację alaniny. Taka selektywność jest też niższa dla TPL, niż dla innych białek katalizujących reakcje z udziałem PLP. Może to świadczyć o większej swobodnej przestrzeni w centrum aktywnym. Jest to możliwa przyczyna stosunkowo dużego spektrum substratów TPL (Palcic *et al.,* 1987).

Fluoropochodne tyrozyny tworzą chinoidowy produkt przejściowy z różnymi szybkościami; takie różnice wynikają z przyczyn elektronowych jak i sterycznych, gdyż pierścień aromatyczny ulega przemieszczeniu podczas oderwania protonu z pozycji α wskutek zmiany geometrii cząsteczki substratu (Phillips *et al.*, 1997).

Pasmo przy 500nm pojawia się także w reakcji z *o*- i *m*-L-tyrozyną, 3',5'-dijodo-L-tyrozyną, 3'-jodo-L-tyrozyną (Nagasawa *et al.*, 1981), L-homoseryną, L- i D-tryptofanem, kwasem L-asparaginowym i L-glutaminowym, oraz aminokwasów o nienaładowanej grupie bocznej, ale żaden z tych substratów nie jest rozkładany (Faleev *et al.*, 1988).

Fakt, że *N*-tlenek PLP i 2'-hydroksy-PLP są gorszymi kofaktorami (niższe wartości stałej katalitycznej, większe stałej Michaelisa) od samego PLP, także potwierdza postulowany przebieg procesu rozkładu tyrozyny przez liazę tyrozyna-fenol. Jest to efektem większej elektroujemności tych pochodnych i zwiększonej stabilizacji kompleksu enzym-substrat, oraz utrudnienia odszczepienie protonu z pozycji α (Kumagai *et al.*, 1973).

Dzięki możliwości odrywania protonu z pozycji α liaza tyrozyna-fenol katalizuje racemizację niektórych aminokwasów; zarówno D-, jak i L-izomerów. Świadczy to o dużej ruchliwości zasady odrywającej proton i zasady Schiffa względem siebie. Enzym bowiem reagując z obydwoma stereoizomerami działa po obydwu stronach płaszczyzny zasady Schiffa (Palcic *et al.*, 1987). Badając racemizację [2-^{2}H]-L-alaniny katalizowaną przez TPL. Palcic *et al.,* 1987, zauważyli, że 3% deuteru pozostaje w powstałym D-izomerze. Proces racemizacji

składa się ze związania substratu, wytworzenia karboanionu (następuje to nieco szybciej dla L-izomeru); obrotu adduktu PLP-substrat w centrum aktywnym, co umożliwia związanie protonu po drugie stronie płaszczyzny i racemizację; oraz oddysocjowania substratu. Oderwanie protonu jest najwolniejszym etapem podczas racemizacji alaniny (Chen & Phillips, 1993).

Etap odszczepiania protonu jest postulowany jako jeden z najwolniejszych w całym procesie enzymatycznej degradacji L-tyrozyny. Świadczą o tym pierwszorzędowe efekty izotopowe $^{2}H/^{1}H$ w pozycji α. Dla TPL wyizolowanego z *C. freundii* efekt na V_{max} wynosi 3.5 (3.2; wg Faleev *et al.*, 1988), a efekt na V_{max}/K_m 2.5. Efekty te są niezależne od pH, podobnie, jak szybkości maksymalne. Oznacza to, że L-tyrozyna nie dysocjuje z kompleksu enzym-substrat wolniej, niż ulega reakcji rozkładu. Enzym uzyskany z *E. herbicola* również wykazuje pierwszorzędowe efekty izotopowe $^{2}H/^{1}H$ w pozycji α, ale są one, podobnie jak szybkość maksymalna, zależne od pH. Efekty kinetyczne wynoszą od 2.5 (w pH 9.5) do 4.1 (pH 6.5) na V_{max}, a efekty na V_{max}/K_m odpowiednio od 1.5 do 4.1 (Kiick & Phillips, 1988). W nieobecności aktywujących kationów jednowartościowych odszczepienie protonu nie jest najwolniejszym etapem procesu (Sundararaju *et al.*, 2000).

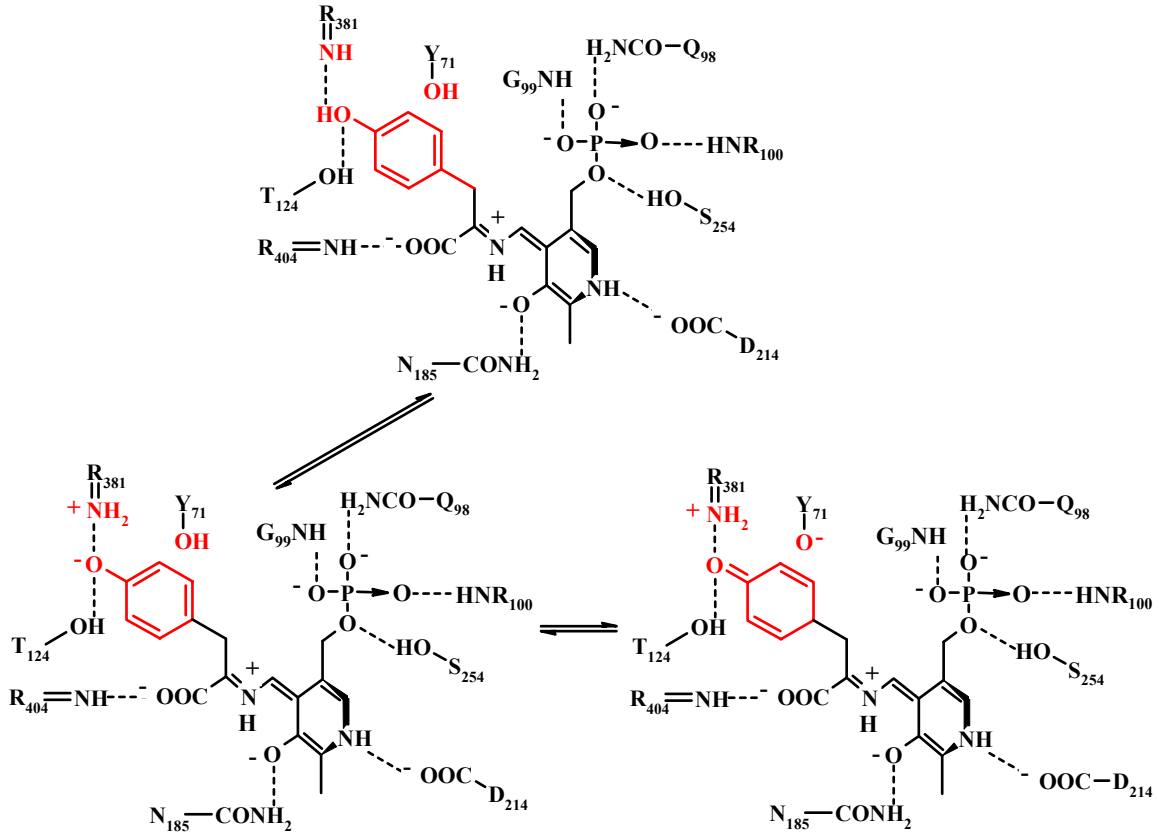
Szybkość reprotonacji na węglu α nie jest wrażliwa na podstawienie izotopowe, co świadczy o szybkiej wymianie oderwanego protonu z rozpuszczalnikiem. Efekt izotopowy wodoru w pozycji α w wodzie deuterowanej jest niższy, niż w zwykłej, co może świadczyć o spowolnieniu przekształcenia chinoidowego produktu pośredniego w produkty przez deuter (Faleev *et al.*, 1996a).

Ubocznym, choć bardzo wolnym procesem (czas połowicznego przereagowania 10h), jest rozpad chinoidowego produktu przejściowego powstałego po deprotonacji na kwas 3-(*p*-hydroksyfenylo)-pirogronowy i 5'-fosforan pirydoksaminy. Mutanty T124A, T124D/F448H i F448H przeprowadzają taką reakcję uboczną wolniej od natywnego białka, co może świadczyć o pewnej subtelnej zmianie konformacyjnej w centrum aktywnym (Demidkina *et al.*, 2002).

Równocześnie ze związaniem substratu i oderwaniem protonu z pozycji α przez liazę tyrozyna-fenol zachodzi konformacyjne zamknięcie substratu w centrum aktywnym. Taka zmiana nie powodowała jednak naruszenia sieci krystalicznej podczas reakcji z krystalicznym TPL (Phillips *et al.*, 2002). Odszczepienie protonu w pozycji α umożliwia i ułatwia dalszy przebieg procesu katalitycznego.

2.1.2.5. Protonowanie atomu węgla 1' – tworzenie cykloheksadienonowego produktu pośredniego

Następnym etapem jest protonowanie atomu węgla aromatycznego związanego z resztą alaninową L-tyrozyny (Schemat 5).



Schemat 5. Tworzenie pochodnej cykloheksadienonowej.

Proton może być przeniesiony przenoszony z atomu węgla w pozycji α, w wyniku tej reakcji reszta fenolowa przekształca się w układ cykloheksadienonowy, który absorbuje światło o długości fali 497nm, ale to pasmo jest maskowane przez absorpcję zasady Schiffa PLP-substrat; oraz przy 315nm (widoczne tylko w widmach CD), które zanika w miarę inkubacji substratu z enzymem uzyskanym z *E. herbicola* i kofaktorem (Demidkina *et al.*, 1987). Transfer nie jest procesem jednoetapowym, co wynika z porównania efektów izotopowych $^{1}H/^{2}H$ w pozycji α do efektu rozpuszczalnikowego (1.5 na V_{max} i 1.8 na V_{max}/K_m dla enzymu z *C. freundii*, Barbolina *et al.*, 2000; 1.7 na V_{max} dla enzymu z *E. herbicola*; Faleev *et al.*, 1996a).

Stwierdzono maksymalnie 25% przeniesienia używając [2-^{2}H]-L-tyrozyny jako substratu. W układzie odwrotnym (tj. L-tyrozyna w wodzie deuterowanej) nie stwierdzono przeniesienia protonu z pozycji α na atom węgla w pozycji 1'. Może to świadczyć o położeniu *syn* protonu α i grupy fenolowej względem siebie. D-tyrozyna również ulega

degradacji z udziałem TPL, ale czterokrotnie wolniej. Może to również potwierdzać postulat o dużej ruchliwości zasady i układu PLP-substrat względem siebie (Palcic *et al.*, 1987).

Transfer protonu jest prawdopodobnie katalizowany przez tę samą zasadę, która odrywa proton z pozycji α, ale udział w przeniesieniu może brać jeszcze jedna zasada (np. reszta lizyny 256 lub 257; Chen & Phillips, 1993) o pK_a 8.0 (TPL z *C. freundii*) – 8.2 (z *E. herbicola*; Kiick & Phillips, 1988). Protonowanie układu aromatycznego jest katalizowane przez resztę tyrozyny w pozycji 71 enzymu (Sundararaju *et al.*, 2000), jego bliskość jest konieczna do zajścia reakcji, gdyż *o*-L-tyrozyna nie ulega rozkładowi, choć teoretycznie mogłoby to być możliwe. Przestrzenna bliskość powinna ułatwiać ten proces. Zamiana reszty tyrozyny 71 na resztę fenyloalaniny powoduje utratę aktywności katalitycznej białka względem L-tyrozyny, ale białko zachowuje ją dla *S*-alkilo- i –arylo-L-cystein, *O*-benzoilo-L-seryny i 3-chloro-L-alaniny – związków posiadających dużo lepsze grupy opuszczające niż układ fenolowy, oraz posiadające znacznie niższe pK_a, a więc łatwo ulegające protonowaniu przez rozpuszczalnik (Chen *et al.*, 1995b; Phillips *et al.*, 1997). *O*-acylo-L-seryna jest lepszym substratem niż *O*-alkilo-L-seryna (pK_a grup karboksylowych wynosi około 5, a alkoholi około 16). Podobnie *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteina (pK_a *o*-nitrotiofenolu wynosi 5.2) jest bardzo dobrym substratem dla TPL (Phillips, 1987). Zmieniony enzym stosunkowo szybko odrywa proton, natomiast o szybkości reakcji decyduje eliminacja (Chen *et al.*, 1995b; Phillips *et al.*, 1997). W pobliżu atomu węgla γ znajduje się też cząsteczka wody (może być donorem protonu) i reszta argininy 100 (Sundararaju *et al.*, 1997).

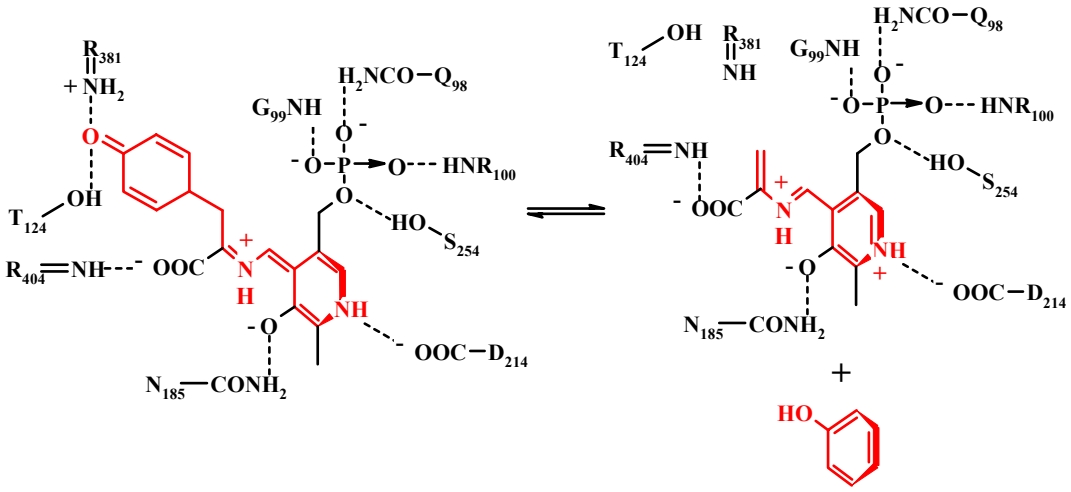
Reszty argininy 381 i treoniny 124 wiążą grupę hydroksylową fenolu wiązaniem wodorowym (Faleev *et al.*, 2000). Asparagina w pozycji 185 wpływa na łatwość tworzenia grupy cykloheksadienonowej (Barbolina *et al.*, 2000), które nie jest procesem synchronicznym. Prawdopodobnie najpierw następuje odszczepienie protonu fenolowego przez resztę argininy. Następnie fenolan tworzy wiązanie wodorowe z grupą hydroksylową treoniny (te dwa procesy mogą zachodzić synchronicznie; udział treoniny może być niezbędny ze względu na osłabioną zasadowość grupy guanidynowej argininy w hydrofobowym centrum aktywnym). Dzięki temu reszta aromatyczna zajmuje pozycję umożliwiającą dołączenie wodoru do atomu węgla 1' (Faleev *et al.*, 2003).

Transfer protonu przekształca resztę hydroksyfenylową w układ cykloheksadienonowy. Jest on znacznie lepszą grupą odchodzącą niż układ aromatyczny. Być może reakcja eliminacji przebiega według mechanizmu substytucji elektrofilowej dwucząsteczkowej, gdzie pochodna cykloheksadienonowa jest stanem przejściowym, a nie produktem pośrednim (jak to ma miejsce w reakcji typu Friedla-Craftsa; Phillips *et al.*, 2003).

Przekształcenie w keton jest utrudniane poprzez podstawienie (np. fluoru) w pozycji *orto* względem grupy hydroksylowej; podczas gdy podstawienie w pozycji *meta* daje efekt odwrotny, a nie wpływa istotnie na odszczepienie protonu (Phillips *et al.*, 1997). Usunięcie grupy hydroksylowej z pozycji *para*, zmiana jej położenia, lub metylacja hydroksylu uniemożliwia zajście reakcji. *o*- i *m*-L-tyrozyna nie ulegają rozkładowi, choć tworzą zasadę Schiffa z PLP. Zdeprotonowanie hydroksylu fenolowego ułatwia tworzenie grupy cykloheksadienonowej poprzez wzmocnienie własności nukleofilowych atomu węgla w pozycji 1'. Może to również być przyczyną mniejszej szybkości eliminacji w niskich pH (Sundararaju *et al.*, 1997). 2'- i 3'-aza-L-tyrozyna nie ulegają eliminacji, gdyż atom azotu w pierścieniu bardzo utrudnia uprotonowanie atomu węgla (Watkins & Phillips, 2001b). Jodopochodne tyrozyny nie ulegają rozkładowi, gdyż wskutek zmian hybrydyzacji na wspomnianym atomie węgla zmienia się geometria cząsteczki i duży podstawnik jodowy uniemożliwia ich zajście (Faleev *et al.*, 1988).

2.1.2.6. Eliminacja fenolu

Kolejnym etapem reakcji jest eliminacja fenolu (Schemat 6).



Schemat 6. Eliminacja fenolu

Rozerwanie wiązania węgiel-węgiel jest związane z przekształceniem układu cykloheksadienonowego w fenol. Dysocjacja wiązania jest ułatwiana przez prostopadłe ułożenie osi wiązania wobec płaszczyzny tworzonej przez PLP, atom azotu i atomu węgla w pozycji α L-tyrozyny. Taki układ wiązań w połączeniu ze stabilizacją rezonansową ładunku ujemnego ułatwia eliminację fenolu (Palcic *et al.*, 1987). Cząsteczka fenolu następnie układa się równolegle do płaszczyzny układu PLP-reszta alaniny (Chen & Phillips, 1993). Równocześnie następuje konformacyjna zmiana w centrum aktywnym liazy (Phillips, 1987).

Reszty treoniny 124 i argininy 381 tworzą wiązania wodorowe z grupą hydroksylową reszty fenolowej umożliwiając jej ustawienie niezbędne do zajścia *β*-eliminacji. Mutanty TPL T124D (asparagina może tworzyć wiązanie wodorowe, ale jest jego akceptorem, a nie donorem), T124A, F448H, T124A/F448H nie katalizują reakcji eliminacji, choć rozpoznają substrat oraz inhibitory, katalizują odszczepienie protonu w pozycji *α*, oraz eliminację dla związków z *S*-arylo- i -alkilo-L-cystein, oraz 3-chloro-L-alaniny podobnie do enzymu niezmutowanego (Demidkina *et al.*, 2002).

Prawdopodobnie właśnie etap eliminacji odpowiada za specyficzność substratową TPL, a nie sam proces rozpoznania substratu (Faleev *et al.*, 1988; Antson *et al.*, 1993). Dlatego też *O*-benzoilo-L-seryna jest dużo lepszym substratem dla TPL, niż *O*-acetylo-L-seryna, gdyż posiada ona pierścień aromatyczny znacznie obniżający barierę energetyczną podczas eliminacji dzięki większemu powinowactwu do centrum aktywnego enzymu. Stała Michaelisa *O*-acetylo-L-seryny jest mniejsza od tej wielkości dla pochodnej benzoilowej, co oznacza, że to etap eliminacji, a nie rozpoznanie substratu, decyduje o większej specyficzności w stosunku do pochodnej aromatycznej (Phillips, 1987).

Kinetyczny efekt izotopowy $^{11}C/^{14}C$ w pozycji 3 wynosi 1.07. Może to wskazywać na to, że etap eliminacji fenolu również jest etapem wpływającym istotnie na szybkość całego procesu (Axelsson *et al.*, 1992). Innym dowodem na znaczenie tego etapu jest niewielki efekt $^{1}H/^{2}H$ na V_{max} w pozycji 3, klasyczny dla zmian hiperkonjugacji (Faleev *et al.*, 1996a).

Steryczne dopasowanie reszty aromatycznej do centrum enzymu decyduje o tym, który etap będzie decydował o szybkości reakcji. Jeśli struktura tej części jest mocno zaburzona, to etap eliminacji fenolu będzie decydował o szybkości reakcji. Jeśli zaś struktura reszty aromatycznej jest bliska optymalnej, wtedy o szybkości decyduje oderwanie protonu z pozycji. Kationy jednowartościowe przyspieszają eliminację (Sundararaju *et al.*, 2000).

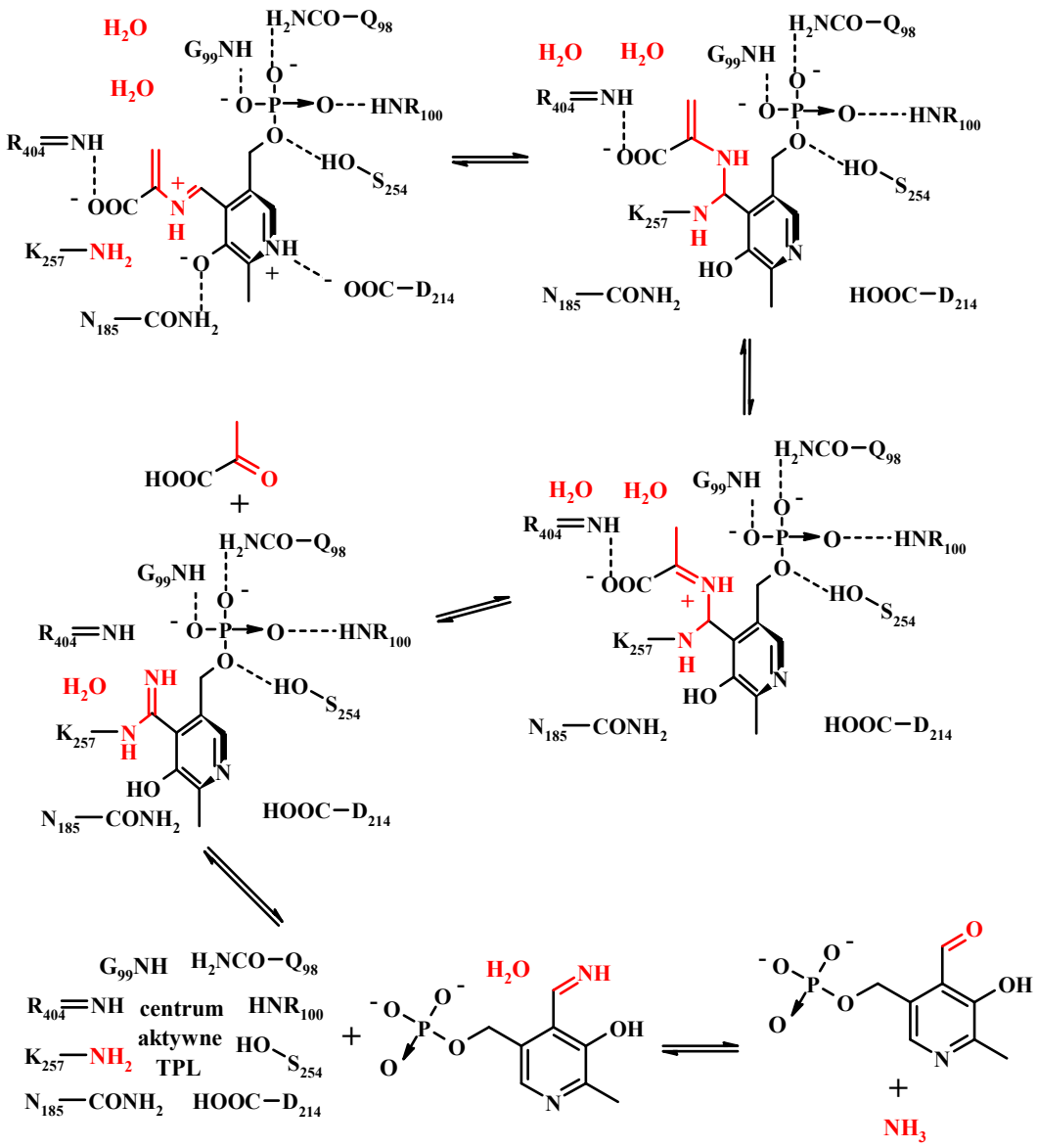
Wszelkie procesy rozrywania i tworzenia wiązań katalizowane przez TPL zachodzą po stronie *si* (względem atomu węgla w pozycji 4' PLP) adduktu kofaktor-substrat.

2.1.2.7. Przekształcenie adduktu *α*-aminoakrylan – PLP w produkty

Eliminacja fenolu powoduje przekształcenie alifatycznej części cząsteczki tyrozyny w *α*-aminoakrylan związany z PLP. W reakcji rozkładu L-tyrozyny ulega on hydrolizie do pirogronianu (poprzez atak cząsteczki wody na atom węgla w pozycji *α* aminoakrylanu, odszczepienie od PLP i tautomeryzację do pirogronianu; Schemat 7).

PLP jest odszczepiany jako zasada Schiffa utworzona z amoniakiem dając pasmo absorpcji przy 325nm pojawiające się podczas reakcji. Następnie ten addukt ulega hydrolizie

do PLP i amoniaku. Oddysocjowanie amoniaku i pirogronianu również może być jednym z najwolniejszych etapów całego procesu (Chen *et al.*, 1995a).



Schemat 7. Powstawanie produktów z α-aminoakrylanu

Addukt α-aminoakrylan-PLP jest wiązany przez fenol, dzięki temu fenol jest inhibitorem mieszanym eliminacji (Phillips, 1987; Chen & Phillips, 1993). Kinetyczne efekty izotopowe na tworzenie adduktu α-aminoakrylan-PLP można obserwować w obecności 4-hydroksypirydyny (R. S. Phillips, prywatne doniesienie).

Zasada Schiffa PLP-α-aminoakrylan może również przyłączyć różne grupy do atomu węgla w pozycji β. Taki proces zachodzi z retencją konfiguracji na tym atomie. Jest ona niezależna od konfiguracji na atomie węgla w pozycji α. Asymetria procesu świadczy o tym, że zachodzi on w centrum aktywnym enzymu.

Przyłączonym atomem może być atom wodoru, jak podczas racemizacji alaniny. Badając ten proces dla izomeru L w wodzie deuterowanej zauważono, że powstająca

D-alanina zawiera deuter w pozycji β; i że wszystkie cząsteczki D-alaniny zawierające deuter w tej pozycji, zawierają go również w pozycji α. Jest to zrozumiałe, gdyż przyłączenie do atomu węgla w pozycji β zachodzi po odszczepieniu protonu w pozycji α.

Podczas rozkładu L-seryny stwierdzono racemizację na atomie węgla w pozycji β. Do badań użyto [3*R*-^{3}H]- i [3*S*-^{3}H],[U-^{14}C]-L-serynę, a reakcje prowadzono w wodzie deuterowanej. W jej wyniku powstaje pirogronian z chiralnym atomem węgla w pozycji β podstawionym trzema izotopami wodoru (Palcic *et al.*, 1987).

Grupą atakującą addukt PLP-α-aminakrylan może też być grupa fenolowa. Badano wymianę takiej grupy w reakcji [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny z rezorcynolem, w której to powstaje L-2',4'-dopa. Stwierdzono retencję konfiguracji na atomach węgla w pozycjach α i β. Podczas syntezy L-tyrozyny z L-seryny i fenolu stwierdzono analogiczną retencję konfiguracji.

Potwierdzeniem zaproponowanego mechanizmu działania TPL było przeprowadzenie reakcji odwrotnej do rozkładu L-tyrozyny w wodzie deuterowanej. Deuter ulegał włączeniu w pozycję β powstałej (po dodaniu fenolu) L-tyrozyny po uprzedniej inkubacji pirogronianu z TPL w wodzie deuterowanej. Bez takiej preinkubacji nie stwierdzono włączenia deuteru w pozycji β. W obydwu wypadkach deuter był włączany w pozycję α. W takiej reakcji z TPL wiążą się kolejno: PLP, amoniak, pirogronian i fenol (Sawada *et al.*, 1975).

Wiedzę o tym mechanizmie wykorzystano do bardzo eleganckiej konstrukcji enzymu katalizującego rozkład aminokwasów dwukarboksylowych (kwas L-asparaginowy, L-glutaminowy i L-2-aminoadypinowy). Stwierdzono istnienie strukturalnej analogii TPL i aminotransferazy asparaginianowej. Po analizie sekwencji ewolucyjnie konserwowanych uzyskano enzym – analog TPL o specyficzności na aminokwasy dwukarboksylowe. Mutanty TPL R100T/R283I, oraz także R100T katalizują reakcje rozkładu takich aminokwasów, np. kwasu asparaginowego do pirogronianu i mrówczanu. Modyfikacja w pozycji 283 umożliwia bardziej dogodne położenie grupy karboksylowej łańcucha bocznego substratu, co ułatwia eliminację (Mouratou *et al.*, 1999).

Opisany mechanizm działania fenololiazy tyrozynowej nie jest jeszcze do końca poznany. Wyjaśnia on dobrze duże spektrum substratów i reakcji katalizowanych przez ten enzym. Dalsze informacje na temat mechanizmu działania TPL można zdobyć wyznaczając kinetyczne efekty izotopowe na atomach węgla i wodoru w cząsteczce L-tyrozyny.

2.2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla i wodoru

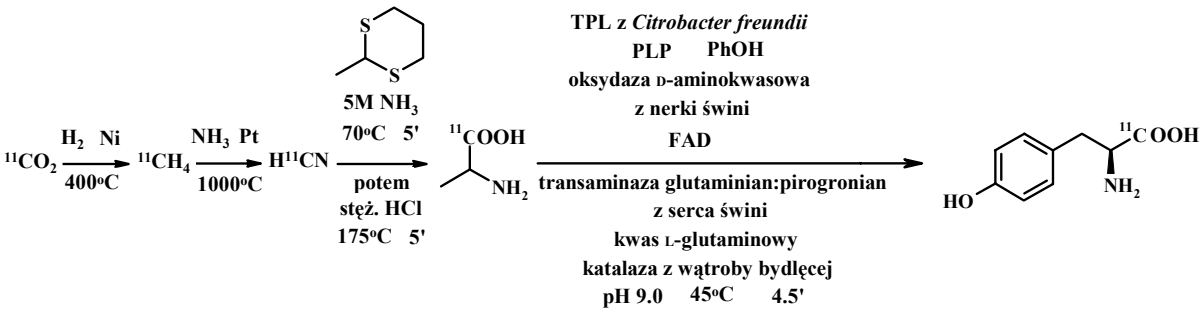
W literaturze opisano kilka metod syntezy znakowanej L-tyrozyny. Kluczowym etapem takich syntez było zawsze wygenerowanie centrum stereogenicznego o konfiguracji (*S*) na atomie węgla w pozycji 2. Najczęściej używano biokatalizatorów do stereoselekcji.

2.2.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla

2.2.1.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w grupie karboksylowej

2.2.1.1.1. Synteza [1-^{11}C]- i [1-^{13}C]-L-tyrozyny

Syntezę przedstawioną na Schemacie 8 (Bjurling *et al.*, 1990a) wykonano dla celów tomografii pozytonowej. Z tego powodu nie określano wydajności reakcji. Istotne było otrzymanie pewnej ilości związku o bardzo wysokiej radioaktywności właściwej w możliwie krótkim czasie.



Schemat 8. Synteza [1-^{11}C]-L-tyrozyny

$^{11}CO_2$ otrzymano w tandemowym akceleratorze van der Graffa w wyniku przemiany (p, α) podczas bombardowania tarczy N_2 protonami o energii 10 MeV.

Etap stereoselekcji przeprowadzono enzymatycznie za pomocą TPL, który katalizuje reakcję syntezy L-tyrozyny z racemicznej alaniny poprzez kwas pirogronowy powstający na dwa sposoby: z L-alaniny w wyniku działania transaminazy glutaminian:pirogronian; oraz z D-alaniny w wyniku działania oksydazy D-aminokwasowej.

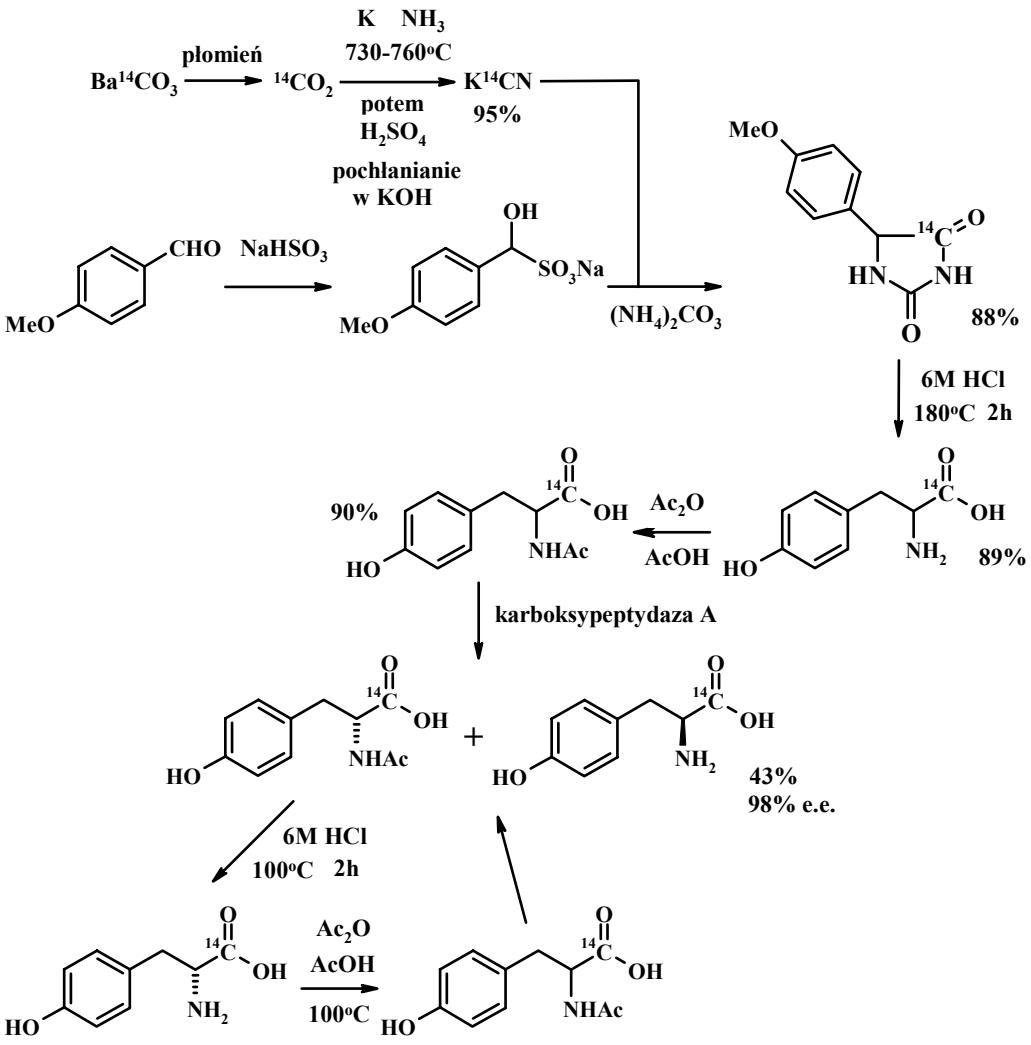
Podobną reakcję przeprowadzono dla izotopologu ^{13}C L-tyrozyny wychodząc z H^{13}CN stosując w kwas 2-oksoglutarowy zamiast kwasu L-glutaminowego w etapie enzymatycznym i wydłużając czas syntezy alaniny do 15 minut, oraz czas etapu enzymatycznego do 10 minut.

Ze względu na niskie wydajności syntezy nie nadaje się ona do zastosowania w tej pracy.

2.2.1.1.2. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny

Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny opublikowana przez Loftfielda i Eigner (1966; Schemat 9) została wykonana poprzez syntezę racemicznego aminokwasu, a następnie przez

enancjoselektywną hydrolizę otrzymanej racemicznej *N*-acetylotyrozyny za pomocą karboksypeptydazy A hydrolizującej selektywnie pochodną o konfiguracji (*S*). Niezhydrolizowaną D-acetylopochodną można przekształcić w racemiczną *N*-acetylotyrozynę i zawrócić do reakcji hydrolizy.



Schemat 9. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny

Cała synteza dała dobrą wydajność w czterech etapach – 30% z K^{14}CN, jest to metoda, którą można potencjalnie zastosować w mojej pracy.

2.2.1.2. Synteza L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pozycji 2

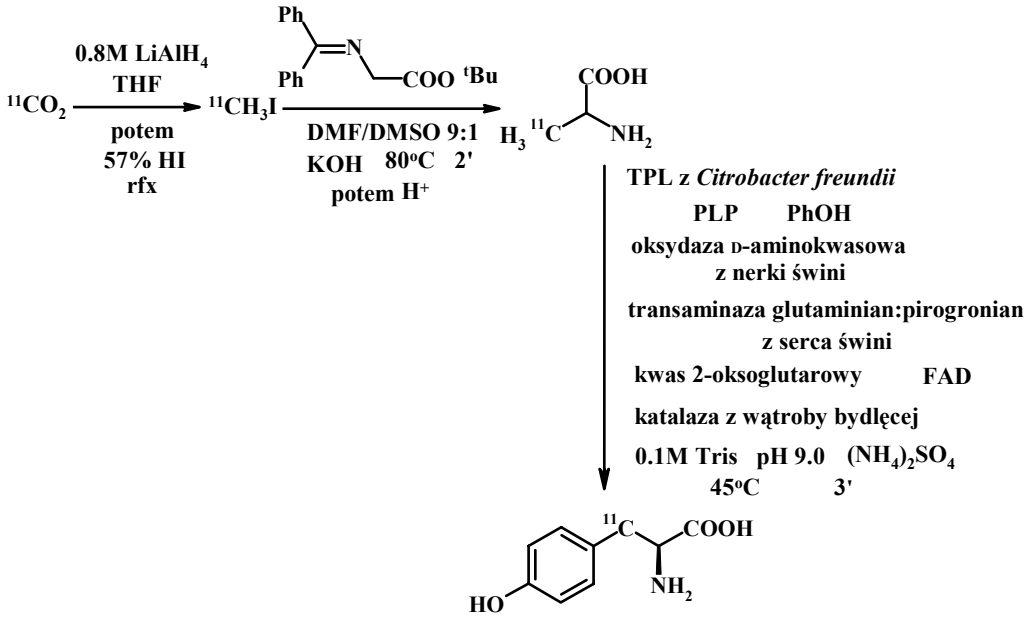
Szczegóły tej syntezy zostaną opisane w podrozdziale 2.2.2.2.2. (Oba *et al.*, 1995) na przykładzie znakowania deuterem. W cytowanej pracy otrzymano podwójnie znakowaną L-tyrozynę – oprócz znacznika węglowego wprowadzano też znaczniki deuterowe w pozycjach 2 i 3*S* lub 3*R*. W syntezie znakowanej w pozycji 2 L-tyrozyny związkiem wyjściowym była [2-^{13}C]-*N*-acetyloglicyna.

W jej wyniku uzyskano znakowaną węglem w pozycji L-tyrozynę z dobrą wydajnością (19%) w czterech etapach. Taka metoda syntezy także potencjalnie mogła znaleźć zastosowanie w tej pracy.

2.2.1.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w pozycji 3

2.2.1.3.1. Enzymatyczna synteza [3-^{11}C]- i [3-^{13}C]-L-tyrozyny

Syntezę [3-^{11}C]-L-tyrozyny (Bjurling *et al.*, 1990b; Axelsson *et al.*, 1992; Schemat 10) wykonano na potrzeby tomografii pozytonowej, wydajności syntezy były bardzo niskie. Podobnie do syntezy [1-^{11}C]-L-tyrozyny (2.2.1.1.1.) użyto reakcji multienzymatycznej celem przekształcenia racemicznej alaniny w L-tyrozynę.

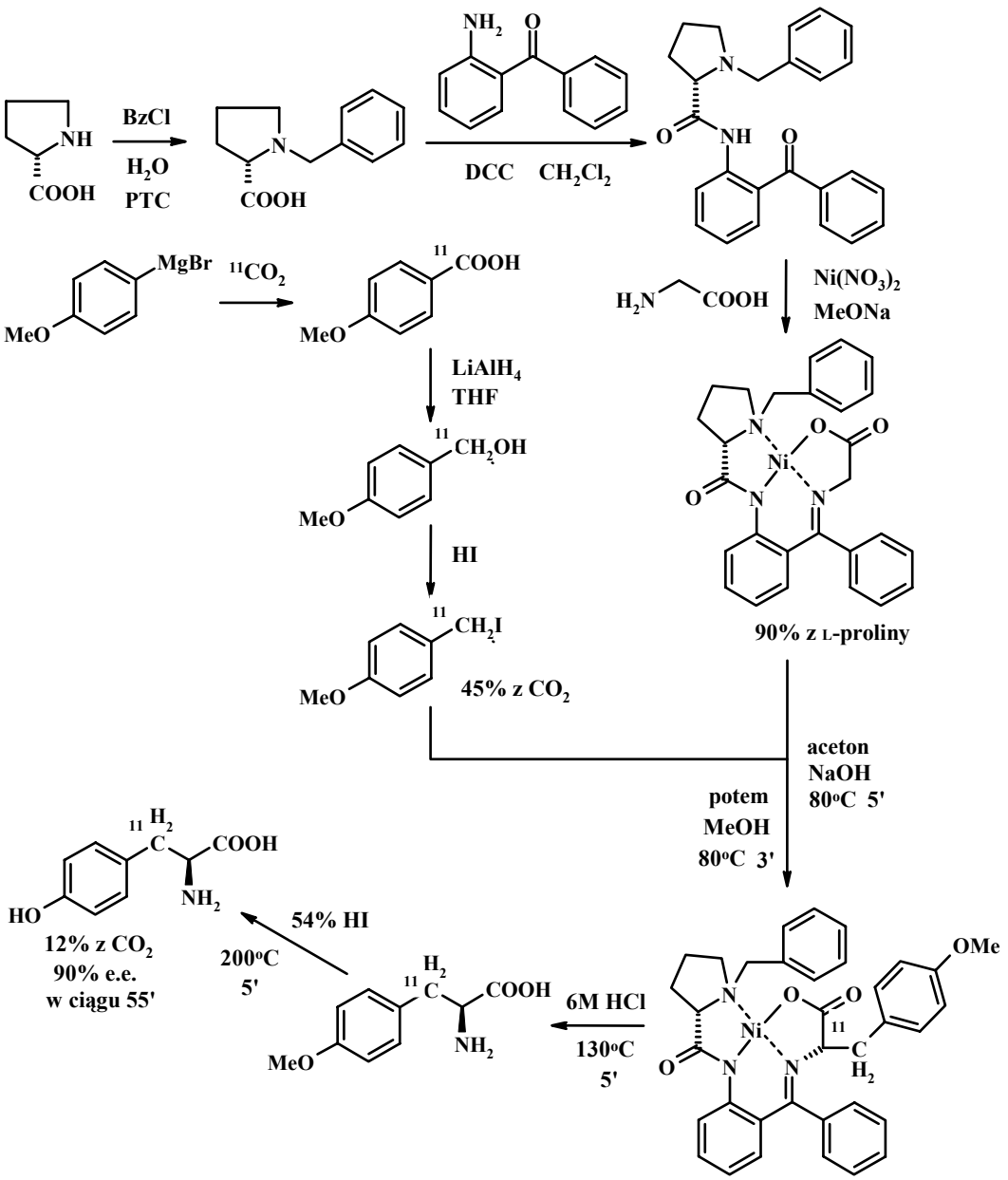


Schemat 10. Synteza [3-^{11}C]-L-tyrozyny

W podobny sposób wykonano też syntezę [3-^{13}C]-L-tyrozyny wydłużając czas syntezy alaniny do 10 minut, a etap enzymatyczny do 20 minut.

2.2.1.3.2. Synteza [3-^{11}C]-L-tyrozyny za pomocą katalizatora chiralnego

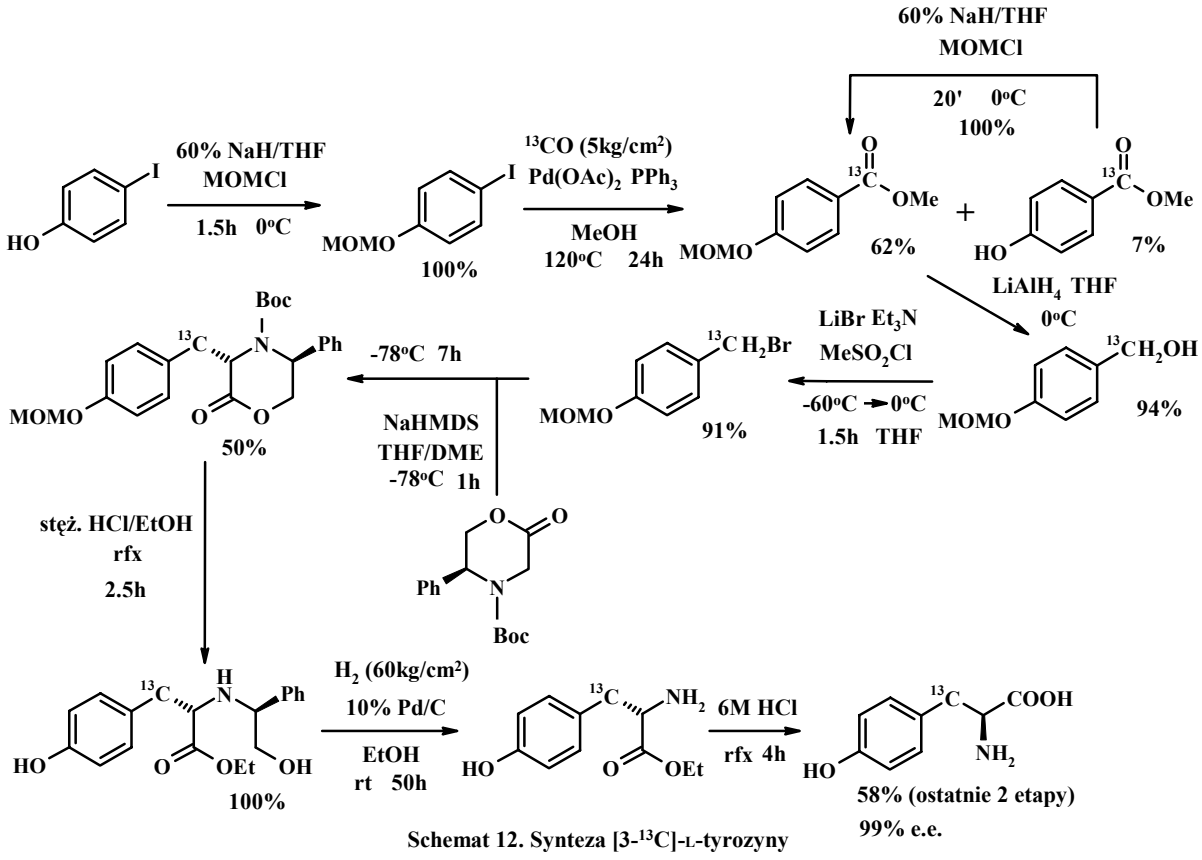
Fasth & Langstrom (1990) opisali syntezę [3-^{11}C]-L-tyrozyny w której do stereoselekcji wykorzystali otrzymany przez siebie chiralny kompleks niklu (Schemat 11), który ulegał stereoselektywnemu alkilowaniu otrzymanym jodkiem [1-^{11}C]-*p*-metoksybenzylowym. W sześciu etapach licząc od $^{11}CO_2$ uzyskano przyzwoitą wydajność 12%. Taka metoda nie znalazłaby jednak zastosowania w mojej pracy, gdyż uzyskano 90% nadmiaru enancjomerycznego L-izomeru, a w badaniach kinetycznych efektów izotopowych konieczne są praktycznie 100% e.e.



Schemat 11. Synteza [3-^{11}C]-L-tyrozyny z użyciem chiralnego kompleksu niklu

2.2.1.3.3. Synteza [3-^{13}C]-L-tyrozyny z użyciem chiralnego oksazinonu

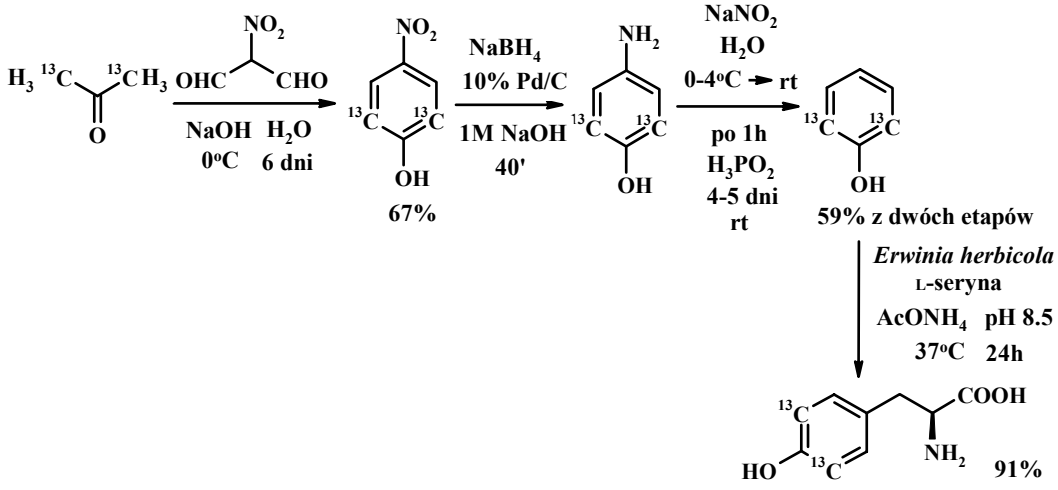
Ciekawym podejściem do syntezy [3-^{13}C]-L-tyrozyny jest praca Takatori *et al.*, 1998, w której stereoselekcja zachodzi na etapie alkilowania chiralnego oksazinonu zablokowanym jodkiem [1-^{13}C]-*p*-hydroksybenzylowym (Schemat 12). Ta metoda syntezy nie może mieć zastosowania w mojej pracy, gdyż wymaga użycia dużego nadmiaru znakowanego CO jako źródła izotopu, a dodatkowo synteza jest wieloetapowa i czasochłonna.



Schemat 12. Synteza [3-^{13}C]-L-tyrozyny

2.2.1.4. Synteza L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pozycjach 3',5' i 4'

W syntezie L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pierścieniu aromatycznym Walker *et al.*, 1986, wykorzystali fakt, że komórki *Erwinia herbicola* zawierające TPL katalizują reakcję syntezy L-tyrozyny z fenolu i seryny. Uprzednio otrzymali oni odpowiednio znakowane izotopomery fenolu. Schemat 13 przedstawia syntezę [3',5'-$^{13}C_2$]-L-tyrozyny. Podobnie uzyskano [4'-^{13}C]-L-tyrozynę wychodząc z [2-^{13}C]-acetonu. Wydajność syntezy [1-^{13}C]-*p*-nitrofenolu wyniosła 73%, a jego przekształcenie w [1-^{13}C]-fenol zaszło z 60% wydajnością.



Schemat 13. Synteza [3',5'-$^{13}C_2$]-L-tyrozyny

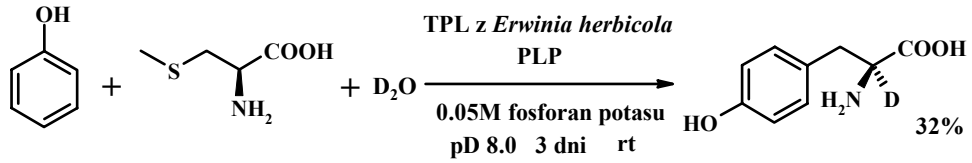
Przedstawiona metoda syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w pierścieniu aromatycznym daje dobrą, 40% wydajność reakcji w czterech etapach. Taka metoda mogłaby znaleźć duże zastosowanie w mojej pracy, jednak nie opisuje ona znakowania węglem w interesujących mnie pozycjach.

2.2.2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru

2.2.2.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2

2.2.2.1.1. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny katalizowana przez fenololiazę tyrozynową

W syntezie [2-^{2}H]-L-tyrozyny za pomocą TPL wykorzystano fakt, że podczas reakcji odwrotnej do rozkładu L-tyrozyny proton w pozycji 2 jest pobierany z rozpuszczalnika (Kiick & Phillips, 1988; Schemat 14). Dobra wydajność (32%) w połączeniu z prostą procedurą oczyszczania przez krystalizację i z tym, że synteza jest jednoetapowa, sprawia, że ta metoda będzie bardzo użyteczna podczas moich eksperymentów.



Schemat 14. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny

2.2.2.1.2. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny

Podczas syntezy [2-^{3}H]-L-tyrozyny Battersby *et al.*, 1980 (Schemat 15), wykorzystali racemizację aminokwasu jako metodę wprowadzenia znacznika trytowego w pozycję 2, a stereoselekcja polegała na wybiórczej, enzymatycznej hydrolizie *N*-(chloroacetylo)-tyrozyny za pomocą karboksypeptydazy, enzymu hydrolizującego tylko *N*-acylowe pochodne L-aminokwasów. Metoda ta mogłaby znaleźć zastosowanie w mojej pracy, daje ona 33% wydajności w trzech etapach.

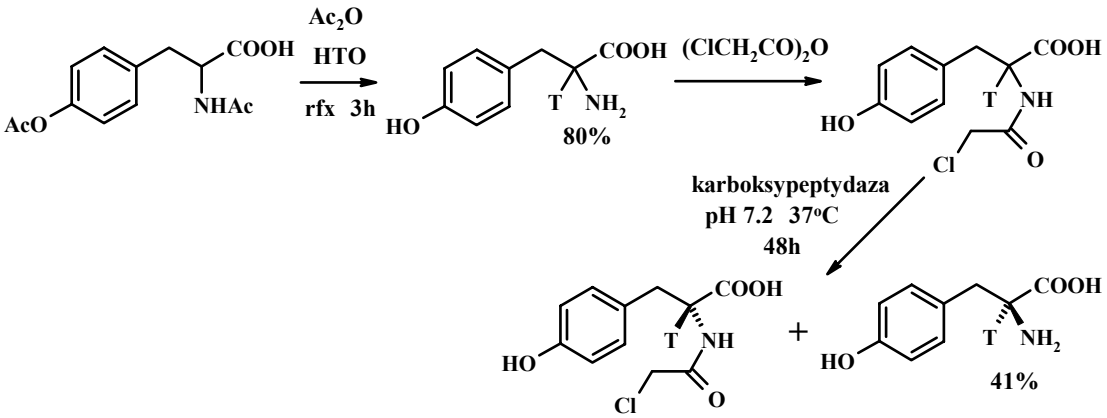
2.2.2.2. Synteza L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3

2.2.2.2.1. Synteza [3*R*-^{2}H i -^{3}H]-L-tyrozyny

W syntezie L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3*R* opracowanej przez Kirby'ego i Michaela, 1973 (Schemat 16), stereoselekcja polega na katalitycznej *cis*-addycji wodoru do α-amidopochodnej-α,β-nienasyconego kwasu, a następnie na enzymatycznej hydrolizie *N*-(chloroacetylo)-tyrozyny za pomocą karboksypeptydazy, która hydrolizuje tylko acylopochodne L-aminokwasów. Metoda ta jest pracochłonna

i wieloetapowa (9 przejść syntetycznych), daje wydajności poniżej 20%. Taka droga syntezy mogłaby być zastosowana w mojej pracy.

Stosując tę metodę autorzy pracy otrzymali także trytowy izotopolog zsyntetyzowanej tyrozyny.



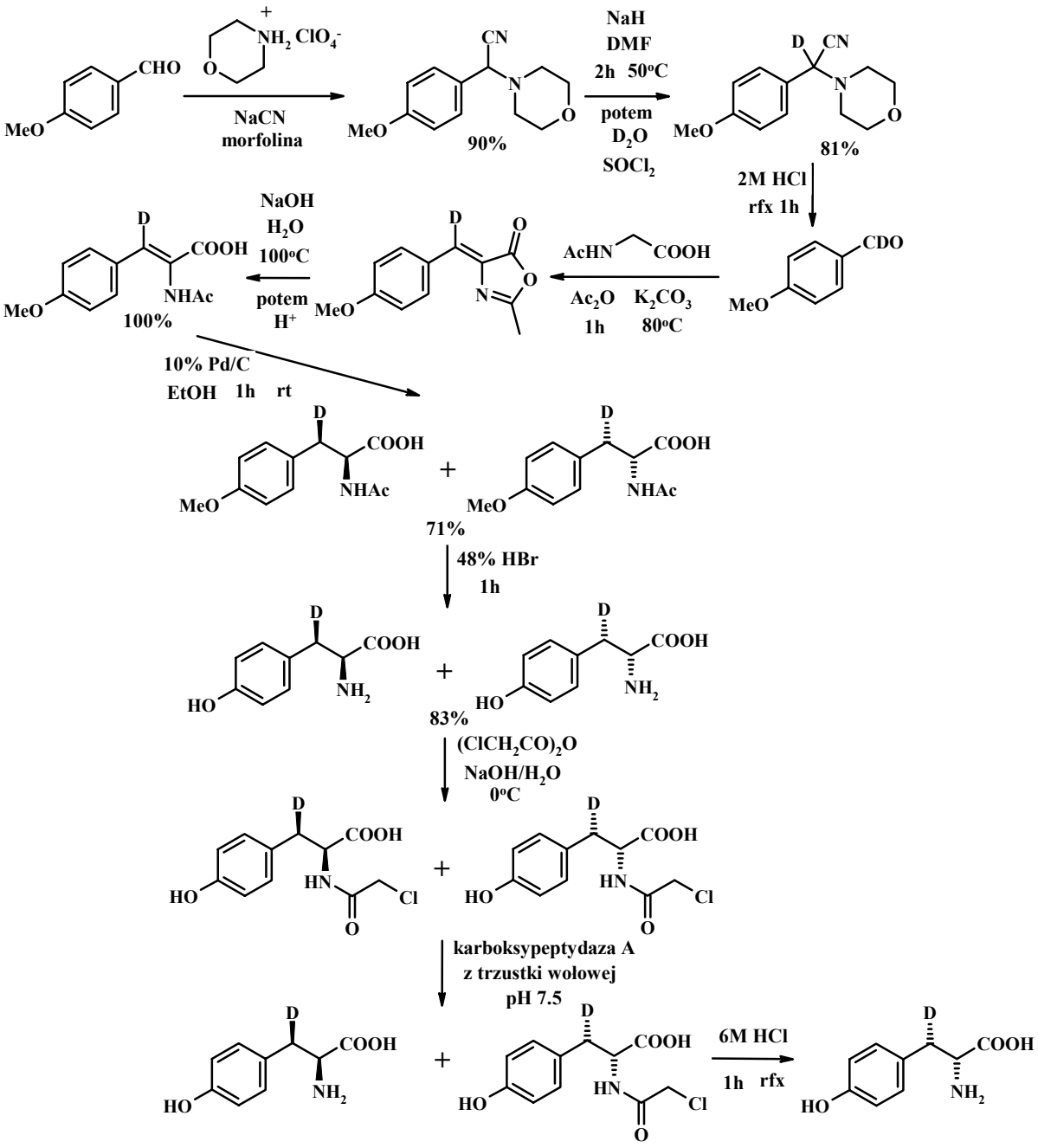
Schemat 15. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny

2.2.2.2.2. Synteza [2,3*R* i *S*-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny

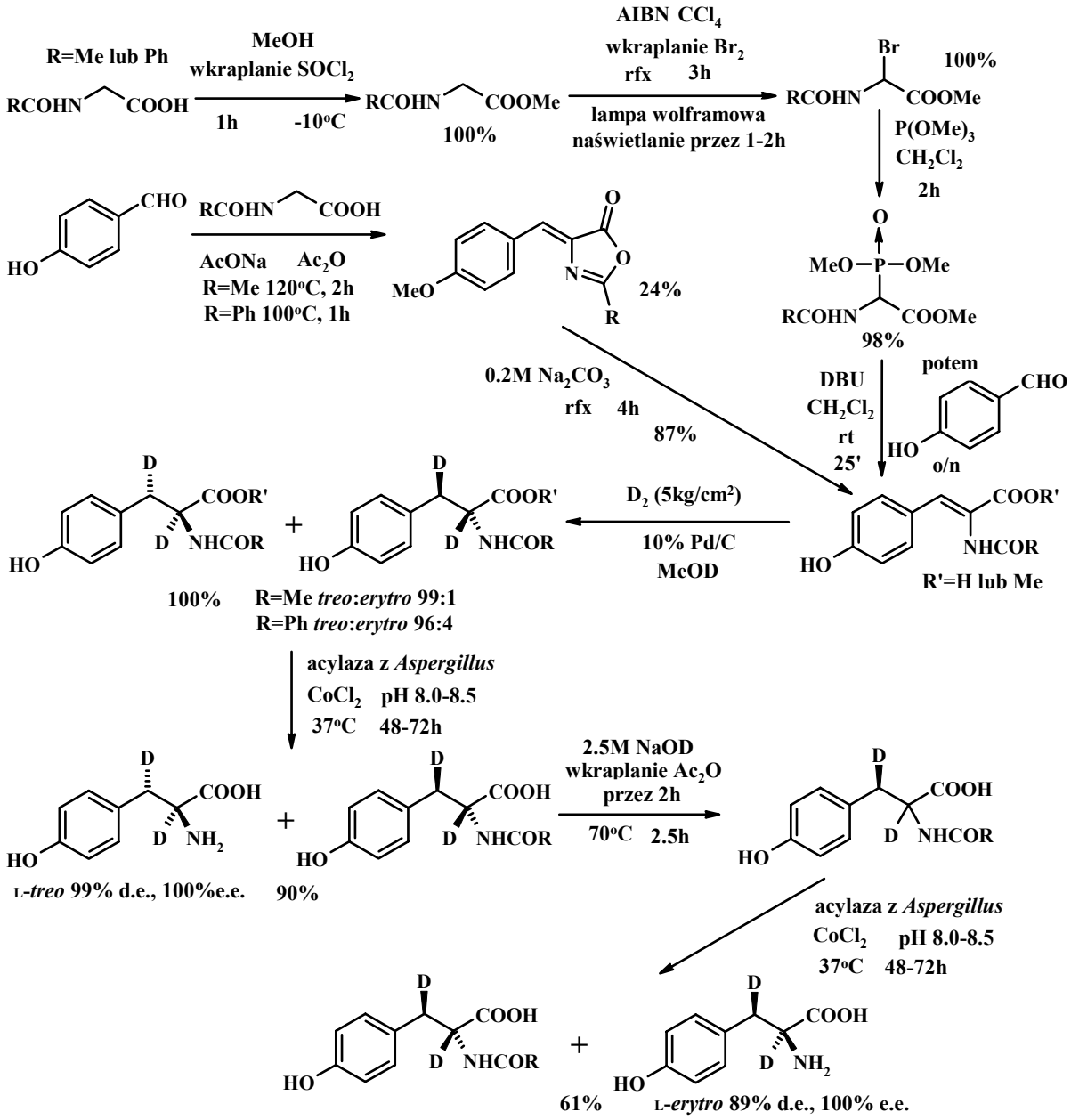
W syntezie [2,3-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny Oba *et al.*, 1995 (Schemat 17), zastosowali etapy stereoselekcji podobne do metody Kirby'ego (2.2.2.2.1.) – tj. *cis*-addycję deuteru do olefiny i następnie enzymatyczną hydrolizę *N*-acylo-L-tyrozyny w otrzymanym racemacie. W ten sposób otrzymano [2,3S-$^{2}H_2$]-L-tyrozynę w dwuetapowej syntezie (licząc od włączenia izotopu) z dobrą wydajnością 45%. [2,3*R*-$^{2}H_2$]-L-tyrozynę otrzymano z niezhydrolizowanej acylopochodnej izomeru D poprzez racemizację na atomie 2, a następnie podobną selektywną enzymatyczną hydrolizę *N*-acylo-L-tyrozyny. Produkt miał nieco gorsze własności stereochemiczne (89% d.e.), został otrzymany z 14% wydajnością w czterech etapach od momentu włączenia izotopu.

Podobnie otrzymano analogiczne izotopomery deuteru znakowane dodatkowo ^{13}C w pozycji 2.

Opisana metoda syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru nie znajdzie zastosowania w mojej pracy, gdyż wymaga ona pracy z gazowym deuterem lub trytem (operacje z takim gazem są bardzo ryzykowne).



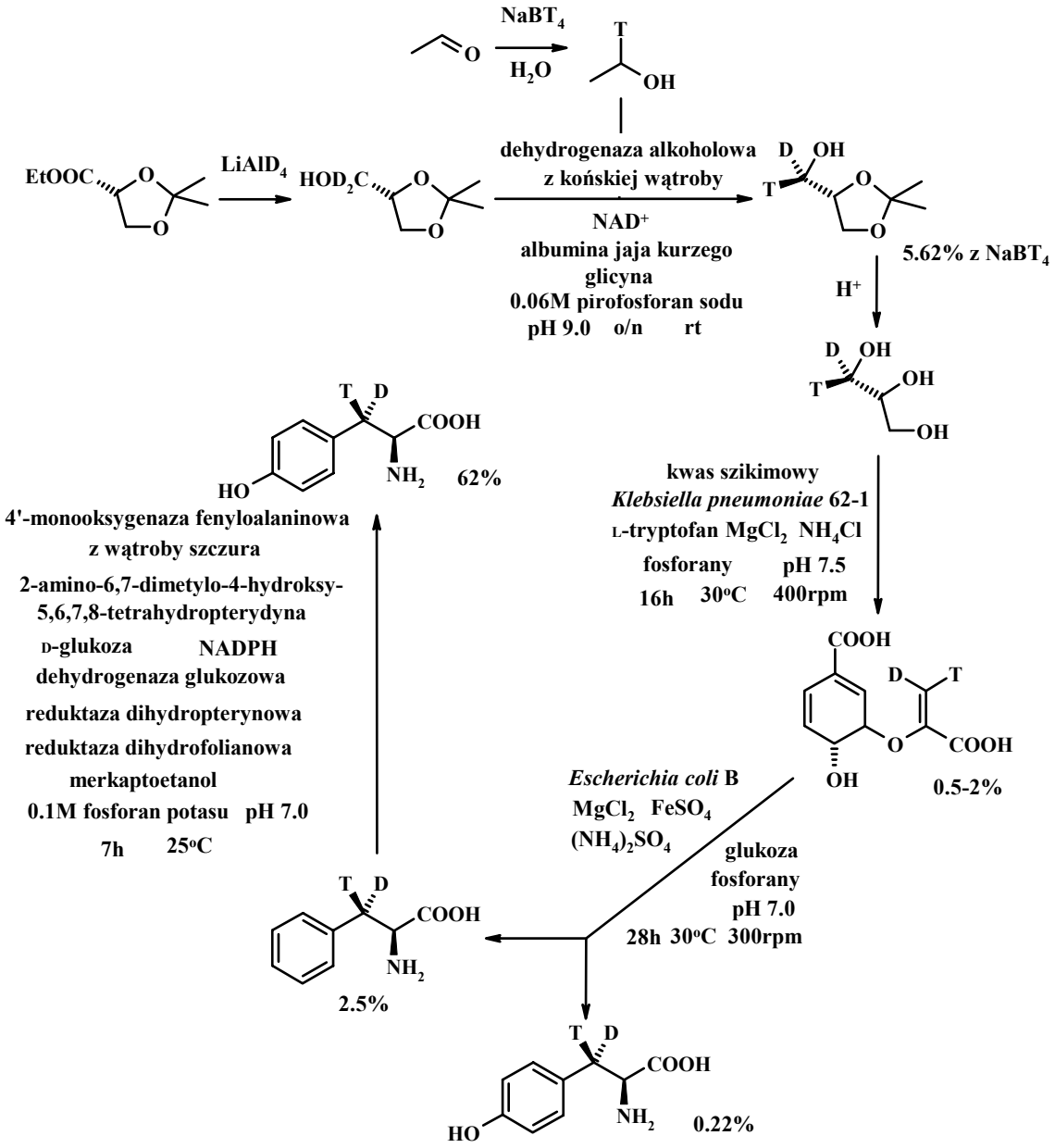
Schemat 16. Synteza [3R-^{2}H]-L-tyrozyny



Schemat 17. Synteza [2,3*S*-$^2H_2$]- i [2,3*R*-$^2H_2$]-L-tyrozyny

2.2.2.2.3. Biosynteza [3*R*-^{2}H,^{3}H]-L-tyrozyny

W syntezach równomiernie znakowanych związków biologicznie czynnych duże zastosowanie mają metody biosyntetyczne. Podając organizmowi odpowiednie substraty można jednak uzyskać selektywnie znakowane związki biologicznie czynne. Takiej metody syntezy [3*R*-^{2}H,^{3}H]-L-tyrozyny użyli Asano *et al.*, 1985 (Schemat 18), w badaniach stereochemii biosyntezy aminokwasów aromatycznych. Stosując kombinowane metody chemiczne, enzymatyczne i mikrobiologiczne otrzymali oni znakowaną L-tyrozynę, jak i L-fenyloalaninę, którą przekształcali w L-tyrozynę za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej.



Schemat 18. Biosynteza [3*R*-^{2}H,^{3}H]-L-tyrozyny

Wadą metod biosyntetycznych są niskie wydajności radiochemiczne. W tym wypadku uzyskano [3*R*-^{2}H,^{3}H]-L-tyrozynę z wydajnością 2*10^{-3}%. Z tego względu opisana metoda nie będzie stosowana w mojej pracy.

2.2.2.3. Synteza L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pierścieniu aromatycznym

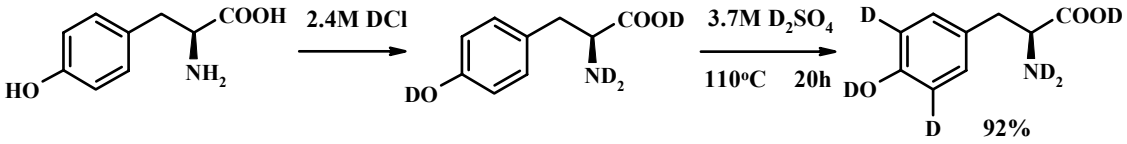
2.2.2.3.1. Synteza [2', 3',5',6'-^{2}H$_4$]-L-tyrozyny

Syntezę [2',3',5',6'-^{2}H$_4$]-L-tyrozyny przeprowadzono podobnie do syntezy L-tyrozyny znakowanej ^{13}C w pierścieniu aromatycznym (2.2.1.4.) używając [^{2}H$_6$]-fenolu jako źródła izotopu (Walker *et al.*, 1986), który podczas reakcji z L-seryną w obecności fenololiazy

tyrozynowej daje pożądany produkt w jednym etapie z 91% wydajnością. Takie podejście syntetyczne będzie bardzo użyteczne w mojej pracy.

2.2.2.3.2. Synteza [3',5'-$^2H_2$]-L-tyrozyny

Park *et al.*, 1991, wykorzystali możliwość łatwej wymiany izotopowej protonów w pozycji *orto* względem grupy hydroksylowej w środowisku kwaśnym w cząsteczce L-tyrozyny do znakowania tego aminokwasu deuterem w tej pozycji (Schemat 19). Ten prosty, dwuetapowy proces (początkowa wymiana labilnych protonów z wodą deuterowaną, a następnie właściwa wymiana izotopowa) daje wysokie, 92% wydajności i duże wzbogacenie w deuter w pozycji 3',5'. Ta metoda także będzie przeze mnie stosowana w pracy.



Schemat 19. Synteza [3',5'-$^2H_2$]-L-tyrozyny

2.2.2.3.3. Synteza [2',6'-$^2H_2$]-L-tyrozyny

Do syntezy [2',6'-$^2H_2$]-L-tyrozyny Nishiyama *et al.*, 1994, wykorzystali kombinację opisanych powyżej metod syntezy L-tyrozyny znakowanej w pierścieniu aromatycznym. Najpierw otrzymali metodą mikrobiologiczną [2',3',5',6'-$^2H_4$]-L-tyrozynę z [$^2H_6$]-fenolu, a następnie wymienili deuteronów w pozycji 3',5' pierścienia na protony w wyniku ogrzewania z wrzącym 6M HCl w ciągu 6. godzin. Podany sposób daje dobre wydajności L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2',6' w dwóch etapach i także znajdzie zastosowanie w mojej pracy.

2.3. Kinetyczne efekty izotopowe w badaniach mechanizmów reakcji enzymatycznych

Kinetyczny efekt izotopowy (KIE) definiuje się jako stosunek szybkości reakcji substratu zawierającego izotop lżejszy do szybkości z substratem zawierającym izotop cięższy. Wielkość KIE zależy od względnej różnicy mas obydwu izotopów, im jest ona większa tym większych KIE można się spodziewać. Wartość efektu zależy także od tego, czy atom, na którym badany jest KIE, jest zaangażowany w tworzenie lub rozrywanie wiązania podczas reakcji. Jeśli tak jest, wtedy mamy do czynienia z efektem pierwszorzędowym, jeśli nie – z drugorzędowym.

Efekty pierwszorzędowe są większe od drugorzędowych. Efekty pierwszorzędowe są normalne (tzn. większe od 1, i tym wyższe im silniejsze jest rozrywane wiązanie chemiczne), natomiast efekty drugorzędowe mogą być również odwrotne (tzn. mniejsze od 1). Należy pamiętać, że efekt izotopowy obserwujemy wtedy, gdy występuje on podczas jednego z etapów decydujących o szybkości reakcji (tzn. najwolniejszych).

Źródłem efektów są różnice we własnościach atomów i wiązań tworzonych przez izotopy. Na te własności składają się ruchy translacyjne, wibracyjne, rotacyjne, oraz właściwości elektronowe cząsteczki. Wynikają one z różnic w bezwładności cząsteczek wskutek różnych mas, oraz w energiach drgań normalnych i wzbudzonych. Istnieje kilka głównych teorii efektów izotopowych, np. teoria efektów równowagowych, teoria stanu przejściowego (Melander & Saunders, 1980; Truhlar *et al.*, 1983) i jej rodzaj – teoria Marcusa (Albery, 1980), czy też teoria mechaniki kwantowo-statystycznej (German *et al*., 1980). Teoretyczne aspekty efektów izotopowych są obecnie silnie eksplorowane.

W reakcjach enzymatycznych zwykle określa się kinetyczne i rozpuszczalnikowe efekty izotopowe na dwa parametry reakcji:

1. szybkość maksymalną (V_{max}) – czyli *de facto* na stałą katalityczną reakcji (k_{cat}), najczęściej ten efekt opisuje pierwszy etap nieodwracalny. Ten efekt jest mały, jeśli oddysocjowanie produktu od enzymu jest dużo wolniejsze od przekształcenia substratu w produkt;
2. stosunek szybkości maksymalnej do stałej Michaelisa (V_{max}/K_m, lub k_{cat}/K_m), ten efekt opisuje etapy od związania substratu do pierwszego etapu nieodwracalnego. Jest on bliski 1, jeśli oddysocjowanie substratu od enzymu jest dużo wolniejsze od przekształcenia substratu w produkt. Wartość k_{cat}/K_m zależy od stężeń substratów stosowanych w eksperymentach.

   Jeśli obserwuje się KIE na:

1. k_{cat}/K_m, a nie na k_{cat}, to oznacza, że badany atom gra istotną rolę w wiązaniu enzymu z substratem;
2. k_{cat}/K_m i k_{cat}, to znaczy, że badany atom gra ważną rolę w przekształceniu kompleksu enzym – substrat w kompleks enzym – produkt;
3. k_{cat}, a nie na k_{cat}/K_m, to badany atom jest istotny w rozpadzie kompleksu enzym – produkt (Northrop, 1975).

Należy pamiętać o tym, że KIE w reakcjach wielosubstratowych może zależeć od stężenia substratów. Jeśli mierzy się efekt w jednym z nich, musi on być w stężeniu wysycającym enzym w odróżnieniu od pozostałych substratów. Zmiany ich stężeń mogą powodować zmianę KIE, największą jeśli zmienia się stężenie ostatniego z substratów dołączanego w trakcie reakcji (Parkin, 1991).

2.3.1. Eksperymentalne podejścia do badania kinetycznych efektów izotopowych

Z punktu widzenia eksperymentatora metody wyznaczania KIE można podzielić na:

1. konkurencyjne – polegające na pomiarze różnicy w szybkości reakcji dla związków znakowanych obydwoma izotopami w mieszaninie tych związków; tą metodą można wyznaczyć tylko KIE na k_{cat}/K_m. Inhibitory zwykle nie wpływają na wielkość KIE, choć spowalniają reakcję (w równym stopniu dla związków znakowanych różnymi izotopami);
2. niekonkurencyjne – polegające na niezależnych pomiarach parametrów kinetycznych oddzielnie dla każdego ze znakowanych związków; tak można wyznaczyć efekty zarówno na k_{cat}/K_m jak i na k_{cat}. Wymogiem metody jest uzyskanie substratów o jak najwyższych (zbliżonych do 100%) wzbogaceniach w izotop. Jeśli wzbogacenie jest istotnie niższe, można użyć równania (1) do aproksymacji KIE obserwowanego dla wzbogacenia p (α_p) do KIE dla 100% podstawienia (α).

$$\alpha_p = \frac{\alpha - 1 + p}{p} \qquad (1)$$

Obecność inhibitorów uniemożliwia wykonanie pomiaru KIE, gdyż eksperymenty dla związków znakowanych różnymi izotopami są wykonywane niezależnie (Parkin, 1991).

2.3.1.1. Pomiar kinetycznych efektów izotopowych metodą konkurencyjną

W metodzie konkurencyjnej do określenia KIE konieczne jest zmierzenie wzajemnej zawartości izotopu lżejszego do izotopu cięższego w wyjściowym substracie (R_0) oraz

w produkcie reakcji (R_p) powstałym po pewnym, także zmierzonym, stopniu przereagowania f. KIE jest opisywany przez równanie Bigeleisena i Wolfsberga (2):

$$\alpha = \frac{\ln(1 - f * \frac{R_p}{R_0})}{\ln(1 - f)} \tag{2}$$

KIE należy mierzyć dla możliwie niskich stopni przereagowania, gdyż efekt kinetyczny objawia się najbardziej w początkowych etapach reakcji (wtedy zawartość izotopów w nieprzereagowanym substracie jest bliska wyjściowej; przy dużych przereagowaniach również izotop reagujący wolniej ulegnie przekształceniu w produkty, gdyż występuje we względnie większej ilości niż w wyjściowym substracie, efekt w 100% przereagowania wynosi 1).

Dla stopni przereagowania mniejszych od 20% można KIE wyznaczyć z bezpośredniego porównania zawartości izotopów w wyjściowym substracie i w produkcie pomijając równanie Bigeleisena (Paneth, 1985).

Do pomiarów KIE metodą konkurencyjną stosuje się głównie metody radiochemiczne, które pozwalają na określenie KIE dla izotopów niestabilnych. Aktywność właściwa jest w tej metodzie równoważnikiem względnej zawartości izotopów w związku. Aby ją wyznaczyć należy bardzo dokładnie określić aktywność wydzielonych reagentów, oraz oznaczyć ich ilość. Bardzo często używa się metody podwójnego znakowania, np. mierząc KIE dla trytu warto wprowadzić znacznik ^{14}C w pozycję nie biorącą bezpośredniego udziału podczas reakcji, gdzie efekt izotopowy jest bardzo bliski 1 i dużo mniejszy od efektu wodoru. Radiometria pozwala zmierzyć równolegle aktywność trytu i węgla-14. Znacznik węglowy służy tu jako miara ilości związku (znacznik pilotowy).

Tong i Yankwich (1964) używając równania Bigeleisena i Wolfsberga wyprowadzili wzory opisujące wielkość KIE przy zastosowaniu aktywności właściwych wyrażonych jako ilość izotopu cięższego do ilości izotopu lżejszego dla wyjściowego substratu (R_0), produktu (R_p), odzyskanego substratu (R_s) i stopnia przereagowania f (równania 3,4,5,6).

$$\alpha = \frac{\ln(1 - f * \frac{R_0 + 1}{R_p + 1})}{\ln[1 - \frac{R_p * f * (R_0 + 1)}{R_0 * (R_p + 1)}]} \approx \frac{\ln(1 - f * \frac{R_0}{R_p})}{\ln(1 - f)} \tag{3}$$

$$\alpha = \frac{\ln \frac{(1 - f) * (R_0 + 1)}{R_s + 1}}{\ln \frac{R_s * (1 - f) * (R_0 + 1)}{R_0 * (R_s + 1)}} \approx \frac{\ln \frac{(1 - f) * R_0}{R_s}}{\ln(1 - f)} \tag{4}$$

$$\alpha = \frac{\ln[\frac{1}{1-f} - \frac{f*(R_p - R_s)}{(1-f)*(R_p+1)}]}{\ln[\frac{1}{1-f} - \frac{f*(R_p - R_s)}{(1-f)*R_s*(R_p+1)}]} \approx \frac{\ln[\frac{1}{1-f} - \frac{f*(R_p - R_s)}{(1-f)*R_p}]}{\ln[\frac{1}{1-f} - \frac{f*(R_p - R_s)}{(1-f)*R_s*R_p}]} \quad (5)$$

$$\alpha = \frac{\ln \frac{R_p - R_0}{R_p - R_s}}{\ln \frac{(R_p - R_0)*R_s}{(R_p - R_s)*R_0}} \quad (6)$$

W każdym z równań występują tylko 3 z tych wielkości, nie ma więc konieczności mierzenia wszystkich wspomnianych parametrów. Pozwala to na pewną elastyczność podczas eksperymentów. Dla niższych stopni przereagowania największe dokładności wyznaczenia KIE uzyskuje się stosując równanie (3), dla konwersji około 50% - równanie (6). Przy założeniu, że to izotop promieniotwórczy jest cięższy od izotopu stabilnego (jak to najczęściej ma miejsce), oraz że ułamek atomów izotopu cięższego jest znikomy w porównaniu z ilością izotopu stabilnego, można zastosować podane uproszczenia równań 3-5.

Aby uzyskać wiarygodne wyniki pomiarów radioaktywności aktywność trytu musi być przynajmniej 3 razy wyższa od aktywności węgla-14. Wynika to z charakterystyki promieniowania obydwu izotopów, rozkład energii promieniowania β z ^{14}C nakłada się w około 35% na podobny rozkład ^{3}H w zakresie stosowanym podczas pomiarów aktywności ^{3}H (zbierającym 99.9% aktywności trytu), podczas gdy tryt nakłada się tylko w około 0.1% na mierzone promieniowanie ^{14}C (zbierające około 65% wszystkich zliczeń węgla-14). Dodatkową komplikacją jest także fakt gaszenia promieniowania przez niektóre związki. Nowoczesne liczniki scyntylacyjne uwzględniają zarówno nakładanie się zakresów promieniowania, jak i gaszenie promieniowania przez zastosowanie kalibracji na próbki zawierające różne ilości związków gaszących promieniowanie wewnętrznego wzorca licznika.

Zliczenia rozpadów promieniotwórczych są opisywane rozkładem Poissona. Aby pomiar radioaktywności próbki był wiarygodny należy zebrać przynajmniej 350 tys. zliczeń dla każdego izotopu, co pozwala uzyskać błąd pomiaru niższy od 0.25%. Warto uzyskać taką ilość zliczeń w kilku krótszych pomiarach celem uniknięcia błędu systematycznego możliwego podczas wykonywania tylko jednego długiego pomiaru.

W czasie doświadczenia należy zebrać przynajmniej 98% produktu i odzyskanego substratu, aby można było wiarygodnie określić ich radioaktywność. Unika się w ten sposób możliwości wystąpienia efektu izotopowego podczas oczyszczania. Najlepiej jest najpierw izolować (np. z kolumny chromatograficznej) produkt, a potem substrat.

Istotne jest wykonanie odpowiednich eksperymentów kontrolnych dla 0 i 100% przereagowania. Warto także sprawdzić KIE w pozycjach używanych jako znacznik pilotowy.

Radioaktywne zanieczyszczenia substratu uniemożliwiają przeprowadzenie wiarygodnych pomiarów KIE.

Wadą metody jest konieczność pracy ze związkami radioaktywnymi, a zaletą duża dokładność pomiarów (nawet do 0.3%; Parkin, 1991).

Metody radiochemiczne stosowano także do określenia efektów izotopowych na wiązanie substratu przez enzym (Lewis & Schramm, 2003). Należy wtedy zmieszać nadmiar enzymu ze znakowanym substratem (wygodnie jest użyć metody podwójnego znakowania) przy braku kofaktora lub innego substratu (tak aby nie zachodziła reakcja, lecz tylko wiązanie substratu). Następnie roztwór częściowo sączy się grawimetrycznie przez membranę przepuszczalną dla substratu, ale nie dla kompleksu enzym-substrat, i mierzy radioaktywności roztworów po obydwu stronach membrany, tzn. przesączonego (R_d) i nieprzesączonego (R_{nd}). Radioaktywność właściwą związanego substratu (R_p) uzyskuje się z równania (7):

$$R_p = \frac{R_{nd} - R_d * f}{1 - f} \qquad (7)$$

gdzie f to ułamek substratu związanego przez enzym wyznaczany z radioaktywności znacznika pilotowego w określonej objętości roztworu.

W metodzie konkurencyjnej pomiaru KIE stosuje się także inne techniki, np.:

1. spektroskopię NMR - jest szczególnie przydatna w badaniach efektów izotopowych $^1H/^2H$, albowiem w spektroskopii ^1H-NMR jądra deuteru nie są wykrywane. Aby określić procentową zawartość protu należy policzyć intensywność jego sygnału w stosunku do wzorca wewnętrznego. Dodatkową zaletą jest to, że technika ^1H-NMR daje możliwość wyznaczenia stopnia przereagowania (V. Anderson, prywatne doniesienie).
2. spektrometrię mas – daje możliwość wyznaczenia względnej zawartości obydwu izotopów wobec siebie poprzez porównania pola powierzchni pod pikami odpowiadającymi każdemu z izotopów. Podczas pomiarów należy pamiętać o tym, że należy tak ustawić aparaturę, aby piki były jak najmniej ostre, albowiem wtedy znacznie dokładniej można wyznaczyć pole powierzchni pod nimi. Szczególnym rodzajem użycia techniki MS w pomiarach KIE jest tzw. IRMS (*isotope ratio mass spectrometry*; aparatura jest dostosowana specjalnie do pomiarów izotopowych). Można go stosować dla reakcji, w wyniku których otrzymuje się dobrze zdefiniowane (pod kątem MS) produkty (głównie są to CO_2, N_2, AgCl, lub NH_3 – można go szybko przekształcić do N_2 za pomocą HBrO). Taki wymóg ogranicza możliwość stosowania IRMS, ale jego

zaletą jest duża dokładność pomiarów pozwalająca na pomiar efektów ciężkich jąder, tj. $^{12}C/^{13}C$, $^{14}N/^{15}N$, $^{16}O/^{18}O$, $^{35}Cl/^{37}Cl$. Dokładność ta sięga niekiedy 0.01%. W tego typu badaniach stosuje się związki o naturalnym składzie izotopowym pierwiastka w badanej pozycji, oraz monoizotopowe dla tego pierwiastka w pozostałych pozycjach. Względną zawartość izotopów uzyskaną podczas pomiarów odnosi się do standardu, którym jest badany związek o naturalnym składzie izotopowym (Weiss, 1991).

W każdej z tych technik podstawowe zasady wyznaczania KIE są podobne do metody radiometrycznej.

Ciekawym podejściem eksperymentalnym do pomiarów KIE jest metoda perturbacyjna. Jest to metoda konkurencyjna (umożliwia wyznaczenie KIE na k_{cat}/K_m, a także efektu równowagowego), gdzie mierzy się rożnicę w szybkości reakcji pomiędzy związkami znakowanymi badanymi izotopami. Należy sporządzić równowagową mieszaninę produktów i substratów, z których jedne są znakowane (o wzbogaceniu bliskim 100%), a drugie nie. Dodanie enzymu spowoduje pewne wychylenie od stanu równowagi spowodowane efektem izotopowym, po czym następuje powrót do nowego stanu równowagi. Metoda perturbacyjna znajduje duże zastosowanie dla badań nad racemazami, gdzie mieszanina równowagowa enancjomerów jest dobrze zdefiniowana jako 1:1 (Toney, 2003). Zwykle w tego typu pomiarach stosuje się spektrofotometrię UV-VIS, ale stosowano także polarymetrię (Bennott & Sinnott, 1986).

2.3.1.2. Pomiar kinetycznych efektów izotopowych metodą niekonkurencyjną

Metoda niekonkurencyjna polega na wykonaniu pomiarów kinetyki dla związków znakowanych badanymi izotopami.

Pomiary kinetyki stanu stacjonarnego reakcji (pozwalają one wyznaczyć KIE na początkowe szybkości reakcji) prowadzi się przygotowując typowo od 6 do 10 próbek zawierających różne stężenia substratu. Podczas przygotowania najlepiej jest sporządzić mieszaninę zwierającą bufor, kofaktory i enzym, a następnie rozpipetować ją na próbki tak, aby reakcję inicjowało dodanie różnych ilości substratu. Taka strategia pozwala na zminimalizowanie błędów pipetowania reagentów. Do pomiaru kinetyki najczęściej stosuje się spektrofotometrię UV-VIS. Jeśli żaden z substratów lub produktów reakcji nie posiada znaczącej absorpcji, można zastosować układ sprzężony, który z dużo większą szybkością od badanej reakcji (aby szybkość była limitowana tylko zachodzeniem głównej reakcji) nieodwracalnie przekształca któryś z produktów dając jednocześnie możliwość detekcji zmian.

Stężenia substratu dużo wyższe od K_m pozwalają na dość dokładne wyznaczenie k_{cat}, stężenia niższe sprzyjają bardziej dokładnym pomiarom k_{cat}/K_m. Reakcje przeprowadza się

równolegle. Po zmierzeniu szybkości reakcji należy optymalizować dane (szybkości reakcji dla odpowiadających im stężeń substratów) do równania kinetycznego. Najczęściej jest to równanie Michaelisa-Menten, które stosuje się dla enzymów działających wg kinetyki pierwszego lub pseudopierwszego rzędu. Wartość KIE uzyskuje się porównując parametry dla związków znakowanych badanymi izotopami.

Wadą metod niekonkurencyjnych są duże błędy eksperymentalne (zwykle około 5%), dlatego znajdują one zastosowanie dla pomiarów pierwszorzędowych efektów $^{1}H/^{2}H$. Zaletą jest możliwość uzyskania wielkości KIE na k_{cat}/K_m, jak i na k_{cat}.

Niezwykle użyteczne w eksperymentalnym wyznaczaniu pierwszorzędowych KIE wodoru są metody oparte o spektrofotometrię zatrzymanego przepływu. Pozwalają one na badanie reakcji zachodzących przed osiągnięciem stanu stacjonarnego reakcji enzymatycznej (w czasie rzędu milisekund). W ten sposób można wyznaczać efekty izotopowe w procesach asocjacji substratu z enzymem, jak i na początkowe etapy katalizy.

Innym podejściem jest badanie efektów izotopowych na pojedynczy cykl katalityczny. Można to osiągnąć dodając molowy nadmiar enzymu w stosunku do substratu. Można też dodać reagenta pułapkującego kompleks enzym-produkt po jednym cyklu katalitycznym. Ta metoda nadaje się tylko do pomiarów pierwszorzędowych efektów wodoru ze względu na duże błędy eksperymentalne (McFarland, 1991).

2.3.2. Interpretacja kinetycznych efektów izotopowych

Reakcje enzymatyczne charakteryzują się na ogół złożonością i wieloetapowością procesu katalitycznego. Do interpretacji KIE przydatna jest analiza poszczególnych etapów. W tym celu należy wyprowadzić równanie kinetyczne na szybkość reakcji. Jako przykład zostanie użyty najbardziej powszechny i najprostszy model reakcji enzymatycznej – model Michaelisa-Menten (Schemat 20).

$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} E + P$$

Schemat 20. Mechanizm kinetyczny reakcji enzymatycznej wg Michaelisa-Menten

Podany przykład zakłada odwracalny etap tworzenia kompleksu enzym-substrat (ES) z enzymu E i substratu S (etap charakteryzowany jest stałą k_1, i stałą jego rozpadu k_{-1}, stała dysocjacji tego kompleksu to stała Michaelisa, która jest równa ilorazowi k_{-1} i k_1) i następczy etap nieodwracalny (tzn. taki, który ma względnie dużą barierę energetyczną procesu; charakteryzowany stałą k_2).

Szybkość tworzeniu produktu (v) opisuje równanie Michaelisa-Menten (8):

$$v = \frac{k_{cat} * [S] * [E]}{(K_m + [S])} \tag{8}$$

Aby opisać wartość k_{cat}/K_m należy wiedzieć, że szybkość każdej reakcji cząstkowej to iloczyn stężeń substratów i stałej szybkości takiej reakcji. Celem obliczenia stężenia ES należy założyć stan stacjonarny, tzn. że szybkości tworzenia i rozkładu dla każdego z produktów przejściowych reakcji z osobna są sobie równe, a ich stężenia nie zmieniają się w trakcie trwania reakcji (założenie Bodensteina). W ten sposób uzyskujemy równanie stałej szybkości tworzenia produktów (9):

$$k_{cat} / K_m = \frac{k_2 * k_1}{k_2 + k_{-1}} \tag{9}$$

Wzór na KIE ($\alpha_{V/K}$) na k_{cat}/K_m w takiej reakcji to (10):

$$\alpha_{V/K} = \frac{(k_{cat} / K_m)_L}{(k_{cat} / K_m)_H} = \frac{k_{2L} * k_{1L} * (k_{2H} + k_{-1H})}{(k_{2L} + k_{-1L}) * k_{2H} * k_{1H}} = \frac{\alpha_1 * (\alpha_2 + \frac{\alpha_{-1} * k_{2L}}{k_{-1L}})}{\alpha_{-1} * (1 + \frac{k_{2L}}{k_{-1L}})} \tag{10}$$

gdzie symbole z indeksem L oznaczają stałe szybkości w reakcji ze związkiem znakowanym izotopem lżejszym, a z indeksem H – z izotopem cięższym. Indeksy przy wielkości KIE (α) oznaczają kinetyczny efekt izotopowy na reakcję elementarną opisywaną stałą szybkości z podobnym indeksem (Paneth, 1985).

W powyższych równaniach można przyjąć szereg założeń, np. że brak jest kinetycznego efektu izotopowego na proces tworzenia ES, etc., celem uproszczenia interpretacji wyników.

Innym sposobem zapisu równania na obserwowany KIE ($\alpha_{V/Kobs}$) na k_{cat}/K_m jest (11):

$$\alpha_{V/Kobs} = \frac{\alpha + C_f + C_r * \alpha_{eq}}{1 + C_f + C_r} \tag{11}$$

gdzie:

- α to kinetyczny efekt izotopowy na etap wrażliwy na podstawienie izotopowe.
- C_f to tzw. *forward commitment*, który jest sumą członów konstruowanych dla wszystkich produktów przejściowych w reakcji od pierwszego zawierającego enzym zasocjowany z substratami i ewentualnym kofaktorem do substratu dla etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe. Człony konstruuje się w kolejności odwrotnej do pojawiania się odpowiadających im produktów przejściowych. Dla substratu w etapie wrażliwym na podstawienie izotopowe człon jest stosunkiem stałej szybkości zużywania tego związku przejściowego w kierunku tworzenia produktu końcowego

do stałej zużywania w kierunku substratów reakcji. Drugi człon jest iloczynem członu poprzedniego i analogicznego stosunku stałych szybkości zużywania związku przejściowego dla którego liczony jest człon. Kolejne człony tworzy się analogicznie.

- C_r to tzw. *reverse commitment*, który z kolei jest sumą członów konstruowanych dla wszystkich związków przejściowych od pierwszego utworzonego w etapie wrażliwym na podstawienie izotopowe do ostatniego przed pierwszym nieodwracalnym etapem reakcji. Człon dla pierwszego ze wspomnianych związków przejściowych jest stosunkiem stałej szybkości przekształcenia związku w kierunku substratów do stałej prowadzącej w kierunku produktów. Człon dla kolejnego związku przejściowego jest ilorazem członu związku poprzedniego i analogicznego stosunku stałych szybkości dla związku, dla którego wyprowadza się człon. Kolejne elementy sumy tworzy się analogicznie.
- α_{eq} to równowagowy (termodynamiczny) efekt izotopowy reakcji – stosunek stałych równowagi reakcji dla związku znakowanego izotopem lżejszym to podobnej wartości dla izotopu ciężkiego.

Podobnie w równaniu (12) na obserwowany KIE (α_{Vobs}) na k_{cat}:

$$\alpha_{Vobs} = \frac{\alpha + \frac{R_f}{E_f} + C_r * \alpha_{eq}}{1 + \frac{R_f}{E_f} + C_r} \qquad (12)$$

gdzie:

- R_f to tzw. udział etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe w katalizie. Jest to suma członów policzonych dla poszczególnych związków przejściowych (w kolejności pojawiania się w procesie katalitycznym) licząc od następnego po kompleksie zawierającym enzym, substraty i kofaktor (tzn. od pierwszego produktu reakcji chemicznej) do substratu dla etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe, oraz od związku przejściowego powstającego z produktu etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe do końcowych produktów. Każdy z członów to stosunek stałej szybkości w kierunku tworzenia produktów dla etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe do tzw. sieciowej stałej szybkości. Sieciowa stała szybkości dla produktów reakcji nieodwracalnych i dla substratu w etapie wrażliwym na podstawienie izotopowe jest równa stałej szybkości tworzenia takiego związku z poprzedniego związku przejściowego. Dla pozostałych produktów przejściowych sieciowa stała szybkości jest równa stosunkowi iloczynu stałej szybkości tworzenia takiego produktu z poprzedniego związku przejściowego i stałej przekształcenia

w następny związek przejściowy do sumy stałych szybkości rozpadu związku przejściowego w stronę substratów i produktów reakcji;

- E_f jest sumą stałych równowagi tworzenia substratu do etapu wrażliwego na podstawienie izotopowe z poszczególnych związków przejściowych (pojawiających się kolejno podczas katalizy) poczynając od pierwszego kompleksu enzymu z substratami i kofaktorem. Do tej sumy dodaje się 1.

Powyższe równania można konstruować w celu powiązania zaobserwowanych pierwszorzędowych KIE z efektem równowagowym z kinetycznym efektem izotopowym na etap wrażliwy na podstawienie izotopowe. Można też rozbudować opisane wyrażenia o etapy asocjacji z substratami i interpretować KIE w zależności od stężeń substratów (Northrop, 1991).

Można stosować opisane podejście do wielokrotnych efektów izotopowych dla różnych pierwiastków i rozwiązując odpowiednie równania określać różne parametry reakcji, oraz je interpretować (Hermes *et al.*, 1982).

W reakcjach, podczas których następuje oderwanie protonu od atomu węgla, ważnym źródłem informacji są badania zależności pierwszorzędowego KIE wodoru od rodzaju izotopu węgla wprowadzonego w tej pozycji. Jeśli oderwanie protonu zachodzi przynajmniej dwuetapowo, wtedy zwiększenie masy atomu węgla spowoduje zmniejszenie KIE. W podobnej sytuacji dla procesu synchronicznego KIE ulegnie zwiększeniu (lub się nie zmieni, jeśli o szybkości całej reakcji decyduje całkowicie tylko etap oderwania protonu). Analogicznie można analizować zależności pomiędzy oderwaniem protonu a rozpuszczalnikiem (Toney, 2003).

Efekty drugorzędowe są interpretowane na ogół w sposób jakościowy. Im bardziej taki efekt jest zbliżony wartością do efektu równowagowego, tym bardziej badany atom podczas stanu przejściowego zajmuje pozycję zbliżoną do tej zajmowanej w produkcie. Efekt równowagowy jest efektem odwrotnym, gdy częstości drgań wiązania z badanym atomem są wyższe dla produktu, niż dla substratu. Jeśli efekt równowagowy jest normalny, to częstości drgań są wyższe w substracie. Efekt odwrotny może też wynikać z silniejszego wiązania badanego atomu przez enzym podczas stanu przejściowego, niż w substracie i w produkcie (Cook *et al.*, 1981).

2.3.2.1. Określanie mechanizmu kinetycznego reakcji za pomocą kinetycznych efektów izotopowych

Wyznaczając KIE dla różnych stężeń poszczególnych substratów można rozróżnić między sobą mechanizmy reakcji wielosubstratowych, np.:

1. sekwencyjne (wszystkie substraty wiążą się z enzymem przed uwolnieniem pierwszego produktu) uporządkowane (gdzie substraty wiążą się w ściśle określonej kolejności), wtedy KIE na k_{cat}/K_m jest równy 1 dla pierwszego z wiązanych przez enzym substratów);
2. sekwencyjne losowe (substraty wiążą się w losowej kolejności), KIE na k_{cat}/K_m są wtedy różne od 1 i od siebie; mniejszy KIE będzie obserwowany dla substratu, który z większym prawdopodobieństwem utworzy produkt; jeśli jednak to prawdopodobieństwo będzie podobne dla obydwu substratów podobne, wtedy KIE również będą sobie równe);
3. sekwencyjne losowe z szybkim ustalaniem się równowag cząstkowych,
4. sekwencyjne uporządkowane z ustalaniem się cząstkowych równowag (w obydwu wypadkach obserwuje się równe KIE na na k_{cat}/K_m);
5. typu „ping-pong" (gdzie przynajmniej jeden z substratów jest wiązany po uwolnieniu pierwszego z produktów; dla takiego substratu KIE na k_{cat}/K_m jest równy 1).

W określeniu typu mechanizmu reakcji wielosubstratowych pomocne może okazać się zbadanie zależności KIE od stężenia produktów reakcji, np.:

1. dla mechanizmu sekwencyjnego uporządkowanego KIE na k_{cat}/K_m zmniejsza się ze stężeniem produktów do wartości efektu równowagowego, a KIE na k_{cat} maleje do wartości pomiędzy efektem równowagowym a 1.
2. w mechanizmie sekwencyjnym losowym efekty na k_{cat}/K_m i na k_{cat} maleją do wartości większych od efektu równowagowego ze wzrostem stężenia substratów (większy KIE na k_{cat}/K_m obserwuje się dla produktu, który z większym prawdopodobieństwem ulegnie przekształceniu w substraty).
3. dla mechanizmu z szybkim ustalaniem się równowag cząstkowych KIE nie zależą od stężenia produktów. Użycie metod uzupełniających pozwala na dokładne zidentyfikowanie typu mechanizmu.

Efekty izotopowe pozwalają także na badanie enzymów allosterycznych. Jeśli w trakcie katalizy obserwuje się zmianę KIE na k_{cat}/K_m i na k_{cat} to oznacza, że allosteria wpływa na stałe szybkości reakcji (do pierwszego etapu nieodwracalnego) w kierunku produktów. Jeśli zmienia się KIE na k_{cat}, a KIE na k_{cat}/K_m pozostaje stały, wtedy zmianie ulega stała szybkości dla etapu tworzenia końcowego produktu. W odwrotnej sytuacji (KIE na k_{cat}/K_m się zmienia, a KIE na k_{cat} jest bez zmian) zmieniona jest stała dysocjacji jednego z substratów. Jeśli obydwa rodzaje efe-któw są stałe, co najwyżej jedna ze stałych etapów katalizy może być zmieniona (Cook, 1991).

2.3.2.2. Zależność kinetycznych efektów izotopowych od pH

Ważnym aspektem badań mechanistycznych reakcji enzymatycznych są zależności parametrów reakcji (oprócz KIE trzeba uwzględniać niezależnie wielkości k_{cat}/K_m, k_{cat}, stałe inhibicji lub aktywacji) od pH. Takie dane pozwalają wyznaczyć pK_a grup kwasowo-zasadowych kluczowych dla katalizy. Ta wartość będzie równa takiemu pH, gdzie wartość parametru zmieni się dwukrotnie. Jeśli etap zależny od pH jest jednocześnie etapem wrażliwym na podstawienie izotopowe, można wyróżnić mechanizmy:

1. gdzie substrat wiąże się do odpowiednio uprotonowanej formy enzymu (wtedy KIE nie zależy od pH, podobnie, jak wartości k_{cat}/K_m i k_{cat});
2. gdzie stopień uprotonowania nie wpływa na wiązanie substratu (KIE zależne od pH, podobnie wartości k_{cat}/K_m i k_{cat});
3. gdzie substrat wiąże się do obydwu form enzymu, lecz wiązanie do nieuprotonowanej formy powoduje powstanie nieaktywnego kompleksu (KIE na k_{cat}/K_m jest niezależny od pH, choć sama wartość na k_{cat}/K_m będzie zależeć od pH);
4. gdzie substrat wiąże się tylko do poprawnie uprotonowanego enzymu, ale jego protonowanie powoduje powstanie nieaktywnego kompleksu (KIE na k_{cat}, jak i wartości k_{cat} i k_{cat}/K_m zależne od pH, wartość KIE na k_{cat}/K_m nie zależy od pH).

Jeżeli etapy zależny od pH i wrażliwy na podstawienie izotopowe są różne, to interpretacja danych wyznaczonych w zależności od pH jest bardziej skomplikowana i wymaga dodatkowych danych (Cook, 1991).

2.3.2.3. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru dla różnych kombinacji izotopów

Wyznaczenie pierwszorzędowych kinetycznych efektów izotopowych dla różnych kombinacji izotopów wodoru (dla tego pierwiastka można stosować takie podejście ze względu na duże wartości efektów) pozwala na użycie zależności Swaina i Schaada do wyznaczenia KIE na etap wrażliwy (α) na podstawienie izotopowe (13).

$$\frac{{}^{D}\alpha_{V/Kobs}-1}{{}^{T}\alpha_{V/Kobs}-1}=\frac{{}^{D}\alpha-1}{{}^{T}\alpha-1}=\frac{{}^{D}\alpha-1}{{}^{D}\alpha^{1.442}-1} \qquad (13)$$

W równaniu (13) $\alpha_{V/Kobs}$ oznaczają obserwowany KIE na k_{cat}/K_m, górny indeks oznacza odpowiednio efekt $^1H/^2H$ dla D, i $^1H/^3H$ dla T.

Takie podejście umożliwia też wyznaczenie udziału szybkości etapu oderwania protonu (k) w całkowitej szybkości katalitycznej k_{cat}, bądź stosunku szybkości oderwania

protonu do bezpośredniej stałej dysocjacji kompleksu enzym – substrat (K_d) w sumarycznej wartości k_{cat}/K_m (równania 14 i 15).

$$\frac{k_{cat}}{k} = \frac{\alpha_{Vobs} - 1}{\alpha - 1} \tag{14}$$

$$\frac{k_{cat} / K_m}{k / K_d} = \frac{\alpha_{V/Kobs} - 1}{\alpha - 1} \tag{15}$$

α_{Vobs} to obserwowany KIE na k_{cat}. Dzięki takiemu podejściu możliwe jest wyznaczenie bezwzględnych wartości k i K_d. Taka metoda nie może być stosowana wtedy, gdy *reverse commitment* (C_r) jest zaniedbywalnie mały (Northrop, 1975).

Zależności Swaina i Schaada (16) wiążą ze sobą bezpośrednie efekty izotopowe (α) na pojedynczą reakcję elementarną dla różnych kombinacji izotopów wodoru.

$$^{T}\alpha = {}^{D}\alpha^{1.442} = {}^{D/T}\alpha^{3.263} \tag{16}$$

$^{D/T}\alpha$ to efekt $^2H/^3H$.

Zależności te są prawdziwe tylko dla pierwszorzędowych efektów wodoru, gdy etap oderwania bądź wytworzenia wiązania z atomem wodoru decyduje w 100% o szybkości reakcji. Wynikają one z założenia zachowania się wiązania jako oscylatora harmonicznego. Inne założenia zależności Swaina i Schaada to zaniedbywalnie mała masa atomu wodoru w stosunku do masy całej cząsteczki, zaniedbywalnie małe różnice w energii dla cząsteczek z podstawionymi różnymi izotopami wodoru (poza różnicą w energii wibracyjnej stanu podstawowego) i brak tunelowania (Swain *et al.*, 1958).

2.3.3. Rozpuszczalnikowe efekty izotopowe

W reakcjach w wyniku których następuje przeniesienie protonu, jego dołączenie, bądź dysocjacja cennym narzędziem badawczym są efekty rozpuszczalnikowe $^1H/^2H$. Podczas ich wykonywania należy pamiętać o unikaniu zanieczyszczenia wody deuterowanej protem, np. czasem dobrze jest wymienić labilne protony w preparacie enzymu na deuterony. Celem wyznaczenia KIE należy zmierzyć kinetyczne parametry reakcji (k_{cat}, K_m) w wodzie zwykłej i deuterowanej. Można też zmierzyć szybkości reakcji przy określonym stężeniu substratów w obydwu rozpuszczalnikach. W celu wyznaczenia KIE można optymalizować stałe kinetyczne reakcji w wodzie ciężkiej ($^dk_{cat}$, ^dK_m) do danych eksperymentalnych (szybkość ^dv i stężenie substratu S) z reakcji w wodzie deuterowanej do równania Michaelisa – Menten (7), lub do jego modyfikacji (17):

$$^{d}v = {}^{d}k_{cat} * \frac{[S]}{K_m + [S]} + {}^{d}(k_{cat} / K_m) * \frac{K_m}{K_m + [S]} \tag{17}$$

Dla reakcji w mieszaninie wody zwykłej i ciężkiej (p to ułamek molowy deuteru) używa się równania (18), w którym wielkości z indeksem p oznaczają wartości dla reakcji w mieszaninie izotopowej rozpuszczalników:

$$\frac{{}^{d}v}{{}^{p}v} = \frac{{}^{d}k_{cat}}{{}^{p}k_{cat}} * \frac{[S]}{K_m + [S]} + \frac{{}^{d}(k_{cat}/K_m)}{{}^{p}(k_{cat}/K_m)} * \frac{K_m}{K_m + [S]} \tag{18}$$

Źródłem ważnych informacji może być zbadanie zależności rozpuszczalnikowego KIE od zawartości deuteru w rozpuszczalniku. Równanie Grossa-Butlera (19) opisuje zależność stałej katalitycznej w mieszaninie izotopowej wody i wody ciężkiej od parametrów reakcji:

$${}^{p}k_{cat} = k_{cat} * \frac{\prod_i (1 - p + p * \phi_i^T)}{[\prod_i (1 - p + p * \phi_i^R)] * (1 - p + p * \phi_m)^q} \tag{19}$$

gdzie ϕ^{T}_{i} – stała wymiany izotopowej danego protonu biorącego bezpośredni udział w katalizie na deuteron dla stanu przejściowego reakcji, ϕ^{R}_{i} – stała wymiany izotopowej protonu biorącego bezpośredni udział w katalizie na deuteron dla substratu, ϕ_m – stała wymiany izotopowej protonów na deuterony w otoczeniu, tzn. w miejscach mogących pośrednio wpływać na przebieg reakcji, q - ilość miejsc protonowych wpływających pośrednio na przebieg reakcji.

Dla miejsc kwasowo-zasadowych w aminokwasach białkowych (poza cysteiną) stała wymiany izotopowej protonu na deuteron wynosi w przybliżeniu 1. Wiedząc to można interpretować zależność KIE od składu izotopowego wody. Jeśli wymiana tylko jednego protonu w stanie przejściowym ma znaczenie dla szybkości reakcji obserwuje się malejącą prostoliniową zależność KIE od ułamka molowego deuteronów w jonach wodorowych wody. Jeśli więcej protonów uczestniczy w tym procesie, to wartości KIE są nieco niższe, niż dla zależności prostoliniowej. Krzywa ma kształt łuku przecinającego prostą opisującą wspomnianą zależność prostoliniową przy 0 i 100% zawartości deuteru. Im więcej wymienialnych protonów uczestniczy w tworzeniu stanu przejściowego, tym większe jest zakrzywienie łuku. Jeśli wartości KIE są nieco wyższe niż dla zależności prostoliniowej, to oznacza, że na niektórych czynnikach w równaniu Grossa-Butlera istnieje odwrotny efekt izotopowy np. na atomach wodoru z otoczenia centrum aktywnego (Quinn & Sutton, 1991).

Zmiany sumy *forward* i *reverse commitment* (C_f i C_r) w wodzie i w wodzie ciężkiej świadczą o istotności zmian konformacyjnych w cząsteczce enzymu podczas katalizy (Cleland, 2004).

Spektroskopia w podczerwieni daje możliwość bardzo dokładnego pomiaru względnej zawartości deuteru i protu w wodzie ciężkiej poprzez pomiar absorpcji pasm w HDO przy 1668nm. Jest to bardzo dokładna dobra metoda do pomiarów zawartości deuteru.

Obserwowany KIE (α_{obs}) jest funkcją efektu rzeczywistego (α) i zawartości deuteru (p) opisaną równaniem (20; Northrop *et al.*, 1991):

$$\alpha_{obs} = \frac{1}{\frac{\alpha^{-1} - 1}{p} + 1} \tag{20}$$

2.3.4. Nieklasyczne zjawiska wykrywane za pomocą kinetycznych efektów izotopowych

KIE pozwala na badanie bardzo wielu ciekawych zjawisk w reakcjach enzymatycznych. Do najbardziej spektakularnych należą sprzężenie w ruchu atomów i tunelowanie. Obydwa zjawiska wykazano dotychczas tylko dla atomów wodoru.

Sprzężenie ruchu atomów polega na przechodzeniu atomu wodoru odrywanego w trakcie reakcji na miejsce geminalnego atomu wodoru wykazującego drugorzędowy KIE. Musi ono zachodzić w stanie przejściowym. Tego typu zjawisko objawia się podwyższonym efektem drugorzędowym (przekraczającym efekt równowagowy), oraz zaniżonym efektem pierwszorzędowym. Deuterowanie atomu wodoru wykazującego drugorzędowy KIE powoduje zwiększenie pierwszorzędowego KIE. Sprzężenie ruchu atomów wykryto po raz pierwszy dla drożdżowej dehydrogenazy alkoholowej (Kurz & Freiden, 1980; Cook *et al.*, 1981).

Tunelowanie wodoru polega na jego oderwaniu przy energii niższej od bariery energetycznej procesu, również ono jest częste w reakcjach katalizowanych przez dehydrogenazy (Huskey & Schowen, 1983).

Przesłanką tego typu procesów może być złamanie tzw. reguły średniej geometrycznej, która mówi, że sumaryczny wielokrotny efekt izotopowy jest równy iloczynowi efektów izotopowych w poszczególnych pozycjach. Oznacza to, że gdy efekty izotopowe są od siebie zależne możliwe jest sprzężenie ruchu atomów bądź tunelowanie w danym procesie.

Tunelowanie można wykryć poprzez badanie KIE w zależności od temperatury wykorzystując równanie Arrheniusa. Należy wykreślić zależność logarytmu naturalnego stałych szybkości dla obydwu izotopów od odwrotności temperatury (zwykle jest to zależność prostoliniowa). Tunelowanie wodoru powoduje znacznie większe zakrzywienie prostej nakreślonej dla protu, niż dla deuteru. Proste (ekstrapolowane z wąskiego przedziału temperatur, w jakim można badać reakcje enzymatyczne) przecinają się w takim przypadku na wykresie (dla określonej temperatury), a stosunek wartości członu przedwykładniczego równania Arrheniusa (wyznaczony dla nieskończonej temperatury) dla $^2H/^1H$ jest niższy od 0.7. Dodatkowo bezpośredni pierwszorzędowy kinetyczny efekt izotopowy deuteru na bada-

nym atomie wodoru musi być anomalnie duży (zwykle większy od 10), a różnica w energii aktywacji reakcji pomiędzy izotopologiem deuterowym i protowym powinna być wyższa od 1.414kcal/mol (tzw. kryteria Bella). Taką metodę można stosować wtedy, gdy o szybkości reakcji decyduje głównie etap odrywania protonu (Grant & Klinman, 1989; Parker, 2004).

Do wykrycia tunelowania w reakcjach, o których szybkości decyduje głównie etap odrywania protonu, można zastosować również zależności Swaina-Schaada (Swain *et al.*, 1958; 2.3.2.3.).

Jeśli efekt $^{1}H/^{3}H$ obliczony z efektów $^{1}H/^{2}H$ lub $^{2}H/^{3}H$ za pomocą wspomnianych zależności jest większy od efektu zaobserwowanego, wtedy prawdopodobnie w reakcji następuje tunelowanie protonu. Jeśli jednak wartość wyliczona KIE jest mniejsza od zaobserwowanej mamy do czynienia ze złożonością kinetyczną, tzn. nie tylko etap odrywania protonu decyduje o szybkości reakcji (Saunders, 1985).

3. BADANIA WŁASNE

3.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla i wodoru

W tej części rozdziału zamieściłem wyniki moich badań nad syntezą znakowanych L-tyrozyn. Otrzymanie tych związków było niezbędne do przeprowadzenia badań mechanizmu działania rozkładu L-tyrozyny katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową za pomocą metod izotopowych. W literaturze opisano kilka metod otrzymywania znakowanej L-tyrozyny (2.2.), ale nie wszystkie z nich były przydatne do moich celów. Podczas syntezy napotyka się na kilka utrudnień:

1. konieczne jest użycie metod stereoselektywnej syntezy w celu uzyskania niemal 100% nadmiarów enancjomerycznych. Zanieczyszczenie enancjomerem powoduje duże błędy w wyznaczaniu kinetycznych efektów izotopowych;
2. należy zadbać o to, aby podczas wyodrębniania aminokwasu nie nastąpiła jego racemizacja. Taki wymóg wyklucza użycie silnie zasadowych reagentów podczas całej procedury;
3. silnie zasadowe środowisko ułatwia utlenianie pierścienia aromatycznego tyrozyny. Utlenieniem grozi także zbyt długie przetrzymywanie aminokwasu w roztworze w obecności tlenu. Podatność na utlenianie jest wywołana obecnością silnie aktywującej grupy hydroksylowej związanej z pierścieniem aromatycznym tyrozyny;
4. słaba rozpuszczalność w wodzie (0.4%). Ta cecha może być w pewnych przypadkach zaletą – dobrym sposobem izolacji tego aminokwasu jest niekiedy wytrącenie z roztworu obojętnego (tyrozyna znacznie lepiej rozpuszcza się w środowisku zasadowym, nieco słabiej w kwaśnym, najtrudniej w obojętnym);
5. konieczność pracy ze związkami radioaktywnymi. Stosowane w tej pracy węgiel-14 i tryt emitują niskoenergetyczne elektrony (promieniowanie β^-) bez jednoczesnej emisji fotonów γ, stąd jest to promieniowanie nieprzenikliwe (poza niewielkim promieniowaniem hamowania pochodzącym od wyemitowanych elektronów). Dzięki temu podczas pracy ze wspomnianymi izotopami wystarczy używać ochrony w postaci gumowych rękawiczek bez konieczności używania dodatkowych osłon. Tym niemniej radioaktywność komplikuje w znacznym stopniu wykonanie syntezy utrudniając niemal każdą operację, a część czynności wręcz jest niemożliwa;
6. wyjściowe związki znakowane są kosztowne, dlatego też, celem uniknięcia ryzyka utraty cennych substratów, jak i optymalizacji procedury, należy najpierw wypróbować metodę z użyciem związków o naturalnym składzie izotopowym.

Istotnym elementem syntezy jest także analiza otrzymanych związków obejmująca potwierdzenie istnienia tyrozyny bez zanieczyszczeń potencjalnie przeszkadzających w dal-

szych badaniach, określenia czystości enancjomerycznej aminokwasu (dogodnym narzędziem okazały się tutaj testy enzymatyczne), jak i potwierdzenie wprowadzenia znacznika izotopowego w żądaną pozycję (również tutaj metody enzymatyczne zdają się być nieocenione).

W tym podrozdziale podałem procedury pozwalające na otrzymanie różnie znakowanych ^{14}C i ^{3}H L-tyrozyn. Podałem również te metody, które okazały się nieskuteczne, ale ta część pracy ma także pewną wartość naukową.

Przed przystąpieniem do otrzymywania znakowanych związków przeprowadzałem badania próbne ze związkami o naturalnym składzie izotopowym w celu ustalenia optymalnych warunków syntezy.

W badaniach używałem licznika scyntylacyjnego Wallac 1409, Raytest, Niemcy. Pomiary scyntylacyjne prowadziłem używając scyntylatorów do próbek niewodnych i wodnych (Sigma).
Pomiary pH przeprowadzałem na pH-metrze (Teleko Wrocław N5172). Pomiary spektrofotometryczne przeprowadzałem na spektrofotometrze UV-VIS 1202 Shimadzu.
Do analizy za pomocą chromatografii cienkowarstwowej używałem płytek silikażelowych Merck, $60F_{256}$ o grubości 0.2mm. Temperatury topnienia oznaczałem w aparacie Koflera typu Boetius i podawałem bez poprawek.
Do przeprowadzania reakcji używałem enzymów:

- fenololiazy tyrozynowej (β-tyrozynaza, TPL; EC 4.1.99.2.) z *Citrobacter freundii* o aktywności 6.9U/µl i stężeniu 0.33mM, otrzymanej dzięki uprzejmości prof. Roberta S. Phillipsa z University of Georgia, Athens, USA; 1U enzymu rozkłada 1µmol L-tyrozyny w ciągu 1 minuty w pH 8.3 i w temperaturze 20°C;
- tryptofanazy (EC 4.1.99.1.) z *Escherichia coli* (Sigma), o aktywności 0.0128U/mg, 1U to ilość białka wytwarzająca 1µmol indolu z L-tryptofanu w ciągu 1 minuty w pH 8.3 i temperaturze 37°C;
- liazy L-fenyloalaninowej (PAL; EC 4.1.3.5.) z *Rhodotorula glutinis* (Sigma) o aktywności 4.17U/ml i 0.44U/mg białka. Zawartość białka (metoda biuretowa) wynosiła 10mg/ml. Enzym znajdował się w 60% wodnym roztworze glicerolu, 3mM Tris-HCl, 0.5M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.5; 1U enzymu przekształca 1.0µmol L-fenyloalaniny w (*E*)-cynamonian w ciągu 1 minuty przy pH 8.5 i w temperaturze 30°C;
- 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (PMO; EC 1.14.3.1.) z wątroby szczura opisanej w podrozdziale 4.3.1.1.;
- dehydrogenazy L-mleczanowej (LDH; EC 1.1.1.27.) z mięśnia królika, typ XI (Sigma), o aktywności 1050U/mg i 1060U/mg białka (oznaczonego metodą biuretową). 1U przekształca 1.0µmol pirogronianu w L-mleczan w ciągu 1 minuty w pH 7.5 i w temperaturze 30°C;
- katalazy (EC 1.11.1.6.) z wątroby bydlęcej (Sigma) o aktywności 30000U/mg białka i zawartości białka oznaczonej metodą biuretową 30mg/ml. Enzym był zawiesiną wodną zawierająca około 0.1% tymolu. 1U rozkłada 1.0µmol nadtlenku wodoru w ciągu 1 minuty w pH 7.0 w 25°C, gdy stężenie nadtlenku wodoru spada z 10.3 do 9.2mM;
- dehydrogenazy alkoholowej (YADH; EC 1.1.1.1.) z drożdży piekarskich (Sigma) o aktywności 340U/mg i 370U/mg białka. Preparat zawierał 90% białka oznaczanego spektrofotometrycznie przy długości fali 280nm ($E^{1\%}_{280}$); i mniej niż 2% soli z buforu cytrynianowego. 1U przekształca 1.0µmol etanolu w aldehyd octowy w ciągu 1 minuty przy pH 8.8 i w temperaturze 25°C;
- oksydazy D-aminkwasowej (D-AAO; EC 1.4.4.3.) z nerek świni (Sigma) o aktywności 0.26U/mg; 1U przekształca 1.0µmol D-alaniny w pirogronian w ciągu 1 minuty w pH 8.3 w temperaturze 25°C w obecności katalazy;
- transaminazy glutaminian:pirogronian (GPT; EC 2.6.1.2.) z serca świni (Sigma) o aktywności 100U/mg białka. Zawartość białka oznaczonego metodą biuretową wynosiła 14mg/ml w 1.8M

roztworze $(NH_4)_2SO_4$ o pH 6.0. 1U katalizuje przekształcenie 1.0µmol α-ketoglutaranu do L-glutaminianu w ciągu 1 minuty w obecności L-alaniny w pH 7.6 i temperaturze 37°C.

3.1.1. Metody analityczne

Każdą z otrzymanych znakowanych L-tyrozyn scharakteryzowałem za pomocą niżej podanych metod analitycznych.

3.1.1.1. Spektroskopowa charakterystyka L-tyrozyny

Badania spektroskopowe pozwalają na analizę L-tyrozyny znakowanej izotopami stabilnymi ze względu na znaczne wzbogacenie w izotop (na ogół >98%). Do analizy L-tyrozyny znakowanej deuterem stosowałem spektrometrię mas (MS) i spektroskopię protonowego rezonansu magnetycznego (^{1}H NMR).

Spektrometria mas pozwala określić względną zawartość izotopu przez porównanie pików molekularnych związku znakowanego i nieznakowanego. Nie analizowałem produktów fragmentacji. W badaniach stosowałem aparat Micromass z kwadrupolem i analizatorem czasu przelotu (Q-TOF). Cząsteczki były jonizowane za pomocą techniki elektrorozpylania (ESI) w jonach dodatnich. W tych warunkach pik pseudomolekularny L-tyrozyny występował przy m/z 182.09.

Spektroskopia ^{1}H NMR pozwala na określenie wzbogacenia izotopowego przez porównanie intensywności sygnałów protonów pozostałych w znakowanej pozycji z intensywnością pozostałych protonów. Deuter jest „niewidoczny" w ^{1}H NMR. Wielką zaletą NMR-u są informacje o miejscu podstawienia deuteru, które wynikają z braku sygnału dla określonych protonów, jak i z różnic w rozszczepieniach sygnałów sąsiednich protonów. Analizy wykonywałem na aparacie Varian 200 Unity Plus z użyciem TMS jako wzorca wewnętrznego pracującym przy częstotliwości 200MHz.

Widmo ^{1}H NMR nieznakowanej L-tyrozyny: (D_2O) δ 3.03 (1H, *β*-H, dd, 7.7Hz, 15.4Hz), 3.20 (1H, *β*-H, dd, 5.7Hz, 15.4Hz), 3.93 (1H, *α*-H, dd, 5.7Hz, 7.7Hz), 6.87 (2H, ArH, d, 8.7Hz), 7.17 (2H, ArH, d, 8.7Hz)

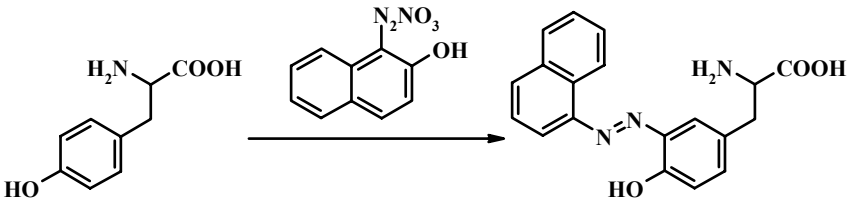
3.1.1.2. Chromatograficzne badanie czystości tyrozyny

Jakościowe określanie czystości L-tyrozyny wykonywałem za pomocą chromatografii cienkowarstwowej. Stosowałem chromatografię podziałową na płytkach celulozowych (Merck, DC Cellulose, bez wskaźnika fluorescencyjnego, grubość 0.1mm; układ rozwijający chloroform-metanol-20% wodny roztwór amoniaku 58:32:10 (v/v/v)), lub chromatografię adsorpcyjną na płytkach silikażelowych (Merck, $60F_{256}$, grubość 0.2mm, układ rozwijający acetonitryl-woda 4:1 (v/v)). Płytki wywoływałem 0.5% roztworem ninhydryny w etanolu. Celem analizy chromatograficznej było wykrycie zanieczyszczenia otrzymanych preparatów

tyrozyny substratami (L-fenyloalanina, *S*-metylo-L-cysteina) bądź produktami utleniania (dopa). Obecność tych związków może silnie fałszować wyniki badań izotopowych.

3.1.1.3. Oznaczanie ilości tyrozyny

Do oznaczania ilości tyrozyny zastosowałem reakcję z 1-nitrozo-2-naftolem (Udenfriend & Cooper, 1952; Schemat 21).



Schemat 21. Oznaczanie tyrozyny za pomocą 1-nitrozo-2-naftolu

Reakcję prowadziłem w obecności kwasu azotowego (III), który przekształca 1-nitrozo-2-naftol w sól dwuazową. Sól ta atakuje następnie pierścień aromatyczny tyrozyny tworząc związek dwuazowy, który silnie absorbuje światło o długości fali 450nm. Stężenie tyrozyny oznacza się spektrofotometrycznie po wyekstrahowaniu zakłócającego pomiar nieprze-reagowanego 1-nitrozo-2-naftolu.

Metoda pozwala na dość dokładne (błąd max. 1%) oznaczenie do około 40µg tyrozyny w próbce, wzrost absorpcji jest wprost proporcjonalny do stężenia aminokwasu do wartości około 1.0. Wadą takiego oznaczania jest interferencja ze strony innych związków aromatycznych zawierających podstawniki silnie aktywujące podstawienie elektrofilowe związane z pierścieniem arylowym. Innym problemem jest używanie silnie rakotwórczego 1-nitrozo-2-naftolu.

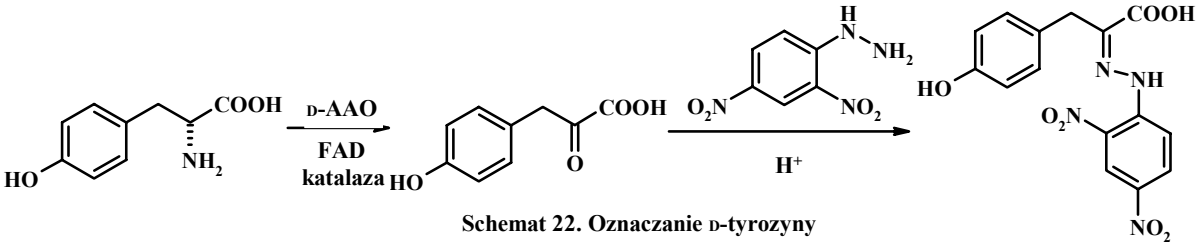
Oznaczanie:
Do analitu o objętości 1.00ml dodawałem 0.50ml 0.1% roztworu 1-nitrozo-2-naftolu w etanolu oraz 0.50ml 10mM roztworu azotynu sodu w 12% kwasie azotowym. Mieszaninę ogrzewałem w zamkniętej probówce przez 30min. w 55°C. Po ochłodzeniu roztwór ekstrahowałem 5ml 1,2-dichloroetanu. Mierzyłem absorbancję warstwy wodnej przy 450nm. Dla tyrozyny krzywą wzorcową opisuje równanie: $m_{tyr}[\mu g]=46.1A_{450}+2.29$, gdzie m_{tyr} to masa tyrozyny w oznaczanej próbce, a A_{450} to absorpcja zmierzona przy 450nm (absorpcja powietrza -0.124).

3.1.1.4. Oznaczanie czystości optycznej tyrozyny

Wygodną metodą oznaczania czystości optycznej L-aminokwasów jest reakcja utleniania ich D-enancjomerów do 2-oksokwasów (Schemat 22) za pomocą oksydazy D-aminokwasowej.

D-AAO stereoselektywnie utlenia D-aminokwasy. Reakcja ta zachodzi w obecności dinukleotydu flawinoadeninowego (FAD) jako utleniacza. Podczas reakcji utleniania

powstają wolne rodniki, które mogą powodować tworzenie nadtlenku wodoru, który z kolei może w niekontrolowany sposób utleniać związki aromatyczne. Dodatek katalazy rozkładającej nadtlenek wodoru zapobiega temu procesowi.



Schemat 22. Oznaczanie D-tyrozyny

Oznaczanie ilości powstałego oksokwasu wykonywałem dwojako. Dla związków znakowanych izotopami stabilnymi do mieszaniny reakcyjnej dodawałem 2',4'-dinitrofenylo-hydrazynę, która w środowisku kwaśnym tworzy fenylohydrazon z oksokwasem. Powstały addukt oznaczałem spektrofotometrycznie w 371nm wobec próby nie zawierającej enzymu.

Dla związków znakowanych izotopami radioaktywnymi wystarczyło wydzielić oksokwas (np. za pomocą chromatografii jonowymiennej na kationicie) i zmierzyć jego radioaktywność, która jest proporcjonalna do stężenia (zakładając brak efektów izotopowych w reakcji enzymatycznego utleniania).

Oznaczanie:
Przygotowałem mieszaninę reakcyjną w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 8.5 zawierającą analit oraz 0.25mM FAD, 100U/ml katalazy i 0.125U/ml oksydazy D-aminokwasowej. Reakcję przerywałem po 1 godzinie zakwaszając ją 15µl stężonego kwasu solnego na 1ml mieszaniny.
Postępowanie dla L-tyrozyny znakowanej izotopami stabilnymi: pobierałem 0.25ml mieszaniny poreakcyjnej, dodawałem do niej 1.74ml 0.5M roztworu kwasu siarkowego oraz 10µl 10mM roztworu 2',4'-dinitrofenylohydrazyny w etanolu. Mierzyłem zmianę absorpcji przy długości fali 371nm w ciągu godziny. Dla 3.5mM roztworu racemicznej tyrozyny w reakcji enzymatycznej uzyskałem wzrost absorpcji 0.19 wobec kontroli nie zawierającej D-AAO.
Postępowanie dla L-tyrozyny znakowanej izotopami radioaktywnymi: mieszaninę poreakcyjną nanosiłem na kationit Amberlit IR 120(H^+) i wymywałem wodą. Mierzyłem radioaktywność wyjściowego roztworu oraz warstwy wodnej po przemyciu żywicy.

3.1.1.5. Metody określania położenia znacznika izotopowego w cząsteczce L-tyrozyny

Po otrzymaniu znakowanej L-tyrozyny należy określić położenie znacznika w cząsteczce. Stosuje się tu degradację chemiczną cząsteczki; obecność izotopu w odpowiednich produktach pozwala na udowodnienie miejsca jego położenia. Na ogół taka analiza zajmuje dużo więcej czasu niż synteza. Z tego względu w tej pracy ograniczyłem się jedynie do kilku metod, które pozwalają na względnie szybkie określenie położenia znacznika. Dla znaczników węglowych metody te nie ustalają jednoznacznie ich położenia.

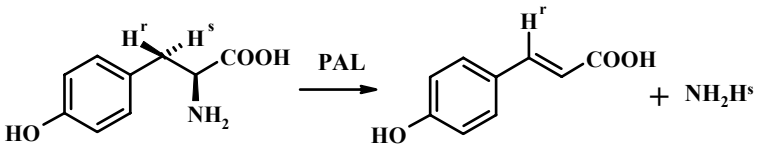
3.1.1.5.1. Wymiana protonu w pozycji *α* L-tyrozyny katalizowana przez tryptofanazę

Tryptofanaza katalizuje wymianę atomu wodoru z pozycji 2 w L-tyrozynie na deuter z wody ciężkiej (Faleev *et al.*, 1996). Fosforan pirydoksalu (PLP) jest kofaktorem tego enzymu. Po oddzieleniu rozpuszczalnika od L-tyrozyny (np. za pomocą wymiany jonowej na kationicie) identyfikowałem obecność izotopu przez pomiar radiometryczny dla związków znakowanych izotopami radioaktywnymi, lub wykonując widmo NMR lub MS dla znakowania izotopem stabilnym. Dla związków znakowanych izotopami wodoru w pozycji 2 izotop pod wpływem tryptofanazy przechodził do rozpuszczalnika, natomiast dla znaczników w innych pozycjach pozostawał on w cząsteczce L-tyrozyny.

Procedura:
Mieszanina reakcyjna w 0.05M buforze fosforanu potasu pH 8.0 zawierała analizowaną L-tyrozynę, 0.05mM PLP oraz 0.025U/ml tryptofanazy. Reakcję prowadziłem 3 dni w temperaturze pokojowej, przerywałem poprzez zakwaszenie 15µl stężonego HCl na 1ml mieszaniny. Roztwór nanosiłem na żywicę kationowymienną Amberlit IR 120(H^+) i przemywałem wodą. Tyrozynę wymywałem 0.3M wodnego roztworu amoniaku.

3.1.1.5.2. Oderwanie protonu z pozycji 3*S* katalizowane przez liazę fenyloalaninową

Liaza fenyloalaninowa katalizuje eliminację cząsteczki amoniaku z L-tyrozyny (Strange *et al.*, 1972; Schemat 23).



Schemat 23. Eliminacja amoniaku z L-tyrozyny

Produktem reakcji jest kwas (*E*)-*p*-kumarowy. Z pozycji 3 stereoselektywnie odrywany jest atom wodoru w pozycji *S*.

Produkty reakcji rozdzielałem poprzez ekstrakcję kwasu *p*-kumarowego, a izotop znajdujący się w wodzie oddzielałem od nieprzereagowanej L-tyrozyny za pomocą chromatografii jonowymiennej na kationicie przemywając żywicę wodą.

Jeśli znacznik izotopowy znajdował się w pozycji 3*S*, to w wyniku reakcji przechodził on do rozpuszczalnika. W pozostałych przypadkach znajdował się on w kwasie *p*-kumarowym.

Reakcja zachodzi z około 80% wydajnością, D-tyrozyna jest jej inhibitorem. Obecność enancjomeru D w mieszaninie reakcyjnej powoduje obniżenie wydajności tej reakcji; jest to więc jednocześnie jakościowa metoda oceny czystości optycznej L-tyrozyny.

Procedura:
Reakcję przeprowadzałem w 1ml 0.2M buforu boranu sodu o pH 8.8, w którym rozpuszczałem analizowaną L-tyrozynę i liazę fenyloalaninową o aktywności 0.5U na 1ml mieszaniny. Reakcję

przeprowadzałem w temperaturze 30^{o}C przez 1 dzień. Roztwór zakwaszałem 20µl stężonego HCl i ekstrahowałem 5 x 1ml eteru dietylowego. Warstwę wodną nanosiłem na Amberlit IR 120(H^+) (60mm x 5mm) i wymywałem 5ml wody.

3.1.1.5.3. Eliminacja fenolu katalizowana przez fenololiazę tyrozynową

Fenololiaza tyrozynowa katalizuje rozkład tyrozyny do fenolu i pirogronianu (2.2.). Tę metodę zastosowałem w swoich badaniach celem identyfikacji obecności znacznika w reszcie aromatycznej cząsteczki.

Do mieszaniny reakcyjnej dodawałem dehydrogenazy L-mleczanowej i zredukowanej formy dinukleotydu nikotynamido-adeninowego (NADH). W ich obecności stosunkowo nietrwały pirogronian ulegał przekształceniu do trwałego L-mleczanu.

Reakcja katalizowana przez TPL zwykle przebiegała z 30-40% wydajnością, należało więc oddzielić nieprzereagowaną tyrozynę na kationicie. Produkty reakcji wymywałem wodą. Powstały fenol oddzielałem od mleczanu i rozpuszczalnika zawierającego znacznik poprzez ekstrakcję. Kwas mlekowy oddzielałem od znacznika znajdującego się w wodzie za pomocą chromatografii jonowymiennej na anionicie, znacznik znajdujący się w rozpuszczalniku wymywałem wodą, a L-mleczan roztworem cytrynianu sodu.

Jeśli znacznik izotopowy znajdował się w reszcie aromatycznej, to w wyniku reakcji katalizowanej przez TPL znajdował się on we frakcji zawierającej fenol. Znaczniki wodorowe alifatyczne (z pozycji 2 i 3) przechodziły do wody, a znaczniki węglowe alifatyczne były wykrywane w kwasie mlekowym.

Procedura:
Reakcję prowadzałem w buforze zawierającym 0.1M fosforan potasu, 0.2M chlorek sodu i 1mM D,L-ditiotreitol (DTT) o pH 8.3. W mieszaninie znajdowała się analizowana L-tyrozyna, dwukrotny nadmiar molowy NADH, 0.05mM PLP oraz 20U LDH i 0.5U TPL na 1ml mieszaniny. Po jednodniowej inkubacji w temperaturze pokojowej mieszaninę zakwaszałem 20µl stężonego HCl na 1ml mieszaniny oraz nanosiłem na kationit Amberlit IR 120(H^+). Żywicę przemywałem wodą. Uzyskany roztwór ekstrahowałem pięciokrotnie porcjami eteru dietylowego o połowie objętości w stosunku do warstwy wodnej. Warstwę wodną alkalizowałem za pomocą NaOH i nanosiłem na anionit Dowex 1x8 (OH^-). Złoże pozostawiałem celem dobrego związania anionów z żywicą, którą następnie przemywałem wodą. Mleczan wymywałem 1M roztworem cytrynianu sodu.

3.1.1.5.4. Wymiana atomów wodoru w pozycji 3',5' tyrozyny z wodą

W obecności kwasu w gorącej wodzie następuje wymiana atomów wodoru w L-tyrozynie w pozycjach *orto* względem grupy hydroksylowej (Park *et al.*, 1991; Nishiyama *et al.*; 1994).

Po ochłodzeniu mieszaninę z analizowaną tyrozyną naniosłem na kationit. Izotop wodoru znajdujący się w rozpuszczalniku wymywałem wodą, a aminokwas wymywałem roztworem amoniaku.

Znacznik izotopowy znajdujący się w pozycji 3',5' przechodził do wody, a w przypadku znakowania w innych pozycjach wykrywano obecność izotopu w odzyskanej tyrozynie.

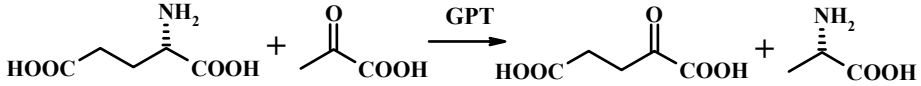
Procedura:
2M roztwór kwasu solnego zawierający analizowaną tyrozynę zamykałem w ampułce szklanej i ogrzewałem przez 1 dzień w 100^{o}C. Następnie mieszaninę chłodziłem, zmniejszałem kwasowość za pomocą NaOH wobec papierka uniwersalnego i nanosiłem na kationit Amberlit IR 120(H^{+}). Złoże przemywałem wodą. W celu odzyskania L-tyrozyny jonit przemywałem 0.3M wodnym roztworem amoniaku.

3.1.2. Poszukiwanie metody syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla i wodoru

W tym podrozdziale zamieściłem te metody syntezy znakowanej L-tyrozyny, które okazały się nieskuteczne. Jednak przy zastosowaniu pewnych modyfikacji mogą one okazać się przydatnymi sposobami otrzymywania znakowanej L-tyrozyny.

3.1.2.1. Synteza poprzez transaminację katalizowaną przez transaminazę glutaminian:pirogronian

Transaminaza glutaminian:pirogronian katalizuje reakcję przeniesienia grupy aminowej z L-glutaminianu na pirogronian (Massarrat, 1965; Schemat 24), jak i reakcję odwrotną. Istniała szansa, że akceptorem grupy aminowej może być kwas *p*-hydroksyfenylopirogronowy, a produktem takiej reakcji będzie L-tyrozyna. Analogiczna reakcja została opisana w literaturze dla transaminazy L-asparaginian:pirogronian z *Escherichia coli* (Baldwin *et al.*, 1987). Taka metoda byłaby dogodnym sposobem syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2, który w wyniku zajścia tej reakcji pochodzi z rozpuszczalnika.



Schemat 24. Reakcja katalizowana przez GPT

Używając GPT przeprowadziłem próby z użyciem L-alaniny, L-glutaminy i kwasu L-glutaminowego jako donorów grupy aminowej. Niestety – uzyskałem nikłe wydajności reakcji (maksymalnie 1.1%). W związku z tym ta metoda nie nadaje się do syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2. Taka metoda syntezy jest jednak możliwa przy zastosowaniu innych transaminaz.

Procedura:
Reakcje prowadziłem w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 7.5 zawierającym 10mM kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego, 0.4M L-alaniny oraz 4U GPT na 1 ml mieszaniny, lub odpowiednio 20mM kwasu *p*-hydoksyfenylopirogronowego, 20mM aminokwasu oraz 6U GPT/ml dla L-glutaminy i kwasu L-glutaminowego jako donorów grupy aminowej. Reakcje prowadziłem w temperaturze

pokojowej przez 5 dni. Po zakwaszeniu 15µl stężonego HCl na 1ml mieszaniny oraz naniesieniu na kationit Amberlit IR 120(H^+) żywicę przemywałem wodą do momentu wymycia kwasu *p*-hydroksyfenylopirogronowego. Powstałą tyrozynę wraz z donorem grupy aminowej wymywałem 0.3M wodnym roztworem amoniaku. Uzyskałem L-tyrozynę z wydajnościami mniejszymi, niż 1.1%.

3.1.2.2. Synteza z fenolu katalizowana przez fenololiazę tyrozynową

Metoda syntezy L-tyrozyny poprzez użycie reakcji odwrotnej do katalizowanej przez TPL jest najbardziej powszechnym sposobem uzyskiwania L-tyrozyny (2.2.). Pozwala ona na znakowanie izotopami wodoru w pozycji 2 (znacznik pobierany jest z rozpuszczalnika), jak i w pierścieniu aromatycznym (stosując odpowiednio znakowany fenol; jest to także dobra metoda uzyskiwania L-tyrozyny znakowanej izotopami węgla w pierścieniu aromatycznym).

Problemem w tej syntezie jest fakt, że TPL nie jest enzymem dostępnym komercyjnie, dlatego też musiałem podjąć próbę jego uzyskania.

3.1.2.2.1. Izolacja fenololiazy tyrozynowej z *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae, do których należy powszechnie stosowana w laboratoriach biologicznych pałeczka okrężnicy (*Escherichia coli*), produkują fenololiazę tyrozynową (Nagasawa *et al.*, 1985). Podjąłem próbę izolacji enzymu z tego mikroorganizmu według procedury podanej przez Nagasawę *et al.*, 1985.

W celu uzyskania białka do hodowli użyłem ekspresyjnego szczepu *E. coli*, tzn. takiego, który produkuje dużo białek. Bakterie hodowano na pożywce minimalnej z L-tyrozyną, która była źródłem węgla, celem indukcji biosyntezy TPL. Białko to umożliwia bakteriom przekształcenie L-tyrozyny do niezbędnych metabolitów. Stosowany szczep *E. coli* jest oporny na ampicylinę, co umożliwia selekcję tych bakterii na pożywce zawierającej ten antybiotyk. Po namnożeniu bakterii niszczono ich ściany komórkowe poprzez sonikację, i wysalano kolejne frakcje białkowe siarczanem (VI) amonu.

Otrzymany preparat zawierał duże aktywności oksydazy NADH i tryptofanazy. Ich aktywność utrudniała wiarygodne określenie aktywności TPL, której nie udało się stwierdzić w wykrywalnych ilościach. Oksydaza NADH uniemożliwia określenie aktywności TPL, gdyż sama utlenia ten nukleotyd do NAD używając tlenu z powietrza. Nie można użyć wygodnej metody spektrofotometrycznego oznaczania aktywności β-tyrozynazy z dodatkiem LDH i NADH przy długości fali 340nm, albowiem utlenianie NADH przez tlen interferuje z utlenianiem spowodowanym tworzonym w trakcie działania TPL pirogronianem.

Tryptofanaza z kolei interferuje z inną metodą oznaczania TPL za pomocą *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteiny (SOPC). SOPC w wyniku działania TPL i tryptofanazy rozkłada się na pirogronian, amoniak i o-nitrofenol. Zanik SOPC można śledzić spektrofotometrycznie

przy długości fali 370nm (Demidkina *et al.*, 2002). *E. coli* nie jest dobrym źródłem fenololiazy tyrozynowej.

Dzięki uprzejmości prof. Roberta Phillipsa (University of Georgia, Athens, USA) otrzymałem od niego preparat TPL z *Citrobacter freundii*, na którym przeprowadziłem dalsze badania.

Procedura:
E. coli ER 2566 pTXB4E namnażałem przez dzień na pożywce stałej LB, następnie zaszczepiłem bakterie na pożywce ciekłej LB. Po dniu pobrałem z niej 5ml i dodałem do 500ml ciekłej pożywki LB zawierającej 10µg ampicyliny. Po 2.5 godziny do pożywki dodałem 1g L-tyrozyny zawieszonej w 10ml wody. Po 23h hodowli w 37^{o}C odwirowałem bakterie w 18kG przez 20min. w 4^{o}C. Dalszą procedurę przeprowadzałem w 4^{o}C. Osad bakterii zawiesiłem w 10ml 0.1M buforu fosforanu potasu o pH 6.0 zawierającego 5mM merkaptoetanol i sonikowałem trzykrotnie po 1min. Mieszaninę odwirowałem w 18kG przez 20min. Osad odrzuciłem, do supernatantu dodawałem porcjami 2.17g siarczanu amonu. Po dniu odwirowałem wytrącony osad w 18kG przez 20min. Osad odrzuciłem, supernatant wysoliłem 2.91g siarczanu amonu dodawanego porcjami. Po dniu odwirowałem wytrącony osad w 18kG przez 20min. Supernatant odrzuciłem. Osad rozpuściłem w 1.0ml 0.1M buforu fosforanu potasu z 5mM merkaptoetanolem o pH 7.0.

Oznaczanie aktywności preparatu za pomocą układu LDH/NADH:
W kuwecie kwarcowej przygotowałem 2ml roztworu w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 8.0, który zawierał 1mM merkaptoetanolu, 1.5mM L-tyrozyny, 0.1mM PLP, 0.1mM NADH, 5U LDH i 20µl preparatu enzymu. Mierzyłem spadek absorpcji przy 340nm (milimolowy współczynnik ekstynkcji NADH 6.22). Aktywność preparatu wyniosła 0.26U/ml.

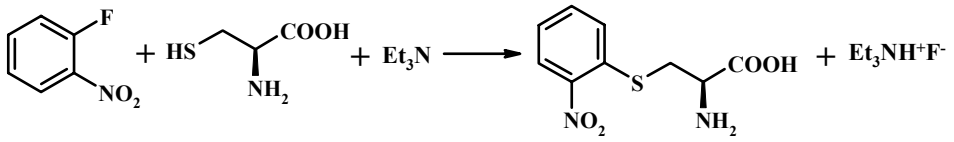
Oznaczanie aktywności preparatu za pomocą SOPC:
W kuwecie kwarcowej przygotowałem 2ml roztworu w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 8.0, który zawierał 1mM merkaptoetanolu, 0.6mM *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteiny, 0.1mM PLP i 20µl preparatu enzymu. Mierzyłem spadek absorpcji przy 370nm (milimolowy spadek absorpcji 1.86). Aktywność preparatu wyniosła 1.62U/ml.

Oznaczanie aktywności tryptofanazy w preparacie:
W kuwecie kwarcowej przygotowałem 2ml roztworu w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 8.0, który zawierał 1mM merkaptoetanolu, 1.5mM L-tryptofanu, 0.1mM PLP, 0.1mM NADH, 5U LDH i 20µl preparatu enzymu. Mierzyłem spadek absorpcji przy 340nm. Aktywność preparatu wyniosła 0.50U/ml.

3.1.2.2.2. Synteza *S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteiny

S-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteina (SOPC) jest związkiem niezbędnym przy określaniu aktywności TPL i tryptofanazy. Jest także cennym substratem w syntezie tyrozyny z fenolu w obecności TPL (Phillips *et al.*, 1989) jako, że reszta *o*-nitrotiofenolowa jest dobrą grupą opuszczającą, co pozwala na stosunkowo wydajne otrzymywanie L-tyrozyny. Związek ten nie jest dostępny handlowo, należało więc go otrzymać.

Dobrą metodą syntezy jest podstawienie nukleofilowe atomu fluoru w pierścieniu aromatycznym *o*-nitrofluorobenzenu grupą tiolową L-cysteiny w obecności zasady (Dua *et al.*, 1993; Schemat 25)



Schemat 25. Synteza SOPC

Stosując tę metodę otrzymałem SOPC z 66% wydajnością.

***S*-(*o*-nitrofenylo)-L-cysteina**:
Zmieszałem 858mg (7.09mmol) L-cysteiny, 767mg (5.44mmol) *o*-fluoronitrobenzenu, 1.34ml (9.64mmol) trietyloaminy w 3.43ml dimetyloformamidu. Reakcję mieszałem w temperaturze pokojowej przez 3.5h, następnie dodałem 3.43ml wody i odsączyłem wytrącony osad. Otrzymany SOPC rekrystalizowałem ze 110ml gorącej wody i odsączyłem. Uzyskałem 872mg (3.60mmol) SOPC z wydajnością 66%. Temperatura topnienia 166°C (literaturowa od 164 do 176°C).

3.1.2.2.3. Synteza L-tyrozyny z fenolu – poszukiwanie dobrego donora reszty alifatycznej

W literaturze opisano kilka przykładów syntezy L-tyrozyny z fenolu katalizowanej przez TPL (2.2.). Jako donorów reszty alifatycznej używano różnych pochodnych alaniny. Spośród łatwo dostępnych związków najbardziej obiecujące wydawały się L-seryna, *S*-metylo-L-cysteina i SOPC. W związku z tym musiałem sprawdzić ich reaktywność podczas syntezy L-tyrozyny.

Przygotowałem roztwory o podobnych stężeniach wspomnianych aminokwasów. Po przeprowadzeniu reakcji usunąłem nieprzereagowany fenol przez ekstrakcję toluenem i oznaczałem ilość powstałej tyrozyny. Uwzględniłem interferencję pochodzącą od SOPC podczas oznaczania. PLP nie zakłócało ilościowego oznaczania tyrozyny 1-nitrozo-2-naftolem.

Z przeprowadzonych badań wynika, że najlepszym substratem do syntezy L-tyrozyny jest SOPC, nieco gorszym *S*-metylo-L-cysteina, a najgorszym z badanych L-seryna. Z przeprowadzonych eksperymentów można wysnuć wniosek, że im lepsza grupa opuszczająca w pochodnej alaniny używanej do syntezy tyrozyny z fenolu, tym większa wydajność procesu.

SOPC jest jednak stosunkowo słabo rozpuszczalne w wodzie (trudno rozpuścić więcej niż 10mM), co utrudnia uzyskanie dużych ilości L-tyrozyny, gdyż wygodnym sposobem izolacji tego aminokwasu jest jego wytrącenie z mieszaniny reakcyjnej. Przy niskich stężeniach spowodowanych koniecznością rozpuszczenia SOPC tyrozyna nie wytrąca się. Z tego względu wygodniej jest użyć dobrze rozpuszczalnej w wodzie *S*-metylo-L-cysteiny.

Procedura:
Reakcję prowadziłem w 0.1M buforze fosforanu potasu o pH 8.0 zawierającym 1mM merkaptoetanolu, 10mM aminokwasu, 10mM fenolu i 1.6U TPL na 1ml mieszaniny. Reakcję prowadziłem w 30°C przez 3 dni. Następnie roztwór zakwasiłem 10µl stężonego HCl na 1ml mieszaniny. Roztwór ekstrahowałem pięciokrotnie połową objętości toluenu (względem warstwy wodnej). Z warstwy wodnej pobierałem po 0.10ml do oznaczania ilości L-tyrozyny za pomocą

1-nitrozo-2-naftolu (3.1.1.3.). Uzyskałem 8.1% wydajności dla reakcji z L-seryną, 11% z *S*-metylo-L-cysteiną i 18% z SOPC.

3.1.2.3. Synteza z użyciem enzymów hydrolizujących nitryle

Badania wykonane na enzymach hydrolizujących nitryle przeprowadziłem w grupie prof. Florisa P. J. T. Rutjesa z Katolieke Universiteit Nijmegen w Holandii, podczas stażu w ramach programu Socrates-Erasmus. Ich celem była synteza podstawionych prochiralnych malonodinitryli, a następnie ich stereoselektywna desymetryzacja poprzez hydrolizę w obecności komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450, lub stosując ekstrakt z tego organizmu.

W literaturze, poza jednym wyjątkiem (Yokoyama *et al.*, 1993), brakuje prac poświęconych enzymatycznej hydrolizie prochiralnych malonodinitryli. Jeśli produktem reakcji hydrolizy dinitrylu jest amido-kwas, lub amido-nitryl, możliwe jest jego przekształcenie do aminokwasu, lub amidonitrylu poprzez degradację Hoffmana i ewentualną hydrolizę do aminokwasu. Istnieje szansa, że taki szlak syntetyczny może prowadzić do syntezy znakowanej L-tyrozyny.

Wykonałem także syntezy odpowiednich pochodnych prowadzących do fenyloalaniny (ten aminokwas można łatwo przeprowadzić w tyrozynę za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej).

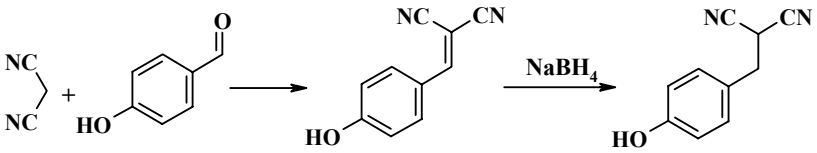
Komórki *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 i ekstrakt komórkowy (zawierający aktywność hydratazy nitryli, lecz nie zawierający aktywność amidazy) z tego organizmu zostały dostarczone przez prof. Helmuta Schwaba, Technical University of Graz, Austria.
Widma NMR w tej części pracy wykonałem na aparatach Bruker WM-200 (200MHz) i Bruker AM-300 (300MHz).
Chromatografię gazową prowadziłem na aparacie HP 5890 (używając N_2 jako nośnika) na kolumnie HP-1 (25m x 0.32mm x 0.17m).
Analizy GC-MS zostały przeprowadzone na podwójnie ogniskującym spektrometrze VG7070E.

3.1.2.3.1. Próba syntezy tyrozyny

2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitryl mógł okazać się substratem dla komórek *Rh. erythropolis* (brakuje doniesień literaturowych na ten temat); mógłby wiec być potencjalnym związkiem wyjściowym do otrzymania tyrozyny. Dlatego należało: 1) otrzymać ten związek; 2) przeprowadzić jego hydrolizę enzymatyczną i zidentyfikować produkty; 3) jeżeli produktem będzie amido-nitryl lub amido-kwas, wykonać syntezę racematu takiego związku celem znalezienia sposobu chromatograficznego oznaczenia nadmiarów enancjomerycznych podczas hydrolizy enzymatycznej; 4) przekształcić produkt hydrolizy w tyrozynę, również w celu ustalenia konfiguracji absolutnej produktu hydrolizy enzymatycznej.

4.1.2.3.1.1. Synteza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu

Syntezę 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu przeprowadziłem przez kondensa-cję Knoevenagela malonodinitrylu z aldehydem *p*-hydroksybenzoesowym prowadzącą do powstania 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitrylu. Redukując ten związek można uzyskać 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitryl (Schemat 26).



Schemat 26. Synteza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu

Kondensacja Knoevenagela dała ilościową wydajność surowego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitrylu (co stwierdziłem za pomocą ^{1}H-NMR).

Kolejny etap – redukcja otrzymanej olefiny do 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu – był krytyczny w tej syntezie. Redukcja za pomocą magnezu w kwasie solnym (Profitt & Watt, 1975) dała jedynie 5.5% wydajności. Zastosowanie $NaBH_4$ (Swaringen *et al.*, 1979) jako reduktora dało bardzo dobrą, 82% wydajność, która jest także wydajnością całej syntezy.

2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitryl:
1.68g (12.7mmol) aldehydu *p*-hydroksybenzoesowego, 1.03g (15.6mmol) malonodinitrylu, 41mg D,L-alaniny, 0.85ml kwasu octowego i 41ml toluenu mieszałem i ogrzewałem do wrzenia w aparacie Deana-Starka przez 2h. Dodałem 18ml THF celem rozpuszczenia wytrąconego osadu; mieszaninę ekstrahowałem 3 x 40ml wody. Warstwę organiczną suszyłem Na_2SO_4. Po przesączeniu i odparowaniu rozpuszczalnika otrzymałem 2.33g surowego żółtego, stałego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitrylu.
^{1}H-NMR (200MHz, $CDCl_3$): δ 5.30 (1H, OH, s), 6.96 (2H, ArH, d, 8.8Hz), 7.65 (1H, CH, s), 7.88 (2H, ArH, d, 8.8Hz)

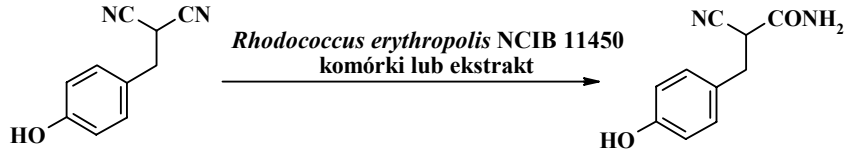
2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitryl (redukcja z Mg/HCl):
2.33g (12.7mmol) surowego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitrylu, 13.3g (554mmol) Mg i 141ml metanolu mieszałem do momentu wytworzenia pierwszych pęcherzyków gazu (30min.). Mieszaninę oziębiłem w łaźni lodowej, wkroplono 260ml 6M HCl w ciągu 4h. Mieszaninę cały czas mieszałem i oziębiałem w łaźni lodowej. Po dodaniu HCl reakcję mieszałem w temperaturze pokojowej przez 20h, a następnie przeekstrahowałem 6 x 106ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 212ml nasyconego roztworu NaCl. Warstwę organiczną suszyłem nad $MgSO_4$, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Produkt izolowałem za pomocą chromatografii kolumnowej na silikażelu w układzie octan etylu-heptan 1:1 (v/v). Otrzymałem 119mg (0.692mmol) stałego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu z wydajnością 5.5% (względem wyjściowego aldehydu *p*-hydroksybenzoesowego.

2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitryl (redukcja z $NaBH_4$):
1.26g (7.43mmol) surowego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylonitrylu rozpuściłem w 26ml etanolu. Roztwór mieszałem i chłodziłem w łaźni lodowo-solnej. Dodawałem 388mg (10.3mmol) $NaBH_4$ w ciągu 15min. Reakcję prowadziłem 100min. mieszając ją i chłodząc w łaźni lodowo-solnej. Następnie dodałem 2ml stężonego HCl i 25ml wody, mieszaninę nasycałem $(NH_4)_2SO_4$, i ekstrahowałem 5 x 25ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 25ml 1M NaOH. Warstwę organiczną suszyłem nad $MgSO_4$, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Pozostałość

rozdzielałem na kolumnie silikażelowej w układzie octan etylu - heptan 1:1 (v/v). Otrzymałem 1.05g (6.10mmol) stałego, białego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu z wydajnością 82%.
^{1}H-NMR (200MHz, $CDCl_3$): δ 3.23 (2H, CH_2, d, 6.7Hz), 3.86 (1H, 2-CH, t, 7.0Hz), 4.83 (1H, OH, s), 6.85 (2H, ArH, d, 8.6Hz), 7.20 (2H, ArH, d, 8.6Hz)

3.1.2.3.1.2 Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu

Enzymatyczną hydrolizę otrzymanego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu przeprowadziłem zarówno wobec komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450, jak i używając ekstraktu z tego mikroorganizmu (Schemat 27).



Schemat 27. Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu

Pierwszym moim zadaniem było określenie produktu hydrolizy. Posiadał on charakterystyczne sygnały protonów amidowych w widmie ^{1}H-NMR. GC/MS potwierdziło obecność 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu. Obecność tego związku jako produktu hydrolizy potwierdziłem także za pomocą TLC po wykonaniu syntezy racemicznego produktu.

Podczas pierwszej próby hydrolizy wyizolowałem produkt z 49% wydajnością, ale reakcja hydrolizy biegnie praktycznie ilościowo, co pokazały dalsze próby (TLC). Wtedy jednak nie oczyszczałem produktu ze względu na jego potencjalną racemizację.

Ekstrakt z komórek *Rh. erythropolis* również powodował powstawanie amido-nitrylu jako produktu hydrolizy. Reakcja nie dawała wydajności ilościowych nawet po 42h reakcji (TLC).

Kolejnym celem była synteza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu i próba znalezienia chromatograficznej metody oznaczania nadmiarów enancjomerycznych w reakcji hydrolizy enzymatycznej (celem optymalizacji warunków reakcji), oraz opracowanie metody przekształcenia tego związku w tyrozynę.

Hydroliza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu w obecności komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450:
Mieszanina 104mg (0.547mmol) 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu i 1.00g komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 w 200ml 0.1M buforu pirofosforanu sodu o pH 7.0 była wytrząsana przy szybkości 200rpm w 28 ^oC przez 2h. Mieszaninę przesączyłem przez hyflo, lejek przemyłem 100ml metanolu, mieszaninę nasyciłem $(NH_4)_2SO_4$ i ekstrahowałem 4 x 100ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad Na_2SO_4, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Pozostałość rozdzielałem na kolumnie silikażelowej w układzie octan etylu-heptan 1:2 (v/v). Otrzymałem 51mg (0.27mmol; 49% wydajności) białego, stałego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu (TLC, ^{1}H-NMR, GC/MS).

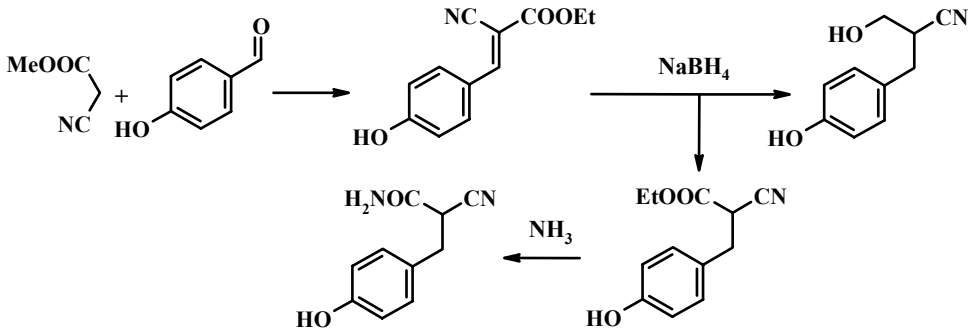
Hydroliza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu z ekstraktem z *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450:
Wytrząsałem mieszaninę 109mg (0.573mmol) 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu i 9.75ml ekstraktu z *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 w 50ml 0.1M buforu pirofosforanu sodu o pH 7.0 przy 200rpm w 28 ^{o}C przez 42h. Następnie mieszaninę zakwasiłem stężonym HCl, nasyciłem $(NH_4)_2SO_4$, dodałem 50ml wody i ekstrahowałem 100ml oraz 5 x 50ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad Na_2SO_4, przesączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Uzyskałem 176mg surowego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu (TLC).

3.1.2.3.1.3. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenyl)-propionamidu

Syntezę racemicznego 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu przeprowadziłem przez kondensację Knoevenagela cyjanooctanu metylu z aldehydem *p*-hydroksybenzoesowym dającą 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylan etylu, jego redukcję do (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfeylo)-propionianu etylu, i przekształcenie estru w (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamid (Schemat 28).

Synteza 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu metylu przez kondensację Knoevenagela w toluenie (Hoffman *et al.*, 1993) dała dobre, 64% przekształcenie substratów w produkt (^{1}H-NMR). Mimo wszystko nie jest to dobra metoda syntezy, gdyż nie można wyizolować produktu za pomocą chromatografii na silikażelu (zarówno 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylan metylu, jak i wyjściowy aldehyd p-hydroksybenzoesowy mają podobną polarność).

Należało znaleźć metodę syntezy dającą całkowite zużycie *p*-hydroksybenzaldehydu. W tym celu przeprowadziłem kondensację w etanolu (Wells *et al.*, 2000), w wyniku której otrzymałem produkt z bardzo dobrą wydajnością (84%). Podczas tej reakcji zachodzi transestryfikacja (wymiana grupy metylowej estru z etanolem jako rozpuszczalnikiem), ale zjawisko to nie ma większego znaczenia dla kolejnych etapów syntezy. Warto też zauważyć, że w wyniku kondensacji Knoevenagela powstał tylko jeden z izomerów geometrycznych produktu. Nie określiłem jego konfiguracji, gdyż ona także nie gra istotnej roli w dalszych przekształceniach.



Schemat 28. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu

Kolejnym etapem była redukcja otrzymanej olefiny do (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionianu etylu. Ten etap okazał się być najtrudniejszym w całej syntezie. Użycie benzaldehydu z 1,2-fenylenodiaminą nie dało ilościowego przekształcenia w produkt, ponadto niemożliwe okazało się chromatograficzne (silikażel) oddzielenie związku docelowego od produktów ubocznych redukcji.

Zastosowanie $NaBH_4$ jako reduktora (Swaringen *et al.*, 1979) dało jako główny produkt (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-1-propanol (wydajność 79%). $NaBH_4$ redukowało nie tylko podwójne wiązanie pomiędzy atomami węgla, ale również grupę estrową. Pożądany (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionian etylu powstał jedynie z 15% wydajnością (oznaczoną po przekształceniu w amid, które zaszło ilościowo - TLC).

Cała synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu dała 13% wydajności.

Uzyskany racemiczny amid użyłem w poszukiwaniach metody oznaczania nadmiarów enancjomerycznych reakcji enzymatycznej hydrolizy 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionitrylu za pomocą chiralnego HPLC i GC. W badaniach na HPLC użyłem kolumny: AD Chiralpack, OB Chiralcel, OD Chiralcel i OJ Chiralcel. Stosowałem różne mieszaniny izopropanlu i heksano jako eluenty, oraz różne szybkości przepływu. Używałem detekcji UV (220 i 280nm). Nie udało się znaleźć układu rozdzielającego enancjomery 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu. Podobnie nie udało mi się osiągnąć tego celu za pomocą chiralnego GC na kolumnach CP-chirasil-Dex CB (25m x 0.25mm x 0.25m) i Gamma Dex 120TM (30m x 0.25mm x 0.25m).

2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylan metylu (synteza w toluenie):
841mg (6.89mmol) aldehydu *p*-hydroksybenzoesowego, 0.700ml (787mg; 7.94mmol) 2-cyjanooctanu etylu, 22mg D,L-alaniny, 0.45ml kwasu octowego i 22ml toluenu mieszałem i ogrzewałem do wrzenia w aparacie Deana-Starka przez 50 min. Dodałem 10ml THF i 10ml octanu etylu, mieszaninę ekstrahowałem 40ml wody. Warstwę wodną ekstrahowałem 20ml octanu etylu i 2 x 20ml eteru dietylowego. Wszystkie warstwy organiczne połączyłem i suszyłem nad Na_2SO_4. Roztwór przesączyłem, odparowałem rozpuszczalnik. Pozostałość rozdzielałem na kolumnie silikażelowej w układzie heptan-octan etylu 2:1 (v/v). Otrzymałem mieszaninę 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu metylu i aldehydu *p*-hydroksybenzoesowego, przekształcenie w produkt wyniosło 64% (^{1}H-NMR).

2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylan etylu (synteza w etanolu):
841mg (6.89mmol) aldehydu *p*-hydroksybenzoesowego, 0.700ml (787mg; 7.94mmol) cyjanooctanu metylu, 5 kropli piperydyny i 10ml etanolu mieszałem i ogrzewałem do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 3h. Potem dodałem 40ml zimnej wody, wytrącone żółte kryształy odsączyłem. Po wysuszeniu uzyskałem 1.26g (5.81mmol) 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu etylu z 84% wydajnością.
^{1}H-NMR (200MHz, CD_3OD): δ 1.32 (3H, CH_3, t, 7.0Hz), 3.84 (1H, OH, s), 4.27 (2H, CH_2, q, 4.0Hz), 6.87 (2H, ArH, d, 8.8Hz), 7.92 (2H, ArH, d, 8.8Hz), 8.16 (1H, CH, s)

(*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionian etylu (redukcja z benzaldehydem):

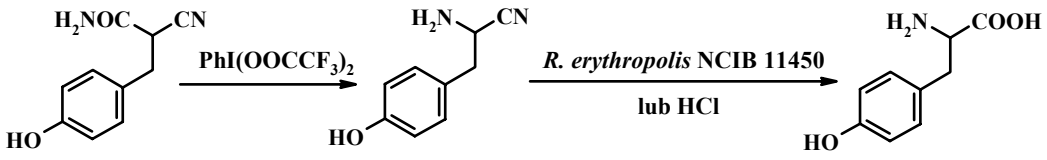
400mg (1.84mmol) 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu etylu, 0.230ml (240mg; 2.27mmol) benzaldehydu, 232mg (2.15mmol) 1,2-fenylenodiaminy i 19ml etanolu mieszałem w temperaturze pokojowej przez 168h. Po odparowaniu rozpuszczalnika mieszaninę rozdzielano na kolumnie silikażelowej w układzie heptan-octan etylu 2:1 (v/v). Uzyskałem 498mg surowego (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionianu etylu.

(*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionian etylu (redukcja z $NaBH_4$):
429mg (1.98mmol) 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu etylu rozpuściłem w 7.6ml etanolu i mieszałem chłodząc w łaźni lodowo-solnej. Dodawałem 141mg (3.73mmol) $NaBH_4$ w 4 porcjach w ciągu 20min. Mieszaninę mieszałem chłodząc w łaźni lodowo-solnej przez 230min. Reakcję zatrzymałem dodając 1.0ml stężonego HCl. Do mieszaniny dodałem 10ml wody, roztwór nasyciłem $(NH_4)_2SO_4$ i ekstrahowałem 5 x 10ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 12ml 1M NaOH i suszyłem nad Na_2SO_4. Po odsączeniu roztworu i odparowaniu rozpuszczalnika uzyskałem 394mg surowej mieszaniny (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-1-propanolu i pożądanego (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionianu etylu.

(*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamid:
279mg surowej mieszaniny (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenyl)-1-propanolu i (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionianu etylu rozpuściłem w 50ml 7M NH_3 w metanolu. Roztwór mieszałem w zamkniętej kolbie w temperaturze pokojowej przez 26 h. Odparowałem rozpuszczalnik, i dodałem kolejne 30ml 7M NH_3 w metanolu. Roztwór ponownie mieszałem w zamkniętej kolbie w temperaturze pokojowej przez kolejne 19h. Odparowałem rozpuszczalnik, pozostałość rozdzielałem na kolumnie silikażelowej w układzie octan etylu-heptan 1:1 (v/v). Uzyskano najpierw 195mg (1.10mmol; minimum 79% wydajności licząc z 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-akrylanu etylu) (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-1-propanolu, a następnie 40mg (0.21mmol; minimum 15% wydajności liczonej podobnie) (*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu.
(*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-1-propanol: ^{1}H-NMR (300MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 2.75-2.93 (2H, 3-CH_2, m), 2.93-3.06 (1H, CH, m), 3.64-3.80 (2H, 1-CH_2, m), 4.54 (1H, 1-OH, bs), 6.77 (2H, ArH, d, 8.4Hz), 7.14 (2H, ArH, d, 8.4Hz), 8.33 (1H, ArOH, bs); ^{13}C-NMR (75 MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 35.1 (C-3), 38.6 (C-2), 62.9 (C(OH)-1), 116.9 (C-3'Ar), 122.4 (CN), 129.8 (C-1'Ar), 131.7 (C-2'Ar), 157.9 (C(OH)-4'Ar)
(*R*,*S*)-2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamid: ^{1}H-NMR (200MHz, DMSO-d_6): δ 2.87-3.09 (2H, CH_2, m), 3.71-3.82 (1H, CH, dd, 2.0Hz, 6.5Hz), 6.63 (2H, ArH, d, 8.3Hz), 7.01 (2H, ArH, d, 8.3Hz), 7.40 (1H, NH, bs), 7.70 (1H, NH, bs), 9.30 (1H, OH, s)

3.1.2.3.1.4. Próba otrzymania tyrozyny z 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu

Do syntezy tyrozyny z 2-cyjano-3-(p-hydroksyfenylo)-propionamidu można użyć reakcji Hoffmana prowadzącego do nitrylu tyrozyny, a następnie hydrolizować ten nitryl (w silnym kwasie celem uniknięcia racemizacji, bądź też enzymatycznie) do tyrozyny (Schemat 29).



Schemat 29. Synteza tyrozyny z 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu.

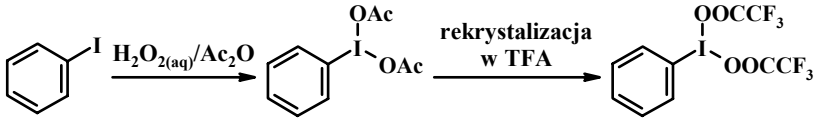
Pierwszym zadaniem była synteza reagenta koniecznego do przeprowadzenia przegrupowania Hoffmana. Dobrym substratem był bis-(trifluorooctan) jodozobenzenu. Klasyczny układ (Br_2, NaOH) nie mógł być tutaj stosowany ze względu na racemizację w silnie zasadowym środowisku na węglu α w wyjściowym nitrylo-amidzie. Bis-

(trifluorooctan) jodozobenzenu przeprowadza reakcję Hoffmana w łagodnych warunkach (pH 1-3 w środowisku wodnym, temperatura pokojowa; Radhakrishna *et al.*, 1979) z całkowitą retencją konfiguracji. Podobnie działają inne trójwiązalne związki jodu, np. jodozobenzen (PhIO) lub hydroksy-(tosyloksy)-jodobenzen (PhI(OTs)OH).

Okazało się, że otrzymana przez mnie pochodna jodozobenzenu rozkłada wyjściowy 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamid. Reakcję prowadziłem mieszając 0.75M roztwór nitrylo-amidu w mieszaninie woda-DMF 1:1 (v/v) w temperaturze pokojowej. Pomimo stosowania różnych nadmiarów molowych bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu i manipulowania czasem reakcji nie udało mi się uzyskać nitrylu tyrozyny w wykrywalnych ilościach. Może to się udać stosując inne, bardziej łagodne reagenty w przegrupowaniu Hoffmana, lub stosując inną metodę syntetyczną prowadzącą od 2-cyjano-3-(*p*-hydroksyfenylo)-propionamidu do tyrozyny.

3.1.2.3.1.4.1. Synteza bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu

Bis-(trifluorooctan) jodozobenzenu uzyskałem utleniając jodobenzen do bis-octanu jodozobenzenu za pomocą perhydrolu w bezwodniku octowym (Swaminathan & Venkatasubramanian, 1975), a następnie przekształciłem go w końcowy produkt poprzez rekrystalizację w TFA – w tych warunkach następowała transacyloksylacja (Loudon *et al.*, 1984; Schemat 30).



Schemat 30. Synteza bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu

Synteza bis-octanu jodozobenzenu dała niezbyt wysoką wydajność (48%). Jego przekształcenie do bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu zaszło jednak z bardzo dobrą, 98%, wydajnością. Cała synteza dała produkt z 47% wydajnością.

Bis-octan jodozobenzenu:
38ml 35% wodnego roztworu H_2O_2 i 160ml bezwodnika octowego mieszałem i ogrzewałem w 40^{o}C pod chłodnicą zwrotną przez 4h (po 20min. mieszanina zaczęła wrzeć wrzenie trwało około 10min.). Następnie dodałem 14.0ml (25.5g; 12.5mmol) jodobenzenu i mieszałem roztwór w temperaturze pokojowej przez 22h. Odparowałem rozpuszczalniki, uzyskałem 19.1g (5.93mmol) białego, stałego bis-octanu jodozobenzenu z 48% wydajnością.
^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O): δ 1.84 (6H, CH_3, s), 7.26-7.36 (2H, *m*-ArH, m), 7.43-7.52 (1H, *p*-ArH, m), 7.83-7.91 (2H, *o*-ArH, m)

Bis-(trifluorooctan) jodozobenzenu:
5.00g (15.5mmol) bis-octanu jodozobenzenu mieszałem z 10.0ml TFA w zamkniętym naczyniu i ogrzewałem do rozpuszczenia substratu. Naczynie otworzyłem, TFA odparowało w ciągu 5h. Pozostałość przemyłem 2 x 1ml eteru dietylowego. Uzyskałem 6.54g (15.2mmol) białych kryształów

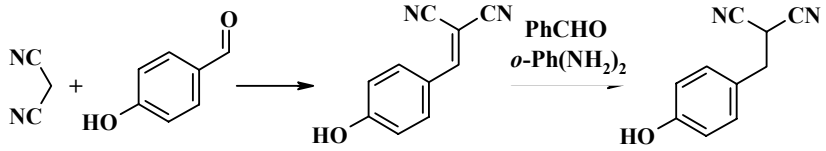
bis-(trifluorooctanu) jodozobenzenu z wydajnością 98%. Temperatura topnienia produktu wyniosła 118-121°C (literatura – Maletina *et al.*, 1974; Makarchenka *et al.*, 1975; – 119-126°C).
^{1}H-NMR (200 MHz, D_2O): δ 7.35-7.47 (2H, *m*-ArH, m), 7.51-7.61 (1H, *p*-ArH, m), 7.98-8.05 (2H, *o*-ArH, m)

3.1.2.3.2. Próba syntezy fenyloalaniny

Podjąłem próbę syntezy fenyloalaniny z użyciem enzymów hydrolizujących nitryle. Zastosowano podobne podejście do sposobu przedstawionego dla syntezy tyrozyny (3.1.2.3.1.). Wiedząc, że produktem enzymatycznej hydrolizy 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu katalizowanej przez komórki *Rh. erythropolis* NCIB 11450, jak i przez ekstrakt komórkowy z tego organizmu, jest 2-cyjano-3-fenylopropionamid (wstępne badania wykonane przez Christien Schortinghuis) należało: 1) otrzymać substrat 2-cyjano-3-fenylopropionitryl; 2) zsyntetyzować racemiczny produkt hydrolizy 2-cyjano-3-fenylopropionamid w celu opracowania sposobu chromatograficznego oznaczenia nadmiarów enancjomerycznych podczas hydrolizy enzymatycznej; 3) przekształcić 2-cyjano-3-fenylopropionamid w fenyloalaninę.

3.1.2.3.2.1. Synteza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu

2-cyjano-3-fenylopropionitryl otrzymałem poprzez kondensację Knoevenagela malonodinitrylu z benzaldehydem (Hoffman *et al.*, 1993), w wyniku której powstawał 2-cyjano-3-fenyloakrylonitryl. Po redukcji tego związku za pomocą benzaldehydu i 1,2-fenylenodiaminy uzyskałem finalny 2-cyjano-3-fenylopropionitryl (Schemat 31).



Schemat 31. Synteza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu.

Kondensacja Knoevenagela prowadziła do ilościowych wydajności 2-cyjano-3-fenyloakrylonitrylu. Redukcja do 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu dała również bardzo dobrą, 90% wydajność, która jest jednocześnie wydajnością całej syntezy.

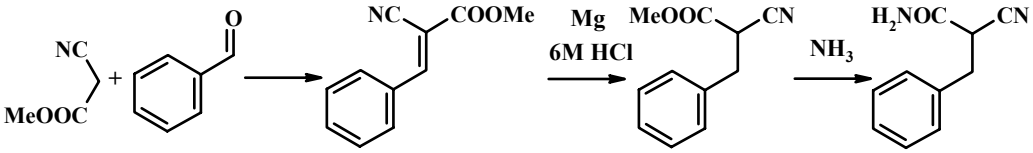
2-cyjano-3-fenyloakrylonitryl:
Mieszałem 5.18g (78.5mmol) malonodinitrylu, 9.66g (91.1mmol) benzaldehydu i 0.66g piperydyny w 150ml etanolu przez 24h w temperaturze pokojowej. Następnie dodałem 250ml wody, mieszaninę ekstrahowałem 3 x 50ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad $MgSO_4$, odsączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Otrzymałem 12.9g (78.5mmol) białego, stałego 2-cyjano-3-fenyloakrylonitrylu ze 100% wydajnością.
^{1}H NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 7.26-7.65 (3H, *m*- and *p*-ArH, m), 7.78 (1H, CH, s), 7.87-7.97 (2H, *o*-ArH, m)

2-cyjano-3-fenylopropionitryl:
Mieszałem 1.08g (6.35mmol) 2-cyjano-3-fenyloakrylonitrylu, 0.72g (6.9mmol) fenyleno-1,2-diaminy i 0.71g (6.7mmol) benzaldehydu w 65ml etanolu w temperaturze pokojowej przez 16h. Etanol odparowałem, pozostałość zawiesiłem w 50ml chlorku metylenu. Po przesączeniu odparowałem

rozpuszczalnik z przesączu. Otrzymałem 0.89g (5.7mmol) białego stałego 2-cyjano-3-fenylopropionitylu z wydajnością 90%.
^{1}H NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 3.23 (2H, CH_2, d, 6.9Hz), 3.84 (1H, CH, t, 13.9Hz), 7.26-7.41 (5H, ArH, m)

3.1.2.3.2.2. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamidu

Syntezę (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamidu przeprowadziłem poprzez kondensację Knoevenagela cyjanooctanu metylu z benzaldehydem prowadzącą do powstania 2-cyjano-3-fenyloakrylanu metylu. W wyniku jego redukcji za pomocą magnezu w obecności kwasu uzyskałem 2-cyjano-3-fenylopropionian metylu. Podstawiając grupę metoksylową estru amoniakiem otrzymałem 2-cyjano-3-fenylopropionamid (Schemat 32).



Schemat 32. Synteza (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamidu.

W wyniku kondensacji Knoevenagela uzyskałem z bardzo dobrą (90%) wydajnością 2-cyjano-3-fenyloakrylan metylu. Jego redukcja do (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionianu metylu zaszła również bardzo wydajnie (93%). Natomiast przekształcenie estru w racemiczny 2-cyjano-3-fenylopropionamid dało niezbyt wysoką wydajność (40%).

(*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamid uzyskałem z całkowitą wydajnością 34%.

Uzyskany nitrylo-amid użyłem w poszukiwaniach chromatograficznej metody oznaczania e.e. w reakcji hydrolizy enzymatycznej. W badaniach na HPLC użyłem kolumny: AD Chiralpack, OB Chiralcel, OD Chiralcel i OJ Chiralcel stosując mieszaniny izopropanolu i heptanu przy różnych szybkościach przepływu. Chromatografię wykonywano stosując detekcję UV przy długościach fali 220 i 254nm. W tych warunkach nie udało się uzyskać rozdziału enencjomerów. Próbowałem także rozdzielić enancjomery 2-cyjano-3-fenylopropionamidu za pomocą chromatografii gazowej używając kolumn CP-chirasil-Dex CB (25m x 0.25mm x 0.25m) i Gamma Dex 120TM (30m x 0.25mm x 0.25m), oraz zmieniając temperaturę podczas procesu, ale tu także nie udało mi się uzyskać rozdziału enancjomerów.

2-cyjano-3-fenyloakrylan metylu:
Mieszałem 5.05g (51.0mmol) cyjanooctanu metylu, 6.46g (60.9mmol) benzaldehydu i 0.44g piperydyny w 70ml etanolu przez 1h w temperaturze pokojowej. Dodałem 200ml wody, mieszaninę ekstrahowałem 3 x 50ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad $MgSO_4$, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Pozostałość rozdzielałem na kolumnie silikażelowej używając układu heptan-octan etylu 4:1 (v/v). Otrzymałem 8.58g (45.9mmol) 2-cyjano-3-fenyloakrylanu metylu z wydajnością 90%.
^{1}H NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 3.95 (3H, OMe, s), 7.49-7.60 (3H, *m*- i *p*-ArH, m), 7.96-8.05 (2H, *o*-ArH, m), 8.27 (1H, CH, s)

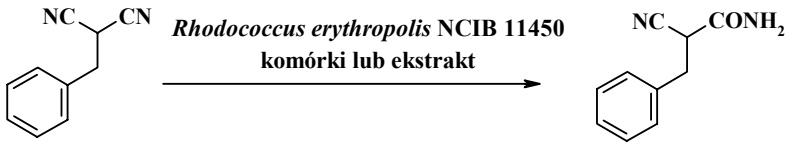
(*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionian metylu:

Mieszałem 994mg (5.31mmol) 2-cyjano-3-fenyloakrylanu metylu z 5.15g (214mmol) metalicznego magnezu w 53ml metanolu przez 10min. Mieszaninę oziębiłem do 0ºC i wkropliłem do niej 98ml 6M HCl (utrzymując chłodzenie). Po dodaniu HCl roztwór mieszałem przez dzień w temperaturze pokojowej, a następnie ekstrahowałem 3 x 50ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne przemyłem 40ml nasyconego roztworu NaCl, a następnie suszyłem nad $MgSO_4$, przesączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Otrzymałem 933mg (4.94mmol) (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionianu metylu z wydajnością 93%.
^{1}H NMR (300MHz): δ 3.19-3.27 (2H, CH_2, m), 3.71-3.78 (1H, CH, m), 3.79 (3H, OMe, s), 7.26-7.35 (5H, ArH, m)

(*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamid:
Rozpuściłem 3.96g (21.0mmol) (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionianu metylu w 200ml 7M NH_3 w metanolu i mieszałem przez 64h w zamkniętej kolbie w temperaturze pokojowej. Następnie odparowałem rozpuszczalnik, pozostałość rozdzieliłem na kolumnie silikażelowej w układzie octan etylu-heptan 1:1 (v/v). Uzyskałem 1.47g (8.45mmol) białego, stałego (*R*,*S*)-2-cyjano-3-fenylopropionamidu z wydajnością 40%.
^{1}H-NMR (200MHz, DMSO-d_6): δ 2.90-3.13 (2H, CH_2, m), 3.82-3.93 (1H, CH, m), 7.13-7.32 (5H, ArH, m), 7.44 (1H, NH, bs), 7.73 (1H, NH, bs)

3.1.2.3.2.3. Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu

Enzymatyczną hydrolizę 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu przeprowadziłem używając komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 i ekstraktu z tego organizmu (Schemat 33).



Schemat 33. Enzymatyczna hydroliza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu.

W obydwu wypadkach produktem hydrolizy enzymatycznej jest 2-cyjano-3-fenylopropionamid (TLC).

Podczas reakcji katalizowanej przez komórki przekształcenie substratu w produkt jest całkowite po 1.5h reakcji (TLC). Ze względu na prawdopodobną racemizację na atomie węgla w pozycji 2 nie oczyszczałem produktu, który miałem zamiar użyć do dalszych przekształceń.

Reakcja z ekstraktem z komórek *Rh. erythropolis* NCIB 11450 nie zachodziła ilościowo nawet po 21h (TLC). Tutaj także nie oczyszczałem dokładnie produktu reakcji.

Próby przekształcenia 2-cyjano-3-fenylopropionamidu otrzymanego w wyniku hydrolizy enzymatycznej nie powiodły się, albowiem bis-(trifluorooctan) jodozobenzenu rozkłada związki aromatyczne (w tej pracy zarówno pochodne fenylowe, jak i *p*-hydroksyfenylowe; 3.1.2.3.1.4.).

Hydroliza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu przy pomocy komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450:
Wytrząsałem mieszaninę 111mg (0.712mmol) 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu i 222mg komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 w 200ml 0.1M buforu pirofosforanu sodu o pH 7.0 w 28^{o}C

przez 160min. przy szybkości obrotów 200rpm. Następnie mieszaninę zakwasiłem 10ml stężonego HCl, nasyciłem $(NH_4)_2SO_4$, i ekstrahowałem 4 x 100ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad Na_2SO_4, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Uzyskałem 129mg surowego 2-cyjano-3-fenylopropionamidu (TLC).

Hydroliza 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu za pomoca ekstraktu z *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450:
Wytrząsałem mieszaninę 114mg (0.731mmol) 2-cyjano-3-fenylopropionitrylu i 3.00ml ekstraktu z komórek *Rhodococcus erythropolis* NCIB 11450 w 50ml 0.1M buforu pirofosforanu sodu o pH 7.0 w 28°C przez 21h przy szybkości wytrząsania 200rpm. Mieszaninę zakwasiłem stężonym HCl, nasyciłem $(NH_4)_2SO_4$, dodałem 150ml wody i ekstrahowałem 5 x 50ml octanu etylu. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad Na_2SO_4, przesączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Pozostałość przemyłem heptanem. Otrzymałem 111mg surowego 2-cyjano-3-fenylopropionamidu (TLC).

3.1.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej ^{14}C

3.1.3.1. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny

Wygodnym sposobem otrzymania [1-^{14}C]-L-tyrozyny jest enzymatyczne utlenianie [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (PMO). W naszym zespole została opracowana z moim udziałem metoda syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (Augustyniak *et al.*, 2001; Jemielity, 2001).

PMO nie jest enzymem dostępnym handlowo, dlatego musiałem otrzymać jego preparat.

3.1.3.1.1. Izolacja monooksygenazy L-fenyloalaninowej z wątroby szczura

Dobrym źródłem enzymów utleniających aminokwasy aromatyczne są wątroby ssaków. Jako źródła PMO użyto wątroby szczura. W izolacji wykorzystano frakcjonowanie etanolem i siarczanem amonu według procedury Kaufmana, 1962.

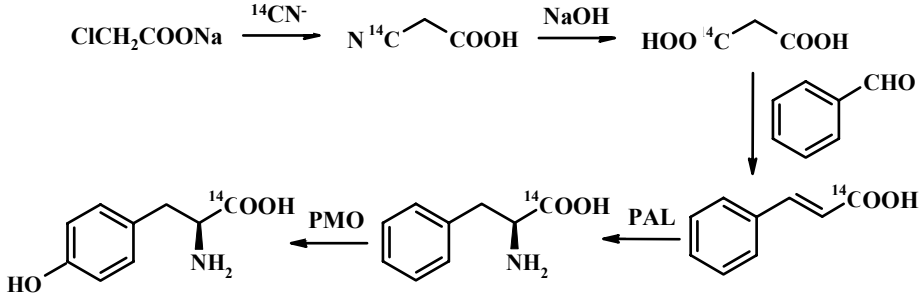
Procedura (przeprowadzana w 4°C):
89g wątrób szczurzych pokroiłem, dodałem 130ml 10mM kwasu octowego i homogenizowałem. Dodałem kolejne 130ml 10mM kwasu octowego i znów homogenizowałem preparat. Mieszaninę wirowałem przez 45min. w 18kG. Osad odrzuciłem, do supernatantu (260ml) dodałem 29ml etanolu o temperaturze -40°C. Po całodziennym wytrącaniu białka preparat wirowałem przez 45min. w 18kG. Osad odrzuciłem, do supernatantu (290ml) dodałem kolejne 40ml etanolu o temperaturze -40°C. Osad białka wytrącałem przez dzień, po czym odwirowałem przez 45min w 18kG. Supernatant odrzuciłem, osad rozpuściłem w 25ml 33mM buforu fosforanu potasu o pH 7.4, roztwór miał 30ml objętości. Dodałem do niego 6.2g siarczanu amonu i wytrącałem białko przez dzień. Mieszaninę wirowałem przez 45min. w 18kG. Osad odrzuciłem, do supernatantu dodałem 1.71g siarczanu amonu. Białko wytrąciłem przez dzień i wirowałem przez 45min. w 18kG. Supernatant odrzuciłem, osad rozpuściłem w 8ml 33mM buforu Tris o pH 6.8. Otrzymany preparat PMO przeprowadzał 81.7% L-fenyloalaniny w L-tyrozynę w ciągu 2 dni.

Oznaczanie aktywności PMO w preparacie:
Reakcję przeprowadzałem w 1ml 0.1M buforu fosforanu potasu o pH 6.8, który zawierał 2mM L-fenyloalaniny, 2mM DTT, 50μM D,L-6-metylo-5,6,7,8-tetrahydropteryny, 15kU katalazy i 0.10ml

badanego preparatu. Reakcję prowadziłem przez 2 dni w temperaturze pokojowej. Do oznaczania ilości powstałej L-tyrozyny za pomocą 1-nitrozo-2-naftolu (3.1.1.3.) pobierałem 0.10ml mieszaniny.

3.1.3.1.2. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny

Syntezę [1-^{14}C]-L-tyrozyny wykonałem w kilku etapach. Pierwszym z nich była substytucja atomu chloru w kwasie chlorooctowym anionem $^{14}CN^-$, kolejnym alkaliczna hydroliza grupy nitrylowej do karboksylowej, następnie w wyniku kondensacji Knoevenagela powstałego kwasu [1-^{14}C]-malonowego z benzaldehydem uzyskano kwas [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy. [1-^{14}C]-L-fenyloalaninę otrzymałem przez addycję amoniaku do wspomnianego kwasu cynamonowego katalizowaną przez liazę L-fenyloalaninową (Augustyniak *et al.*, 2001b; Jemielity, 2001). L-fenyloalaninę utleniłem do [1-^{14}C]-L-tyrozyny za pomocą otrzymanej 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975; Augustyniak *et al.*, 2001a). Schemat 34 przedstawia kolejne etapy syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny.



Schemat 34. Synteza [1-^{14}C]-L-tyrozyny

Synteza kwasu [1-^{14}C]-malonowego dała wydajność 48%. Prawdopodobnie duże straty następują podczas procedury oczyszczania, najpierw podczas wytrącania malonianu wapnia, a później podczas ekstrakcji kwasu z fazy wodnej do eterowej, gdyż rozpuszczalność kwasu malonowego w wodzie jest wyższa niż w eterze dietylowym.

Podczas syntezy kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego za pomocą kondensacji Knoevenagela należy liczyć się z utratą połowy izotopu wskutek dekarboksylacji jednej z grup karboksylowych, w których znajduje się znacznik. Reakcja daje wysokie (82%) wydajności.

Enzymatyczna synteza [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny z kwasu cynamonowego za pomocą PAL daje wydajności rzędu 40% (w tym wypadku 37%), albowiem wtedy jest osiągany stan równowagi dla układu reakcyjnego. Należało pamiętać o tym, aby stężenie kwasu cynamonowego w mieszaninie reakcyjnej nie było dużo większe od użytego tutaj 0.5mM, albowiem jest on inhbitorem PAL. Amoniak dołączany do cząsteczki substratu pochodzi z buforu amonowego. Do oczyszczania używałem ekstrakcji (celem odzyskania nieprzereagowanego kwasu cynamonowego), a następnie chromatografii kationowymiennej celem oddzielenia soli pochodzących z buforu od powstałego aminokwasu.

Użycie uzyskanego preparatu PMO dało dość duże wydajności konwersji [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny w [1-^{14}C]-L-tyrozynę (68%), Tutaj również bardzo istotne jest aby stężenie substratu (L-fenyloalaniny) nie było wyższe niż 2mM ze względu na inhibicję enzymu. Tlen z powietrza jest utleniaczem w tej reakcji, dlatego dobrze jest ją prowadzić w otwartym naczynku i wstrząsać co pewien czas. Przenośnikiem tlenu jest stosowana jako kofaktor pteryna. Reakcja utleniania jest procesem rodnikowym, dodatek katalazy rozkłada tworzący się ubocznie nadtlenek wodoru, który może potencjalnie utleniać aminokwasy aromatyczne. Procedura oczyszczania obejmuje wytrącanie białka enzymatycznego za pomocą kwasu chlorowego (VII), chromatografię kationowymienną celem oddzielenia soli od aminokwasów, oraz chromatografię podziałową na celulozie, która pozwala na rozdział L-tyrozyny od L-fenyloalaniny.

Cała synteza dała wydajność chemiczną 10% i radiochemiczną 3.8%.

Procedury syntezy L-fenyloalaniny i L-tyrozyny były stosowałem wielokrotnie do otrzymywania różnie znakowanych L-tyrozyn, dlatego też podałem generalne procedury syntezy tych aminokwasów, do których będą odniesienia w dalszych rozdziałach pracy.

Kwas [1-^{14}C]-malonowy:
1.03g (10.9mmol) kwasu chlorooctowego rozpuściłem w 2.9ml wody i zobojętniłem Na_2CO_3. Mieszaninę oziębiłem w lodzie, mieszałem i dodałem porcjami 656mg (10.1mmol) K^{14}CN (Polatom, Świerk, Polska) o aktywności całkowitej 185MBq i właściwej 18.5MBq/mmol. Następnie mieszaninę mieszałem i ogrzewałem do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2h. Potem dodałem 584mg (14.6mmol) stałego NaOH, roztwór mieszałem i ogrzewałem do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 13h. Po ochłodzeniu mieszaniny dodałem do niej 1.53g (13.8mmol) $CaCl_2$ rozpuszczone w 4.0ml wody. Po całodziennej krystalizacji osad odsączyłem i rozpuściłem w stężonym HCl. Mieszaninę ekstrahowałem 10 x 12ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne suszyłem nad $MgSO_4$, odparowałem eter z roztworu uzyskanego po przesączeniu. Uzyskałem 508mg (4.88mmol) kwasu [1-^{14}C]-malonowego o aktywności całkowitej 89.4MBq i właściwej 18.5MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 48%. Temperatura topnienia produktu 133^{o}C (literatura 135^{o}C).

Kwas [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy:
508mg (4.88mmol) kwasu [1-^{14}C]-malonowego o aktywności całkowitej 89.4MBq i właściwej 18.5MBq/mmol zmieszałem z 1.00ml (9.85mmol) świeżo przedestylowanego benzaldehydu, 0.50ml pirydyny, 30µl piperydyny i 0.11g Na_2SO_4. Otrzymany roztwór mieszałem i ogrzewałem pod chłodnicą zwrotną do wrzenia przez 4h. Wydzielający się $^{14}CO_2$ pochłaniałem w płuczce z 0.1M wodnym roztworem NaOH, gaz wypierałem znad mieszaniny reakcyjnej argonem. Do ochłodzonej mieszaniny reakcyjnej dodałem 10ml zimnej wody, roztwór zakwasiłem stężonym HCl, oraz ekstrahowałem 3 x 20ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 4 x 10ml 10% Na_2CO_3. Połączone warstwy wodne zakwasiłem stężonym HCl. Wytrącony produkt odsączyłem pod zmniejszonym ciśnieniem i suszyłem nad P_2O_5. Uzyskałem 595mg (4.02mmol) kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 27.7MBq i właściwej 6.88MBq/mmol z 82% wydajności chemicznej i 31% radiochemicznej. Temperatura topnienia produktu 131^{o}C (literatura 133-135^{o}C).

[1-^{14}C]-L-fenyloalanina:
Ogólna procedura: reakcję przeprowadzałem w 1.8M buforze chlorku amonu o pH 9.7 (uzyskanym za pomocą NaOH) zawierającym 0.5mM kwas (*E*)-cynamonowy i 0.1U PAL na 1ml mieszaniny. Reakcję prowadziłem w 30^{o}C przez 5 dni. Następnie mieszaninę zakwaszałem 20µl stężonego HCl na 1ml mieszaniny. Mieszaninę ekstrahowałem pięciokrotnie dwukrotnie mniejszą objętością eteru

dietylowego. Warstwę wodną nanosiłem na kolumnę zawierającą kationit Amberlit IR 120(H^+) (150 x 15mm) i wymywałem wodą sole z buforu (kontrola za pomocą 5%$AgNO_3$), a następnie wymywałem L-fenyloalaninę za pomocą 0.3M NH_3. Frakcje zawierające aminokwas łączyłem i odparowywałem z nich wodę.
Z 13.1mg (0.885mmol) kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 6.09MBq i właściwej 6.88MBq/mmol otrzymałem 0.328mmol [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 2.26MBq i właściwej 6.88MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 37%.

[1-^{14}C]-L-tyrozyna:
Ogólna procedura: reakcję przeprowadziłem w 0.1M buforze fosforanu potasu o pH 6.8, który zawierał 2mM L-fenyloalaniny, 2mM DTT, 501.0μM D,L-6-metylo-5,6,7,8-tetrahydropteryny, 15kU katalazy i 0.10ml PMO na 1ml mieszaniny. Reakcję prowadziłem przez 2 dni w temperaturze pokojowej wytrząsając roztwór w celu nasycenia go tlenem. Reakcję przerywałem dodając 0.1 objętości 60% kwasu chlorowego (VII). Wytrącone białko odwirowywałem, supernatant nanosiłem na kationit Amberlit IR 120(H^+) (150 x 15mm) i wymywałem wodą sole z buforu (kontrola za pomocą 5%$AgNO_3$ po uprzednim zobojętnieniu roztworu), a następnie wymywałem aminokwasy za pomocą 0.3M NH_3. Frakcje zawierające aminokwasy łączyłem i odparowywałem z nich wodę. Pozostałość nanosiłem na preparatywną płytkę celulozową (DC-Cellulose, grubość płytki 0.1mm, Merck) 20 x 20cm, którą rozwijałem w układzie chloroform-metanol-20% wodny roztwór amoniaku 58:32:10 (v/v/v). Płytkę wywoływałem w ciemni fotograficznej za pomocą autoradiografii. Do wysuszonej płytki przykładałem medyczną błonę radiograficzną (18 x 24cm, Foton XS-1N), ekspozycję prowadziłem przez dzień. Błonę wywoływałem automatycznie za pomocą wywoływarki Fuji Photo Film FPM-800A. Obszary płytki zawierające L-tyrozynę (R_f od 0.2 do 0.4) wydrapywałem i wymywałem z nich aminokwas wodą, którą następnie odparowywałem.
Wychodząc z 36.1μmol [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 248kBq i właściwej 6.88MBq/mmol otrzymałem 24.4μmol [1-^{14}C]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 168kBq i właściwej 6.88MBq/mmol z 68% wydajności chemicznej i radiochemicznej.

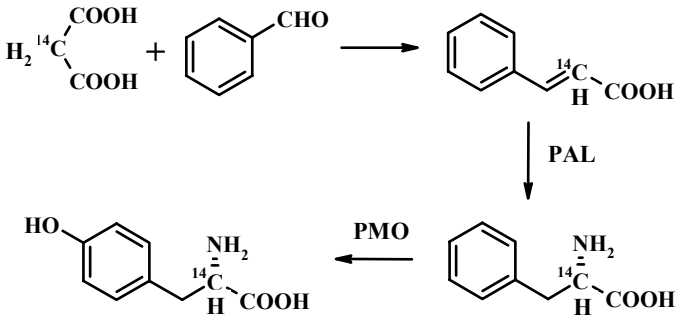
3.1.3.2. Synteza [2-^{14}C]-L-tyrozyny

Syntezę [2-^{14}C]-L-tyrozyny wykonałem w podobny sposób jak syntezę [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Pierwszym etapem była kondensacja Knoevenagela kwasu [2-^{14}C]-malonowego z benzaldehydem, w wyniku której otrzymano kwas [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy. [2-^{14}C]-L-fenyloalaninę uzyskałem przez addycję amoniaku do wspomnianego kwasu cynamonowego katalizowaną przez liazę L-fenyloalaninową (Augustyniak *et al.*, 2001b; Jemielity, 2001). L-fenyloalaninę utleniłem do [2-^{14}C]-L-tyrozyny za pomocą otrzymanej 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975; Augustyniak *et al.*, 2001a). Schemat 35 przedstawia kolejne etapy syntezy [2-^{14}C]-L-tyrozyny.

Synteza kwasu [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego za pomocą kondensacji Knoevenagela dała wysoką (85%) wydajność chemiczną, ale wydajność radiochemiczna była dużo niższa (31%). Prawdopodobnie jest to efekt radiolizy handlowego preparatu kwasu [2-^{14}C]-malonowego.

Enzymatyczna synteza [2-^{14}C]-L-fenyloalaniny z kwasu cynamonowego dała dobrą wydajność 44%. Przekształcenie wspomnianej L-fenyloalaniny w [2-^{14}C]-L-tyrozynę również zaszło stosunkowo wydajnie (63%).

Cała synteza dała wydajność chemiczną 23% i radiochemiczną 8.5%.



Schemat 35. Synteza [2-^{14}C]-L-tyrozyny

Kwas [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy:
502mg (4.82mmol) kwasu [2-^{14}C]-malonowego (Moravek Biochemicals, USA) o aktywności całkowitej 9.25MBq i właściwej 1.92MBq/mmol zmieszałem z 1.00ml (9.85mmol) świeżo przedestylowanego benzaldehydu, 0.50ml pirydyny, 30µl piperydyny i 0.10g Na_2SO_4. Otrzymany roztwór mieszałem i ogrzewałem pod chłodnicą zwrotną do wrzenia przez 4h. Do ochłodzonej mieszaniny reakcyjnej dodałem 10ml eteru dietylowego i ekstrahowałem 5 x 5ml 2M KOH. Połączone warstwy wodne zakwasiłem 6.0ml stężonego HCl. Wytrącony produkt odsączyłem pod zmniejszonym ciśnieniem i suszyłem nad P_2O_5. Uzyskałem 604 mg (4.08 mmola) kwasu [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 2.84MBq i właściwej 695kBq/mmol z 85% wydajności chemicznej i 31% radiochemicznej. Temperatura topnienia produktu 134^{o}C (literatura 133-135^{o}C).

[2-^{14}C]-L-fenyloalanina:
Syntezę wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 9.7mg (66 µmol) kwasu [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 46kBq i właściwej 695kBq/mmol otrzymałem 29µmol [2-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 20kBq i właściwej 0.69MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 44%.

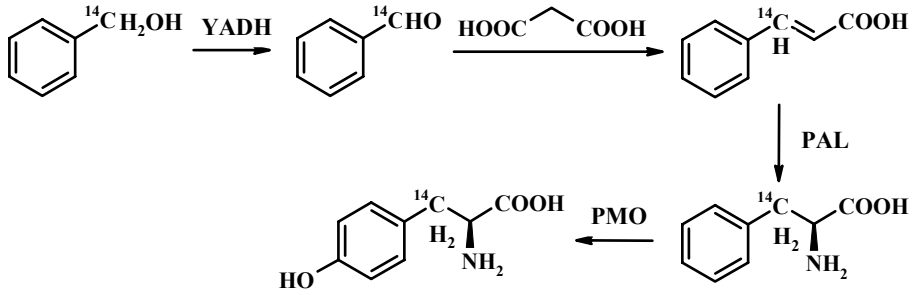
[2-^{14}C]-L-tyrozyna:
Syntezę wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 20µmol [2-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 14kBq i właściwej 0.69MBq/mmol otrzymałem 13µmol [2-^{14}C]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 8.7kBq i właściwej 0.69MBq/mmol z 63% wydajności chemicznej i radiochemicznej.

3.1.3.3. Synteza [3-^{14}C]-L-tyrozyny

Do syntezy [3-^{14}C]-L-tyrozyny wykorzystałem metodę podobną do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Uprzednio otrzymałem kwas [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy. Cel osiągnąłem wychodząc z otrzymanego uprzednio w naszym zespole alkoholu [1-^{14}C]-benzylowego (Bukowski *et al.*, 1998; Bukowski, 2001), który utleniono do aldehydu [1-^{14}C]-benzoesowego za pomocą dehydrogenazy alkoholowej. W reakcji Knoevenagela otrzymałem z aldehydu kwas [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy. [3-^{14}C]-L-fenyloalaninę uzyskałem przez addycję amoniaku do kwasu cynamonowego katalizowaną przez liazę L-fenyloalaninową. L-fenyloalaninę utleniłem do [3-^{14}C]-L-tyrozyny za pomocą otrzymanej 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975). Schemat 36 przedstawia kolejne etapy syntezy [3-^{14}C]-L-tyrozyny.

Enzymatyczne utlenianie alkoholu [1-^{14}C]-benzylowego do aldehydu [1-^{14}C]-benzoesowego przy pomocy YADH i NAD^+ jako utleniacza zwykle daje bardzo

dobre wydajności po krótkim czasie reakcji dla alkoholi pierwszorzędowych. W wyniku zastosowanej procedury uzyskałem mieszaninę powstałego aldehydu z nieprzereagowanym substratem. W celu uniknięcia strat radioaktywnego benzaldehydu dodałem nieznakowanego aldehydu podczas ekstrakcji. Syntezę przeprowadziłem możliwie jak najszybciej i starałem się unikać zbyt długiego kontaktu benzaldehydu z tlenem ze względu na utlenianie aldehydu do kwasu benzoesowego. Również z tego względu surowy produkt poddałem następnemu etapowi syntezy natychmiast po wytworzeniu i niezbędnej obróbce.



Schemat 36. Synteza [3-^{14}C]-L-tyrozyny

Synteza kwasu [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego za pomocą kondensacji Knoevenagela dała dobrą (63%) wydajność chemiczną, ale wydajność radiochemiczna liczona z wyjściowego alkoholu benzylowego była niska (14%). Może to wynikać ze stosunkowo niskiej wydajności w reakcji utleniania alkoholu benzylowego do benzaldehydu.

Enzymatyczna synteza [3-^{14}C]-L-fenyloalaniny z kwasu cynamonowego dała niską wydajność 5.0%. Przekształcenie wspomnianej L-fenyloalaniny w [3-^{14}C]-L-tyrozynę również zaszło mało wydajnie (28%). Niskie wydajności etapów enzymatycznych mogły być spowodowane inaktywacją enzymów wskutek długotrwałego przechowywania, wielokrotnego rozmrażania, jak i obecności inhibitorów jako zanieczyszczeń wyjściowych substratów.

Synteza [3-^{14}C]-L-tyrozyny przebiegła z wydajnością chemiczną 0.88% i radiochemiczną 0.20%. Pomimo niskich wydajności udało się uzyskać ilość związku pozwalającą na przeprowadzenie badań nad mechanizmem działania fenololiazy tyrozynowej.

Aldehyd [1-^{14}C]-benzoesowy:
Do mieszaniny 134mg (0.202mmol) NAD^+ i 2940U YADH w 5.0 ml 0.083M buforu pirofosforanu sodu (doprowadzonego Na_2HPO_4 do pH 8.7) dodałem 0.125mmol alkoholu [1-^{14}C]-benzylowego o aktywności całkowitej 1.80MBq i właściwej 14.4MBq/mmol rozpuszczonego w 1.8ml eteru dietylowego. Mieszaninę inkubowałem w temperaturze pokojowej przez 1h pod argonem, a następnie ekstrahowałem 5ml eteru dietylowego i 2 x 5ml eteru dietylowego z dodatkiem 0.50 ml przedestylowanego benzaldehydu (łącznie 9.91mmol) i jeszcze 5ml eteru dietylowego. Połączone warstwy eterowe suszyłem przez 15min. nad bezwodnym Na_2SO_4 pod argonem i przesączyłem. Eter odparowałem pod zmniejszonym ciśnieniem. Uzyskałem 1.05g (9.90mmol) surowego aldehydu [1-^{14}C]-benzoesowego o aktywności całkowitej 1.80MBq i właściwej 14.4MBq/mmol.

Kwas [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy:

1.05g (9.90mmol) aldehydu [1-^{14}C]-benzylowego o aktywności całkowitej 1.80MBq i właściwej 14.4MBq/mmol zmieszałem z 2.06g (19.8mmol) kwasu malonowego, 1.0ml pirydyny, 50µl piperydyny i 0.31g Na_2SO_4. Otrzymany roztwór mieszałem i ogrzewałem pod chłodnicą zwrotną do wrzenia przez 4h. Do ochłodzonej mieszaniny reakcyjnej dodałem (ciągle mieszając roztwór) 20ml wody i 5.0 ml stężonego HCl. Wytrącony osad odsączyłem pod zmniejszonym ciśnieniem i rekrystalizowałem rozpuszczając go w minimalnej ilości wrzącego etanolu oraz wytrącając zimną wodą. Po odsączeniu pod zmniejszonym ciśnieniem i suszeniu nad P_2O_5 otrzymałem 923mg (6.24mmol) kwasu [3-^{14}C]-cynamonowego o aktywności całkowitej 252kBq i właściwej 40.3kBq/mmol z 63% wydajności chemicznej i 14% radiochemicznej (względem wyjściowego alkoholu [1-^{14}C]-benzylowego). Temperatura topnienia produktu 133^{o}C (literatura 133-135^{o}C).

[3-^{14}C]-L-fenyloalanina:
Syntezę wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (3.1.3.1.2.). Wychodząc ze 163mg (1.10mmol) kwasu [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 44.3kBq i właściwej 40.3kBq/mmol otrzymałem 55.0µmol [3-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 2.22kBq i właściwej 40.3kBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 5.0%.

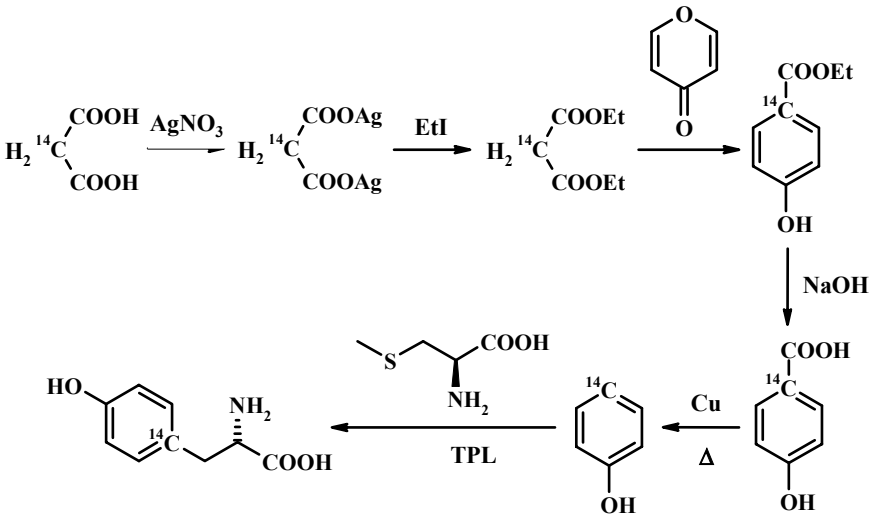
[3-^{14}C]-L-tyrozyna:
Syntezę wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 55.0µmol [3-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 2.22kBq i właściwej 40.3kBq/mmol otrzymałem 15.4µmol [3-^{14}C]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 621Bq i właściwej 40.3kBq/mmol z 28% wydajności chemicznej i radiochemicznej.

3.1.3.4. Synteza [1'-^{14}C]-L-tyrozyny

W syntezie [1'-^{14}C]-L-tyrozyny wykorzystałem metodę stosowaną przez Beyera *et al.*, 1998. W ich pracy otrzymywano racemiczną [1'-^{13}C]-tyrozynę poprzez kwas [1'-^{13}C]-*p*-hydroksybenzoesowy. Kwas ten otrzymano z malonianu dietylowego i 4*H*-piran-4-onu. Po alkalicznej hydrolizie otrzymanego *p*-hydroksybenzoesanu etylu uzyskano kwas *p*-hydroksybenzoesowy. Dla potrzeb swojej pracy użyłem tę metodę wprowadzając pewne modyfikacje. [2-^{14}C]-malonian dietylu otrzymałem w wyniku wytrącania [2-^{14}C]-malonianu srebra z lekko zasadowego roztworu handlowo dostępnego kwasu [2-^{14}C]-malonowego, i przekształcenia soli w ester poprzez ogrzewanie z jodkiem etylu (Murray & Williams, 1958). [2-^{14}C]-malonian dietylu przekształciłem w kwas [1'-^{13}C]-*p*-hydroksybenzoesowy w omówiony powyżej sposób. Otrzymany kwas zdekarboksylowałem w bardzo wysokich temperaturach (255^{o}C) w zasadowym środowisku w obecności sproszkowanej miedzi do [4-^{14}C]-fenolu (Aronoff, 1957), z którego uzyskałem [1'-^{14}C]-L-tyrozynę w wyniku reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową w obecności *S*-metylo-L-cysteiny i PLP jako kofaktora (Phillips *et al.*, 1989). Schemat 37 przedstawia etapy syntezy [1'-^{14}C]-L-tyrozyny.

Wytrącanie [2-^{14}C]-malonianu srebra przebiegło z dobrą wydajnością (80%), ale wydajność radiochemiczna była dużo niższa (43%). Mogło to być spowodowane radiolizą handlowego preparatu kwasu [2-^{14}C]-malonowego.

Estryfikacja otrzymanej soli jodkiem etylu dała przeciętne wydajności (60%) [2-^{14}C]-malonianu dietylu.



Schemat 37. Synteza [1'-^{14}C]-L-tyrozyny

Kluczowy etap w całej syntezie – otrzymywanie [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesanu etylu – zaszło z satysfakcjonującą wydajnością (70%), choć wyraźnie niższą niż literaturowa (85%; Beyer *et al.*, 1998).

Hydroliza otrzymanego estru do kwasu [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowego zaszła z bardzo wysoką wydajnością (96%) niewiele niższą od literaturowej (99%; Beyer *et al.*, 1998).

Krytycznym etapem syntezy była dekarboksylacja kwasu [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowego do [4'-^{14}C]-fenolu. Jest to bardzo mało wydajna reakcja, gdyż dekarboksylacja kwasów aromatycznych zachodzi w drastycznych warunkach (255^{o}C), a tworzący się fenol, jak i substrat łatwo ulegają rozkładowi w takich warunkach. Dlatego wydajność tego etapu wyniosła tylko 2.4% (podczas próbnej syntezy fenolu nieznakowanego uzyskałem niewiele nieco większą wydajność 5.6%). Ta reakcja jest bardzo rzadko używana w syntezie, samo znalezienie odpowiedniej procedury literaturowej sprawia kłopoty. Np. procedura Owena i Robinsa, 1949, (ogrzewanie 1.7g (12mmol) kwasu *p*-hydroksybenzoesowego z 0.83g (15mmol) KOH w 10ml etanolu przez 24h w 150^{o}C zarówno pod chłodnicą zwrotną, jak i po odparowaniu etanolu) dawała inny organiczny produkt reakcji niż fenol. Tym niemniej jednak użycie takiego etapu wydaje się zasadne, gdyż pozwoliło mi ono uniknąć wieloetapowych i czasochłonnych przekształceń.

Ostatnim etapem syntezy było włączenie otrzymanego fenolu do cząsteczki tyrozyny poprzez reakcję z *S*-metylo-L-cysteiną w obecności TPL. Otrzymano [1'-^{14}C]-L-tyrozynę ze zwykłą dla tej reakcji wydajnością 12%. Fenol dodawałem porcjami jako, że jest on stosunkowo silnym inhibitorem TPL. Dzięki temu pierwsze porcje fenolu mogą być bardziej wydajnie przekształcane w L-tyrozynę. Nie udało mi się wykrystalizować otrzymanej

L-tyrozyny z mieszaniny reakcyjnej. Z tego względu procedura oczyszczania zawierała etapy chromatograficzne.

Cała synteza [1'-^{14}C]-L-tyrozyny dała nikłe wydajności: 0.092% chemicznie i 0.050% radiochemicznie. Mimo to otrzymano wystarczające ilości związku do przeprowadzenia pomiarów kinetycznych efektów izotopowych.

[2-^{14}C]-malonian srebra:
5ml wodnego roztworu zawierającego 522mg (5.02mmol) kwasu [2-^{14}C]-malonowego (Moravek Biochemicals, USA) o aktywności całkowitej 4.63MBq i właściwej 922kBq/mmol zobojętniłem stałym NaOH wobec papierka uniwersalnego. Do roztworu dodałem 40ml 5% wodnego roztworu $AgNO_3$ (11.8mmol). Po odsączeniu pod zmniejszonym ciśnieniem szary osad przemywałem zimną wodą i suszyłem nad P_2O_5. Otrzymałem 1.27g (3.99mmol) [2-^{14}C]-malonianu srebra o aktywności całkowitej 2.00MBq i właściwej 501kBq/mmol z wydajnością chemiczną 80% i radiochemiczną 43%.

[2-^{14}C]-malonian dietylu:
1.27g (3.99mmol) [2-^{14}C]-malonianu srebra o aktywności całkowitej 2.00MBq i właściwej 501kBq/mmol, oraz 7.8ml (15.2g, 97.5mmol) jodku etylu mieszałem i ogrzewałem do wrzenia przez 3.5h. Po ochłodzeniu mieszaninę przesączyłem, osad przemyłem 40ml eteru dietylowego. Eter i nadmiar jodku etylu usunąłem przez destylację. Otrzymałem 382mg (2.39mmol) [2-^{14}C]-malonianu dietylu o aktywności całkowitej 1.20MBq i właściwej 501kBq/mmol z 60% wydajności chemicznej i radiochemicznej.

[1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesan etylu:
382mg (2.39mmol) [2-^{14}C]-malonianu dietylu o aktywności całkowitej 1.20MBq i właściwej 501kBq/mmol zmieszałem z 0.66g (6.9mmol) 4*H*-piran-4-onu w 12.4ml *tert*-butanolu i ogrzewałem do wrzenia. Wkraplałem roztwór 0.65g (5.8mmol) *tert*-butanolanu potasu w 15ml *tert*-butanolu do wrzącego i mieszanego roztworu reagentów w ciągu 4h. Następnie dodałem 9ml 1M HCl (9mmol) i mieszałem z ogrzewaniem do wrzenia przez kolejne 50min. Rozpuszczalnik odparowałem, do pozostałości dodałem 30ml wody. Mieszaninę ekstrahowałem 4 x 15ml eteru *tert*-butylowo metylowego. Połączone warstwy eterowe ekstrahowałem 2 x 10ml wody. Z warstwy organicznej odparowałem rozpuszczalnik. Otrzymałem 276 mg (1.66mmol) [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesanu etylu o aktywności całkowitej 832kBq i właściwej 501kBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 70%.

Kwas [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowy:
276 mg (1.66mmol) [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesanu etylu o aktywności całkowitej 832kBq i właściwej 501kBq/mmol rozpuściłem w 10.5ml 2M wodnego roztworu NaOH (21mmol) i mieszałem przez 21h w temperaturze pokojowej. Następnie mieszaninę zakwasiłem 2ml stężonego HCl (24mmol) i ekstrahowałem 5 x 10ml eteru *tert*-butylowo metylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 10ml 1M HCl. Po odparowaniu rozpuszczalnika z warstwy organicznej uzyskałem 219 mg (1.59mmol) kwasu [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowego o aktywności całkowitej 789kBq i właściwej 501kBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 96%.

[4'-^{14}C]-fenol:
219 mg (1.59mmol) kwasu [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowego o aktywności całkowitej 789kBq i właściwej 501kBq/mmol rozpuściłem w 4.0ml chinoliny. Dodałem 150mg of Cu i ogrzewałem mieszaninę w łaźni piaskowej w 255^{o}C przez 80min. Po ochłodzeniu mieszaninę zakwasiłem 15ml 30% kwasu siarkowego i ekstrahowałem 8 x 10ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 6 x 5ml 1M NaOH. Połączone warstwy wodne zakwasiłem stężonym HCl wobec papierka uniwersalnego i ekstrahowałem 5 x 10ml eteru dietylowego. Z połączonych warstw eterowych odparowałem rozpuszczalnik. Fenol oczyściłem przez sublimację. Otrzymałem 3.6mg (38μmol) [4'-^{14}C]-fenolu o aktywności całkowitej 19.3kBq i właściwej 0.50kBq/mmol z 2.4% wydajności chemicznej i radiochemicznej.

[1'-^{14}C]-L-tyrozyna:

3.6mg (38μmol) [4'-^{14}C]-fenolu o aktywności całkowitej 19.3kBq i właściwej 0.50kBq/mmol rozpuściłem w 0.50ml 0.05M buforu fosforanu potasu o pH 8.0. Mieszanina reakcyjna: 16.0mg (0.119mmol) *S*-metylo-L-cysteiny w 1.00 ml 0.05M buforu fosforanu potasu o pH 8.0 zawierającego 1mM merkaptoetanolu, 0.1mM PLP i 4U TPL. Roztwór fenolu dodawałem w 4 równych porcjach w ciągu 41h trwania reakcji. Reakcję przerwałem po 5 dniach dodając 30μl stężonego HCl. Mieszaninę ekstrahowałem 5 x 1ml eteru dietylowego, a następnie naniosłem na kationit Amberlit IR120(H^+) (150 x 15mm). Sole wymywałem wodą, a aminokwasy 0.3M NH_3. Frakcje zawierające radioaktywność połączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Pozostałość naniosłem na preparatywną płytkę celulozową (DC-Cellulose, grubość płytki 0.1mm, Merck) 20 x 20cm, którą rozwijałem w układzie chloroform-metanol-20% wodny roztwór amoniaku 58:32:10 (v/v/v). Płytkę wywoływałem w ciemni fotograficznej za pomocą autoradiografii. Do wysuszonej płytki przykładałem medyczną błonę radiograficzną (18 x 24cm, Foton XS-1N) prowadziłem ekspozycję przez 4 dni. Błonę wywoływałem automatycznie za pomocą wywoływarki Fuji Photo Film FPM-800A. Obszary płytki zawierające L-tyrozynę (R_f od 0.2 do 0.4) wydrapywałem i wymywałem z nich aminokwas wodą, którą następnie odparowywałem. Oczyszczanie na płytce celulozowej powtórzyłem. Otrzymałem 4.7μmol [1'-^{14}C]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 2.37kBq i właściwej 0.50kBq/mmol z 12% wydajnością chemiczną i radiochemiczną.

3.1.4. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru

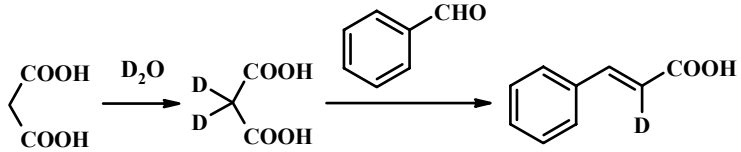
L-tyrozynę można znakować izotopami wodoru w każdej pozycji. W tym podrozdziale przedstawiłem odpowiednie metody syntetyczne. L-tyrozyna znakowana izotopami wodoru w pozycji 3',5' pierścienia aromatycznego została uprzednio otrzymana w naszym zespole (Kozłowska, 2003), dlatego ich synteza nie była wykonana w tej pracy.

3.1.4.1. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 2

3.1.4.1.1. Syntezy [2-^{2}H]-L-tyrozyny

3.1.4.1.1.1. Synteza kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego z kwasu [2-$^2H_2$]-malonowego

Ta synteza została zaplanowana jako próba przed syntezą [2-^{3}H]-L-tyrozyny za pomocą metody użytej do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Z tego względu otrzymałem kwas [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowy jako produkt końcowy, albowiem dalsze etapy: przekształcenie w [2-^{2}H]-L-fenyloalaninę za pomocą PAL, i w [2-^{2}H]-L-tyrozynę za pomocą PMO były już przeze mnie opracowane. Kwas [2-$^2H_2$]-malonowy uzyskałem przez wymianę protonów w pozycji α z rozpuszczalnikiem. W wyniku kondensacji Knoevenagela przekształciłem go w kwas [2-^{2}H]-cynamonowy. Schemat 38 przedstawia drogę syntetyczną prowadzącą do kwasu [2-^{2}H]-cynamonowego.



Schemat 38. Synteza kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego

Kwas [2-$^2H_2$]-malonowy uzyskałem z niską wydajnością (31%) wskutek dekarboksylacji kwasu w warunkach reakcji. Podczas powtarzania tej procedury należy zastosować znacznie krótszy czas wymiany izotopowej celem zmniejszenia stopnia rozkładu związku. Spowoduje to słabsze wzbogacenie związku w izotop. Wzbogacenie wyniosło 91% (określone za pomocą ^{1}H-NMR w obecności wzorca wewnętrznego – kwasu benzoesowego).

Synteza kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego dała wydajność (67%) nieco niższą, niż typowe dla reakcji Knoevenagela stosowanych w tej pracy. Wzbogacenie otrzymanego kwasu w deuter było niższe, niż w wyjściowym kwasie malonowym (78% vs 94%). Wynika to z ułatwionej wymiany protonów z rozpuszczalnikiem w zasadowym środowisku reakcji.

Kwas [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowy został otrzymany z kwasu malonowego z 21% wydajnością.

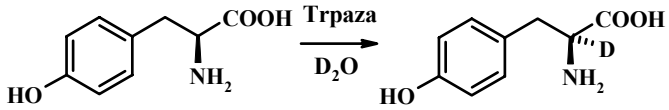
Kwas [2-$^2H_2$]-malonowy:
894mg (8.60mmol) kwasu malonowego rozpuściłem w 5.0ml wody deuterowanej (zawartość deuteru >99.8%; Polatom, Świerk, Polska) i ogrzewałem przez 24h w 80^{o}C. Po odparowaniu wody i wysuszeniu nad P_2O_5 uzyskałem 287mg (2.71mmol) kwasu [2-$^2H_2$]-malonowego o wzbogaceniu w deuter 91%. Wydajność syntezy wyniosła 31%
^{1}H-NMR (200MHz, $(CD_3)_2CO$): δ 3.45 (0.09H, s)

Kwas [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowy:
287mg (2.71mmol) kwasu [2-$^2H_2$]-malonowego o wzbogaceniu w deuter 91%, 1.00ml (1.04g; 9.85mmol) przedestylowanego benzaldehydu, 0.92ml pirydyny, 54µl piperydyny i 0.21g Na_2SO_4 mieszałem i ogrzewałem do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4h. Do ochłodzonej mieszaniny dodałem 17ml wody i 2.0ml stężonego HCl. Roztwór ekstrahowałem 3 x 10ml eteru dietylowego. Połączone warstwy eterowe ekstrahowałem 5 x 20ml 20% K_2CO_3. Połączone warstwy wodne zakwasiłem stężonym HCl, osad odsączyłem pod zmniejszonym ciśnieniem i suszyłem nad P_2O_5. Uzyskałem 267mg (1.80mmol) kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego o wzbogaceniu w deuter 78% z wydajnością 67%.
^{1}H-NMR (200MHz, $CDCl_3$): δ 6.47 (0.22H, *α*-H, d, 15.9Hz), 7.37-7.46 (3H, *m*- i *p*-ArH, m), 7.51-7.60 (2H, *o*-ArH, m), 7.80 (0.78H, *β*-H, s), 7.81 (0.22H, *β*-H, d, 15.9Hz)

3.1.4.1.1.2. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny przy użyciu wymiany protonu katalizowanej przez tryptofanazę

Tryptofanaza w obecności PLP jako kofaktora katalizuje wymianę protonu z rozpuszczalnikiem w pozycji 2 w wielu aminokwasach, także w L-tyrozynie. Dzięki temu można znakować L-tyrozynę w pozycji 2 izotopami wodoru, takiej metody użyto do syntezy 3'-fluoro-[2-^{2}H]-L-tyrozyny (Faleev *et al.*; 1996). Schemat 39 ilustruje syntezę [2-^{2}H]-L-tyrozyny za pomocą tryptofanazy.

Tę metodę syntezy używałem podczas otrzymywania substratu do pomiaru kinetyki TPL dla [2-^{2}H]-L-tyrozyny w wodzie deuterowanej, albowiem w takim wypadku nie było konieczności izolowania otrzymanej znakowanej tyrozyny, a do pomiaru kinetyki używałem roztworu reakcyjnego po uprzedniej inaktywacji tryptofanazy; w tym celu roztwór ogrzewałem do wrzenia. Wymianę protonu kontrolowałem za pomocą ESI MS (3.1.1.1.).

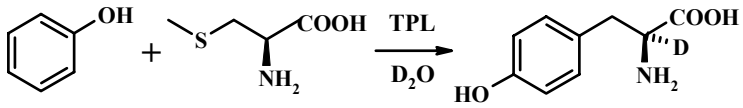


Schemat 39. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny za pomocą tryptofanazy

[2-^{2}H]-L-tyrozyna:
W 42.1ml wody deuterowanej (>99.8% deuteru; Polatom, Świerk, Polska) rozpuściłem 22.8mg (0.126mmol) L-tyrozyny, 371mg (2.13mmol) K_2HPO_4 i 1.1mg (4.5µmol) PLP. Roztwór doprowadziłem do pH 8.3 za pomocą stałego KH_2PO_4. Dodałem 1.02U tryptofanazy. Reakcję prowadziłem przez 7 dni, po czym roztwór ogrzewałem kilka minut we wrzącej wodzie. Po odwirowaniu wytrąconego białka supernatant zebrałem. Otrzymałem roztwór zawierający 0.126mmol [2-^{2}H]-L-tyrozyny o wzbogaceniu w deuter >98% ze 100% wydajnością.
^{1}H NMR (200MHz, D_2O): δ 3.03 (1H, *β*-H, d, 14.4Hz), 3.18 (1H, *β*-H, d, 14.4Hz), 6.89 (2H, ArH, d, 8.7Hz), 7.18 (2H, ArH, d, 8.7Hz)
ESI MS Q-TOF: m/z [M+1] 183.11

3.1.4.1.1.3. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny z fenolu i *S*-metylo-L-cysteiny katalizowana przez fenololiazę tyrozynową

Wygodą metodą syntezy [2-^{2}H]-L-tyrozyny jest reakcja fenolu z *S*-metylo-L-cysteiną w wodzie deuterowanej jako źródłem rozpuszczalnika (Kiick & Phillips, 1988). Znacznik wodorowy w pozycji 2 pochodzi z rozpuszczalnika. Reakcję katalizuje TPL w obecności PLP jako kofaktora (Schemat 40). Metodę tę zastosowałem w swoich badaniach.



Schemat 40. Synteza [2-^{2}H]-L-tyrozyny za pomocą fenololiazy tyrozynowej

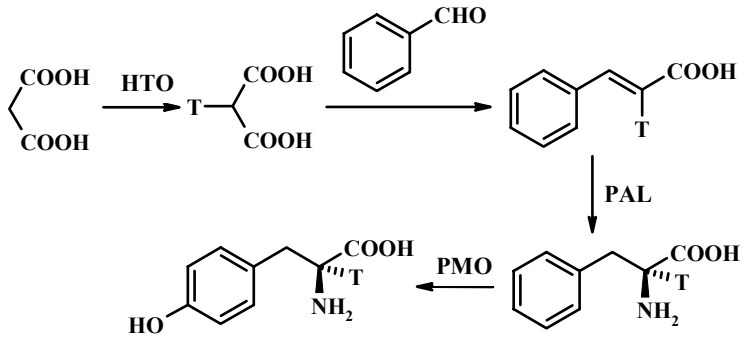
Zaletą tej metody jest przede wszystkim proste oczyszczanie – L-tyrozyna wypada z roztworu w postaci igłowatych kryształków. Izolacja polega na ich odsączeniu i przemyciu. Procedura dała 24% wydajności, mniej niż w literaturze (32%; Kiick & Phillips, 1988). Jest to stosunkowo dobra metoda syntezy L-tyrozyny znakowanej w pozycji 2 ze względu na prostotę oczyszczania produktu.

[2-^{2}H]-L-tyrozyna:
Sporządziłem roztwór 96.5mg (0.715mmol) *S*-metylo-L-cysteiny w 12.1ml 0.05M buforu fosforanu potasu w wodzie deuterowanej (>99.8% deuteru; Polatom, Świerk, Polska) o pH 8.0 zawierający 0.1mM PLP, 1mM merkaptoetanol i 48U TPL. Reakcję prowadziłem przez 5 dni w 32^{o}C. Do roztworu dodałem w czterech porcjach 52.9mg (0.563mmol) fenolu w ciągu 28h. Wytrąconą tyrozynę odsączyłem i przemyłem etanolem oraz eterem dietylowym. Uzyskałem 24.9mg (133µmol) [2-^{2}H]-L-tyrozyny o wzbogaceniu >97% z wydajnością 24%.

3.1.4.1.2. Syntezy [2-^{3}H]-L-tyrozyny

3.1.4.1.2.1. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu [2-$^3H_2$]-malonowego

Syntezę [2-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu [2-^{3}H]-malonowego wykonałem wzorując się na syntezie kwasu [2-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego (3.1.4.1.1.1.) i [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Pierwszym etapem było otrzymanie kwasu [2-$^3H_2$]-malonowego w wyniku wymiany jego protonów *α* z wodą trytową w środowisku zasadowym. Następnie otrzymałem z tego kwasu kwas [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowy w wyniku kondensacji Knoevenagela i przekształciłem go w [2-^{3}H]-L-fenyloalaninę za pomocą liazy fenyloalaninowej. Fenyloalaninę utleniłem do [2-^{3}H]-L-tyrozyny za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975; Augustyniak *et al.*, 2002; Schemat 41).



Schemat 41. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu [2-$^3H_2$] malonowego

Kwas [2-$^3H_2$]-malonowy uzyskałem z niską (uwzględniając fakt, że jest to proces wymiany izotopowej z rozpuszczalnikiem) wydajnością chemiczną (61%) ze względu na dekarboksylację kwasu w warunkach reakcji (80^{o}C). Wydłużenie czasu reakcji nie jest wskazane ze względu na wspomnianą dekarboksylację.

Kwas [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowy otrzymałem z dużą (77%) wydajnością. Wydajność radiochemiczna jest dwukrotnie niższa, gdyż tylko jeden z 2 protonów w kwasie malonowym ulega włączeniu do kwasu cynamonowego podczas kondensacji Knoevenagela.

[2-^{3}H]-L-fenyloalaninę uzyskałem z dobrą dla tego procesu wydajnością 40%.

[2-^{3}H]-L-tyrozynę otrzymano również z satysfakcjonującą wydajnością 82%. Przed rozdziałem na płytce celulozowej dodałem nieco [1-^{14}C]-L-tyrozyny ze względu na to, że sam tryt wytwarza promieniowanie o zbyt niskiej energii do zaczernienia błony fotograficznej stosowanej do detekcji aminokwasów po chromatografii. W badaniach izotopowych w tej pracy stosowano dodatek właśnie takiej tyrozyny jako znacznika pilotowego, stąd też takie „zanieczyszczenie" nie powoduje problemów w wykorzystaniu otrzymanej [2-^{3}H]-L-tyrozyny.

Cała synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny została wykonana z 15% wydajnością chemiczną (licząc z wyjściowego kwasu malonowego) i 12% radiochemiczną (przeliczając na kwas [2-$^3H_2$]-malonowy).

Kwas [2-$^3H_2$]-malonowy:
480mg (4.62mmol) kwasu malonowego rozpuściłem w 1.00ml HTO o aktywności całkowitej 4.68GBq i właściwej 84.2MBq/mmol (Polatom, Świerk, Polska) i ogrzewałem przez 8h w 80^{o}C w zamkniętej ampułce. Po reakcji próbkę liofilizowałem, resztki HTO wymywałem kolejnymi porcjami wody i liofilizowałem aż do zaniku radioaktywności w wodzie. Po suszeniu nad P_2O_5 otrzymałem 292mg (2.80mmol) kwasu [2-$^3H_2$]-malonowego aktywności całkowitej 47.8MBq i właściwej 17.1MBq/mmol z 61% wydajnością chemiczną.

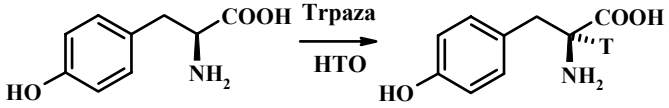
Kwas [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowy:
292mg (2.80mmol) kwasu [2-$^3H_2$]-malonowego aktywności całkowitej 47.8MBq i właściwej 17.1MBq/mmol zmieszałem z 0.500ml (522mg, 4.92mmol) świeżo przedestylowanego benzaldehydu, 0.46ml pirydyny, 27µl piperydyny i 0.12g Na_2SO_4. Mieszaninę mieszałem i ogrzewałem do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 4h. Po oziębieniu dodałem do niej 10ml zimnej wody i 2.0ml stężonego HCl. Mieszaninę ekstrahowałem 4 x 10ml eteru dietylowego. Połączone warstwy eterowe ekstrahowałem 5 x 20ml 10% Na_2CO_3. Połączone warstwy wodne zakwasiłem 30ml stężonego HCl, osad odsączyłem pod zmniejszonym ciśnieniem, przemyłem zimną wodą i suszyłem nad P_2O_5. Otrzymałem 318mg (2.15mmol) kwasu [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 15.2MBq i właściwej 7.08MBq/mmol z 77% wydajności chemicznej i 38% radiochemicznej.

[2-^{3}H]-L-fenyloalanina:
Syntezę przeprowadziłem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 29.9mg (0.202mmol) kwasu [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowego o aktywności całkowitej 1.43MBq i właściwej 7.08MBq/mmol otrzymałem 80.7µmol [2-^{3}H]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 0.572MBq i właściwej 7.08MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 40%.

[2-^{3}H]-L-tyrozyna:
Syntezę przeprowadziłem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Przed rozdziałem na płytce celulozowej dodałem do preparatu 20-krotnie mniejszą radioaktywność [1-^{14}C]-L-tyrozyny. Wychodząc z 6.88µmol [2-^{3}H]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 47.6kBq i właściwej 7.08MBq/mmol otrzymałem 5.61µmol [2-^{3}H]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 38.8kBq i właściwej 7.08MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 82%.

3.1.4.1.2.2. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny z użyciem wymiany protonu katalizowanej przez tryptofanazę

Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny poprzez wymianę protonu α z wodą trytową w obecności tryptofanazy została wykonana podobnie do syntezy [2-^{2}H]-L-tyrozyny opisanej w podrozdziale 3.1.4.1.1.2. (Augustyniak *et al.*, 2004; Schemat 42).



Schemat 42. Synteza [2-^{3}H]-L-tyrozyny za pomocą tryptofanazy

Otrzymałem [2-^{3}H]-L-tyrozynę z bardzo dobrą wydajnością (98%).

[2-^{3}H]-L-tyrozyna:

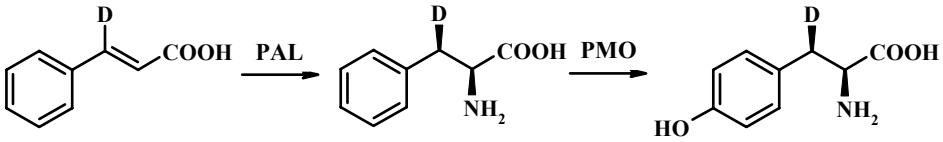
Przygotowałem 1.50ml roztworu zawierającego 2.71μmol L-tyrozyny, 0.1mM PLP, 20mg tryptofanazy w 0.05M buforze fosforanu potasu o pH 8.3 zawierającym wodę trytową o aktywności całkowitej 27.8GBq i właściwej 334MBq/mmol (Polatom, Świerk, Polska). Mieszaninę inkubowałem w 30°C przez 5 dni. Mieszaninę zakwasiłem dodając 20μl stężonego HCl i naniosłem na kationit Amberlit IR 120(H^+) (150 x 15mm). Nadmiar wody trytowej i sole z buforu wymyłem wodą. Aminokwas wymyłem 0.3M NH_3. Frakcje zawierające L-tyrozynę połączyłem i odparowałem rozpuszczalnik. Uzyskałem 2.66μmol [2-^{3}H]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 0.952 MBq i właściwej 358MBq/mmol z wydajnością chemiczną 98%.

3.1.4.2. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3*R*

3.1.4.2.1. Synteza [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny

Do syntezy [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny wykorzystałem metodę zastosowaną w syntezie [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Wykorzystując otrzymany wcześniej w naszym zespole kwas [3-^{2}H]-(*E*)-cynamonowy (Jemielity, 2001) przekształciłem go w [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaninę poprzez addycję amoniaku katalizowaną przez liazę fenyloalaninową. W wyniku jej działania atom wodoru w pozycji 3 kwasu cynamonowego znajduje się w pozycji 3*R* powstałej L-fenyloalaniny. Otrzymaną [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaninę utleniłem do [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny za pomocą 4'-monooksygenzy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975; Schemat 43).

Synteza [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny z kwasu [3-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego poprzez [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaninę zaszła z niewielką wydajnością 1.9%. Niska wydajność może być spowodowana małą aktywnością preparatów enzymów użytych w syntezie. Utratę aktywności biokatalizatorów powoduje np. częste rozmrażanie enzymu, czy też niewielka nawet zawartość inhibitorów.



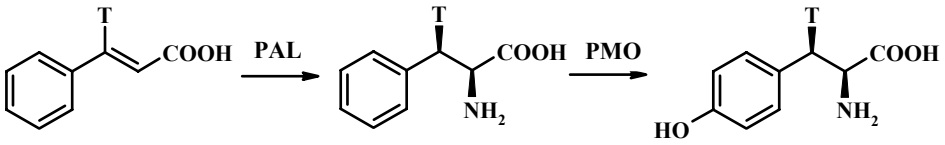
Schemat 43. Synteza [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny

[3*R*-^{2}H]-L-fenyloalanina:
Syntezę [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaniny wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 45.6mg (0.306mmol) kwasu [3-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego o wzbogaceniu w deuter >94% uzyskałem surową [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaninę.

[3*R*-^{2}H]-L-tyrozyna:
Syntezę [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Płytki celulozowej nie wywoływałem przez autoradiografię, lecz za pomocą ninhydryny używając naniesionego obok próbki wzorca. Wychodząc z otrzymanej surowej [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaniny uzyskałem 5.83μmol [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny o wzbogaceniu w deuter >94% z wydajnością 1.9%.
^{1}H NMR (200MHz, D_2O): δ 3.02 (1H, 3*S*-H, d, 7.0Hz), 3.92 (1H, *α*-H, d, 7.0Hz), 6.88 (2H, ArH, d, 8.7Hz), 7.18 (2H, ArH, d, 8.7Hz)
ESI MS Q-TOF: m/z [M+1] 183.13

3.1.4.2.2. Synteza [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny

W syntezie [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny, analogicznie do syntezy [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny (3.1.4.2.1.), wykorzystałem metodę zastosowaną w syntezie [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Wykorzystując otrzymany wcześniej w naszym zespole kwas [3-^{3}H]-(*E*)-cynamonowy (Jemielity, 2001) przekształciłem go w [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaninę poprzez addycję amoniaku katalizowaną przez liazę fenyloalaninową. Otrzymaną [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaninę utleniłem do [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny za pomocą 4'-monooksygenzy fenyloalaninowej (Milstien & Kaufman, 1975; Augustyniak *et al.*, 2002; Schemat 44).



Schemat 44. Synteza [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny

Synteza [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaniny dała niższą niż zwykle wydajność 20%. Wychodząc z tego związku otrzymałem [3*R*-^{2}H]-L-tyrozynę z bardzo dobrą wydajnością 95%.

[3*R*-^{3}H]-L-fenyloalanina:
Syntezę [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaniny wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-fenyloalaniny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 25.5mg (0.172mmol) kwasu [3-^{3}H]-(E)-cynamonowego o aktywności całkowitej 767kBq i właściwej 4.46MBq/mmol otrzymałem 33.7µmol [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 150kBq i właściwej 4.46MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 20%.

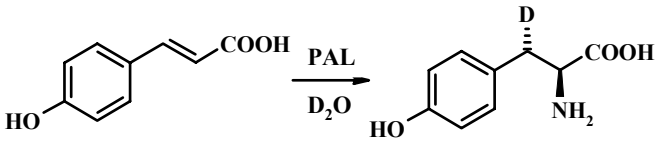
[3*R*-^{3}H]-L-tyrozyna:
Syntezę [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny wykonałem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Podobnie do syntezy [2-^{3}H]-L-tyrozyny dodano [1-^{14}C]-L-tyrozyny celem wykonania autoradiografii (3.1.4.1.2.1.). Wychodząc z 33.7µmol [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 150kBq i właściwej 4.46MBq/mmol otrzymałem 31.9µmol [3*R*-^{3}H]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 142kBq i właściwej 4.46MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 95%.

3.1.4.3. Syntezy L-tyrozyny znakowanej izotopami wodoru w pozycji 3*S*

3.1.4.3.1. Synteza [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny

W syntezie wykorzystałem fakt, że liaza fenyloalaninowa katalizuje reakcję addycji amoniaku do kwasu (*E*)-*p*-kumarowego, dając jako produkt L-tyrozynę. Atom wodoru w pozycji 3*S* jest pobierany z rozpuszczalnika. Reakcja prowadzona w wodzie deuterowanej daje [3*S*-^{2}H]-L-tyrozynę (Schemat 45) analogicznie do syntezy [3*S*-^{2}H]-L-fenyloalaniny (Jemielity, 2001).

Synteza [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny dała bardzo małą wydajność (0.46%). Należy jednak pamiętać, że kwas (*E*)-*p*-kumarowy jest znacznie gorszym substratem w reakcji addycji katalizowanej przez PAL niż kwas (*E*)-cynamonowy. Poza tym reakcja biegnie w wodzie deuterowanej, co także utrudnia zajście reakcji i wpływa na strukturę biokatalizatora.



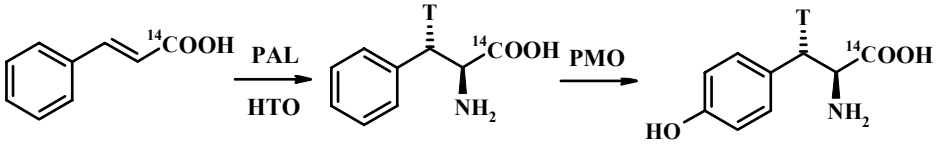
Schemat 45. Synteza [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny

[3*S*-^{2}H]-L-tyrozyna:
W 60ml 2.08M buforu ND_4Cl (o zawartości deuteru >98%; Aldrich) doprowadzonym do pH 9.7 za pomocą 10% roztworu NaOD w wodzie deuterowanej (>99% deuteru; Polatom, Świerk, Polska) rozpuściłem 1.36g (8.29mmol) kwasu (*E*)-*p*-kumarowego, do mieszaniny dodałem 4.17U PAL. Mieszaninę ogrzewałem w 30^{o}C przez 8 dni. Reakcję przerwałem zakwaszając roztwór 2.0ml stężonego HCl. Mieszaninę ekstrahowałem 5 x 20ml eteru dietylowego. Warstwę wodą naniosłem na żywicę kationowymienną Amberlit IR 120HP(H^+) (300 x 30mm). Sole buforu wymyłem wodą, a aminokwas za pomocą 0.3M NH_3. Frakcje zawierające aminokwas połączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Otrzymałem 38.4µmol [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny o wzbogaceniu w deuter >97% z wydajnością 0.46%.
^{1}H NMR (200MHz, D_2O): δ 3.04 (3R-H, *β*-H, d, 7.7Hz), 3.94 (1H, *α*-H, d, 7.7Hz), 6.90 (2H, ArH, d, 8.6Hz), 7.20 (2H, ArH, d, 8.6Hz)
ESI MS Q-TOF: m/z [M+1] 183.13

3.1.4.3.2. Syntezy [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny

3.1.4.3.2.1. Synteza [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny z kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego

W syntezie [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny z kwasu [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowego wykorzystałem metodę podobną do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.). Jako substrat zastosowałem kwas [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy otrzymany podczas wspomnianej syntezy kwasu [1-^{14}C]-L-tyrozyny. W wyniku addycji amoniaku katalizowanej przez liazę fenyloalaninową w buforze zawierającym wodę trytową znacznik izotopowy wchodzi w pozycję 3*S* powstałej L-fenyloalaniny. Przez jej utlenianie za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej uzyskałem [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozynę (Schemat 46).



Schemat 46. Synteza [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny

Do syntezy [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny wykorzystałem kwas [1-^{14}C]-cynamonowy. Dodatek ten jest korzystny ze względu na możliwość przeprowadzenia autoradiografii podczas oczyszczania tyrozyny, podobnie do syntezy [2-^{3}H]-L-tyrozyny (3.1.4.1.2.1.).

Synteza [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-fenyloalaniny przebiegła z niezbyt wysoką dla tej reakcji wydajnością 10%. Przekształcenie w [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozynę dało dobrą (82%) wydajność chemiczną i radiochemiczną ^{14}C i ^{3}H.

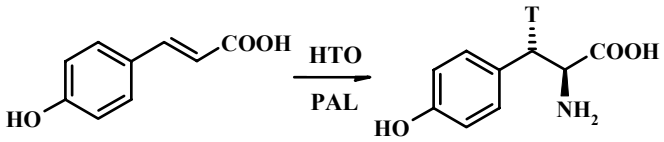
Cała synteza dała 8.4% wydajności chemicznej i radiochemicznej ^{14}C (licząc z wyjściowego kwasu [1-^{14}C]-cynamonowego), oraz 82% wydajności radiochemicznej ^{3}H (wychodząc z [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-fenyloalaniny).

[3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-fenyloalanina:
Mieszanina reakcyjna składała się z 14.5mg (97.8µmol) kwasu [1-^{14}C]-cynamonowego o aktywności całkowitej 674kBq i właściwej 6.88MBq/mmol, 1.8ml 1.64M buforu chlorku amonu zawierającego wodę trytową o aktywności całkowitej 5.00GBq i właściwej 50.0MBq/mmol (Polatom, Świerk, Polska), oraz 1U PAL. Reakcję i izolację produktu prowadziłem w analogiczny sposób do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Otrzymałem 10.1µmol [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 69.2kBq ^{14}C, 147kBq ^{3}H, i właściwej 6.88MBq ^{14}C/mmol, 14.6MBq ^{3}H/mmol z wydajnością chemiczną 10% i taką samą wydajnością radiochemiczną ^{14}C.

[3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyna:
Syntezę przeprowadziłem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Wychodząc z 3.32µmol [3S-^{3}H,1-^{14}C]-L-fenyloalaniny o aktywności całkowitej 22.8kBq ^{14}C, 48.8kBq ^{3}H, i właściwej 6.88MBq ^{14}C/mmol, 14.6MBq ^{3}H/mmol otrzymałem 2.72µmol [3*S*-^{3}H,1-^{14}C]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 18.8kBq ^{14}C, 40.0kBq ^{3}H, i właściwej 6.88MBq ^{14}C/mmol, 14.6MBq ^{3}H/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną ^{14}C i ^{3}H 82%.

3.1.4.3.2.2. Synteza [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny z kwasu (*E*)-*p*-kumarowego

[3*S*-^{3}H]-L-tyrozynę otrzymałem z kwasu (*E*)-*p*-kumarowego w reakcji katalizowanej przez liazę fenyloalaninową w sposób analogiczny do syntezy [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny (3.1.4.3.1.). Znacznik trytowy pochodził z wody trytowej (Augustyniak *et al.*, 2004; Schemat 47).



Schemat 47. Synteza [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny

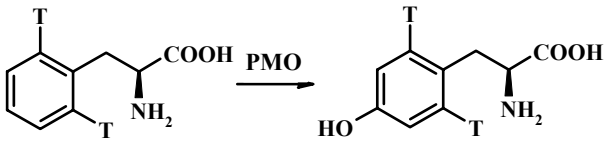
Synteza [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny przebiegła z niską (5.8%) wydajnością chemiczną. Zaletą tej syntezy (w porównaniu do syntezy z kwasu (*E*)-cynamonowego; 3.1.4.3.2.1.) jest jej jednoetapowość i prostsze oczyszczanie (bez konieczności wykonywania pracochłonnej chromatografii podziałowej na celulozie), a wadą – niższa wydajność.

[3*S*-^{3}H]-L-tyrozyna:
16.2 mg (98.8µmol) kwasu (*E*)-*p*-kumarowego rozpuściłem w 1.5ml 1.8M buforu amonowego o pH 9.7 zawierającego wodę trytową o aktywności całkowitej 27.8GBq i właściwej 334MBq/mmol (Polatom, Świerk, Polska) i 0.834U PAL. Mieszaninę inkubowałem przez 14 dni w 30^{o}C. Roztwór zakwasiłem dodając 20µl stężonego HCl, mieszaninę ekstrahowałem 4 x 2.5ml eteru dietylowego. Warstwę wodną naniosłem na kationit Amberlit IR 120(H^{+}) (150 x 15mm). Jonit przemywałem wodą celem usunięcia nadmiaru wody trytowej, a następnie aminokwas wymywałem 0.3M NH_3. Frakcje zawierające produkt połączyłem, rozpuszczalnik odparowałem. Otrzymałem 5.73µmol [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 0.719MBq i właściwej 126MBq/mmol z wydajnością 5.8%.

3.1.4.4. Syntezy [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny

3.1.4.4.1. Synteza [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny

Syntezę [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny wykonałem poprzez utlenianie handlowo dostępnej [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny za pomocą 4'-monooksygenazy fenyloalaninowej analogicznie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (Augustyniak *et al.*, 2001b; 4.3.1.1.). Syntezę ilustruje Schemat 48. Syntezę [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny wykonałem z dobrą, 58% wydajnością.



Schemat 48. Synteza [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny

[2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyna:
Syntezę przeprowadziłem podobnie do syntezy [1-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.1.2.). Przed oczyszczaniem na płytce celulozowej dodałem [1-^{14}C]-L-tyrozyny, jak to miało miejsce w syntezie [2-^{3}H]-L-tyrozyny (3.1.4.1.2.1.). Wychodząc z 3.1μmol [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny (Sigma) o aktywności całkowitej 131kBq i właściwej 42MBq/mmol uzyskałem 1.8μmol [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 76kBq i właściwej 42MBq/mmol z wydajnością chemiczną i radiochemiczną 58%.

3.1.4.4.2. Syntezy [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z fenolu

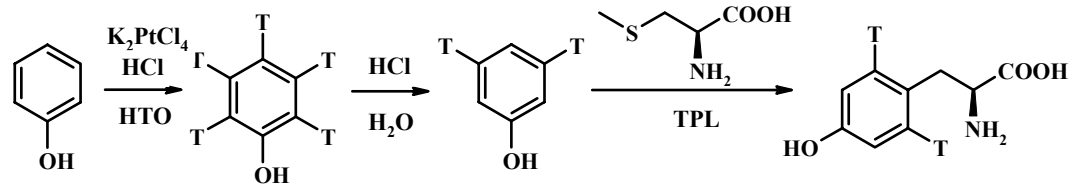
Syntezę [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z fenolu wykonałem w kilku etapach [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny. Pierwszym była katalityczna (w obecności K_2PtCl_4) wymiana wszystkich atomów wodoru fenolu z wodą trytową w środowisku kwaśnym prowadząca do [$^3H_5$]-fenolu. Kolejnym etapem była wymiana atomów wodoru w pozycjach *orto* i *para* fenolu z wodą w środowisku kwaśnym dająca [3,5-$^3H_2$]-fenol (Werstiuk, 1987), który następnie wprowadzałem do cząsteczki L-tyrozyny poprzez reakcję z *S*-metylo-L-cysteiną katalizowaną przez fenololiazę tyrozynową analogicznie do reakcji wykonanej w syntezie [1'-^{14}C]-L-tyrozyny (3.1.3.4.). Szlak syntetyczny został przedstawiony na Schemacie 49.

Syntezę [$^3H_5$]-fenolu przeprowadziłem z 85% wydajnością chemiczną. Zdecydowana większość znacznika znalazła się w pozycjach *orto* i *para*, gdyż reakcję przeprowadzałem w środowisku kwaśnym.

Bez udziału katalizatora przeprowadziłem usunięcie znacznika z pozycji *orto* i *para*, stąd też [3,5-$^3H_2$]-fenol uzyskałem z niską wydajnością radiochemiczną (12%), przy dobrej chemicznej (79%).

Ostatnim etapem syntezy była konwersja [3,5-$^3H_2$]-fenolu do [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny, która zaszła z 10% wydajnością. Izolacja produktu polegała na odsączeniu wytrąconej L-tyrozyny.

Cała synteza [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z fenolu dała 6.7% wydajności chemicznej (licząc z wyjściowego fenolu) i 1.2% radiochemicznej (licząc z [$^3H_5$]-fenolu). Ta synteza daje wprawdzie niższe wydajności niż synteza z [2',6'-$^3H_2$]-L-fenyloalaniny (3.1.4.4.1.), ale jej zaletą jest mniejsza kosztochłonność (znakowana L-fenyloalanina jest znacznie droższa od wody trytowej) i możliwość wytworzenia znacznie większej ilości produktu (stosowane w syntezie z fenyloalaniny stężenia są dużo niższe).



Schemat 49. Synteza [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny z fenolu

[$^3H_5$]-fenol:
999mg (10.6mmol) fenolu, 215mg (0.518mmol) K_2PtCl_4, 0.20ml stężonego HCl i 0.500ml wody trytowej o aktywności całkowitej 200MBq i właściwej 7.20MBq/mmol (Polatom, Świerk, Polska) ogrzewałem w zamkniętej ampułce w 100°C przez 21h. Po ochłodzeniu dodałem 5ml wody i ekstrahowałem mieszaninę 5 x 5ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 5 x 10ml wody. Po odparowaniu rozpuszczalnika z warstwy wodnej uzyskałem 849mg (9.03mmol) [$^3H_5$]-fenolu o aktywności całkowitej 36.8MBq i właściwej 4.08MBq/mmol z 85% wydajnością chemiczną.

[3,5-$^3H_2$]-fenol:
425mg (4.52mmol) [$^3H_5$]-fenolu o aktywności całkowitej 18.3MBq i właściwej 4.08MBq/mmol, oraz 6.0ml 2M HCl ogrzewałem w zamkniętej ampułce w 100°C przez 48h. Po ochłodzeniu mieszaninę ekstrahowałem 5 x 5ml eteru dietylowego. Połączone warstwy organiczne ekstrahowałem 2 x 5ml wody. Odparowano eter z warstwy organicznej, fenol oczyszczano przez sublimację. Otrzymałem 337mg (3.59mmol) [3,5-$^3H_2$]-fenolu o aktywności całkowitej 2.25MBq i właściwej 627kBq/mmol z 79% wydajnością chemiczną i 12% radiochemiczną.

[2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyna:
29.8mg (221µmol) *S*-metylo-L-cysteiny rozpuściłem w 4.0ml 0.1M buforu fosforanu potasu o pH 8.0 zawierającego 0.1mM PLP, 1mM merkaptoetanolu i 16U TPL. Dodawałem roztwór 15.3mg (163µmol) [3,5-$^3H_2$]-fenolu o aktywności całkowitej 102kBq i właściwej 627kBq/mmol w 0.50ml 0.1M buforu fosforanu potasu o pH 8.0 w pięciu równych porcjach w ciągu początkowych 49h trwania reakcji. Syntezę prowadziłem w 30°C przez 5 dni. Wytrącone kryształy tyrozyny odsączyłem oraz przemyłem etanolem i eterem dietylowym. Otrzymałem 16.3µmol [2',6'-$^3H_2$]-L-tyrozyny o aktywności całkowitej 9.37kBq i właściwej 575kBq/mmol z wydajnością chemiczną 10% i radiochemiczną 9.2%.

3.2. Badanie mechanizmu działania fenololiazy tyrozynowej za pomocą kinetycznych efektów izotopowych węgla i wodoru

W tej części rozdziału opiszę wyniki moich badań nad mechanizmem działania fenololiazy tyrozynowej za pomocą kinetycznych efektów izotopowych.

Do określenia kinetycznych efektów izotopowych węgla i wodoru w reakcji hydrolitycznego rozkładu L-tyrozyny katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową zdecydowałem się użyć dwóch technik dostępnych w naszym laboratorium: radiometrii i pomiarów kinetyki reakcji. Radiometria pozwala na określenie KIE izotopów radioaktywnych metodą konkurencyjną, jest to bardzo dobra metoda wyznaczanie efektów $^{12}C/^{14}C$ i $^{1}H/^{3}H$ na k_{cat}/K_m. Z kolei pomiary kinetyki umożliwiają wyznaczenie KIE metodą niekonkurencyjną, w ten sposób wyznaczałem KIE $^{1}H/^{2}H$ na k_{cat} i na k_{cat}/K_m. Założenia obydwu metod przedstawiłem w podrozdziale 2.3.1.

3.2.1. Wyznaczanie kinetycznych efektów izotopowych za pomocą radiometrii

Do radiometrycznego wyznaczania KIE używałem otrzymanych uprzednio (3.1.3.) L-tyrozyn znakowanych izotopami promieniotwórczymi. Ich czystość i miejsce podstawienia izotopowego były sprawdzane metodami opisanymi w podrozdziale 3.1.1.

Podczas wykonywania eksperymentów uwzględniałem metodologię stosowaną w tego typu pomiarach (2.3.1.). Do wyznaczenia KIE niezbędne było wyznaczenie aktywności właściwych wyjściowego substratu i produktu, oraz stopnia przereagowania. W swoich badaniach używałem metody podwójnego znakowania.

Jako znacznik pilotowy w badaniu KIE trytu używałem ^{14}C umieszczonego w grupie karboksylowej. To ugrupowanie nie jest bezpośrednio zaangażowane podczas reakcji, poza tym efekty węgla są zawsze dużo niższe od efektów wodoru; dzięki temu można na karboksylowej grupie L-tyrozyny założyć brak znaczącego KIE węgla. Takie założenie umożliwia użycie aktywności pilotowego znacznika ^{14}C jako miary ilości substratu.

W badaniach KIE $^{12}C/^{14}C$ użyłem ^{3}H w pozycji 3',5', gdzie zmierzony KIE wynosił 1.003, jako znacznika pilotowego. Niska wartość efektu, bliska wartościom efektów węgla, umożliwia takie zastosowanie znacznika trytowego w pozycji *orto* względem grupy hydroksylowej L-tyrozyny do wyznaczenia KIE $^{12}C/^{14}C$.

W eksperymentach stosowałem od 3 do 50 razy wyższe radioaktywności ^{3}H od ^{14}C ze względu na charakterystykę promieniowania obydwu tych izotopów.

Do układu reakcyjnego zawierającego L-tyrozynę, PLP (kofaktor) i enzym dodawałem dehydrogenazy L-mleczanowej (LDH) i NADH w dużym nadmiarze. Takie podejście pozwala na bardzo szybkie (ze względu na duży nadmiar pozostałych reagentów)

przekształcenie powstającego niezbyt stabilnego pirogronianu w L-mleczan. Stabilność uzyskanego produktu pozwala na bezpieczną i kontrolowaną procedurę przygotowania próbek do pomiarów radiometrycznych.

Duży nadmiar układu LDH/NADH uniemożliwia objawienie się kinetycznego efektu izotopowego na reakcji redukcji pirogronianu, albowiem w warunkach szybkiej i ilościowej konwersji efekt izotopowy wynosi 1, ponieważ obydwa izotopologi ulegną całkowitemu przekształceniu.

Reakcję przerywałem zakwaszając mieszaninę stężonym HCl.

Metoda konkurencyjna radiometryczna wymaga oddzielenia produktu reakcji od substratu w celu określenia ich aktywności właściwej. Wybrałem chromatografię jonowymienną jako metodę rozdziału. Analiza własności substratów i produktów pozwala zauważyć, że substrat (L-tyrozyna) posiada grupę aminową, która umożliwia związanie na kationicie. Radioaktywne produkty powstałe w trakcie reakcji (fenol, L-mleczan, woda) nie będą wiązane przez żywicę, dzięki czemu można je ilościowo wymyć wodą z kolumny. L-tyrozynę zaadsorbowaną na jonicie po naniesieniu z kwaśnego roztworu wywoływałem za pomocą 0.3M roztworu amoniaku, który deprotonował grupy aminowe L-tyrozyny i umożliwiał jej wymycie z kolumny. Fakt, że pierwsze wymywane są produkty reakcji jest bardziej korzystny od sytuacji, gdy najpierw wymywa się substrat.

Do wyizolowanych produktów, jak i do próbki wyjściowego roztworu substratu, dodawałem nieco większą objętość (aby uzyskać homogenną mieszaninę) koktajlu scyntylacyjnego do próbek wodnych. Następnie mierzyłem radioaktywność ^{14}C i ^{3}H próbek za pomocą uprzednio wykalibrowanego licznika scyntylacyjnego tak, aby uzyskać 350 tysięcy zliczeń podczas kilku pomiarów. Błędy eksperymentalne wyznaczonych radioaktywności danych próbek nie przekraczały 0.5%.

Aktywność właściwą wyjściowego substratu i produktu w badaniu efektów trytu podawałem jako proporcję aktywności $^{3}H/^{14}C$. Stopień przereagowania wyznaczałem z aktywności ^{14}C w tych związkach. W badaniach KIE $^{12}C/^{14}C$ miarą aktywności właściwej była proporcja aktywności $^{14}C/^{3}H$, a stopień przereagowania wyznaczałem z aktywności ^{3}H.

Stosowałem uproszczone równanie Yankwicha-Tonga (3) w celu wyznaczenia KIE z aktywności właściwych wyjściowego substratu, produktu i stopnia przereagowania.

Eksperymenty kontrolne polegały na wykonaniu procedury dla mieszaniny reakcyjnej nie zawierającej enzymu. Nie stwierdziłem istotnego wymycia używanych radioaktywnych substratów z kolumny, jak i zmiany ich aktywności właściwych podczas procedury. Oznacza to, że procedura oczyszczania nie wprowadza dodatkowego efektu izotopowego.

Reakcja katalizowana przez TPL nie zachodzi ilościowo (maksymalne stopnie przereagowania okazały się być rzędu 50%), dlatego niemożliwe okazało się wykonanie kontroli dla 100% przereagowania. W zamian do roztworu uzyskanego po przemyciu jonitu wodą (czyli frakcji zawierającej produkty podczas doświadczenia z nieznakowaną L-tyrozyną) dodawałem nieco substratu o dokładnie znanej aktywności właściwej. Stwierdziłem, że roztwór produktów nie powoduje zmiany w pomiarach aktywności właściwej znajdujących się tam związków.

Błędy pomiarów wyznaczałem z równania Studenta dla 95% stopnia ufności.

Celem określenia zawartości izotopów w określonym produkcie rozdzielałem część roztworu produktów z wybranych eksperymentów. Fenol ekstrahowałem eterem dietylowym, a L-mleczan izolowałem na żywicy anionowymiennej, a następnie mierzyłem radioaktywność uzyskanych roztworów.

Procedura:
Sporządziłem mieszaninę zawierającą odpowiednio znakowaną L-tyrozynę o stosunku radioaktywności $^{3}H/^{14}C$ od 3 do 50, PLP, TPL, 20U/ml LDH (charakterystykę enzymów zamieściłem w podrozdziale 3.1.) i 2-krotny nadmiar molowy NADH. Reakcję prowadziłem w buforze zawierającym 0.1M fosforan potasu, 0.2M chlorek sodu i 1mM D,L-ditiotreitol (DTT) o pH 8.3. Reakcję prowadziłem w temperaturze pokojowej, co pewien czas pobierałem pewną porcję roztworu i zakwaszałem go 1/50 objętości stężonego HCl, oraz nanosiłem na kationit Amberlit IR 120(H^+) (60mm x 5mm). Żywicę przemywałem 5ml wody celem wymycia produktów reakcji. Substrat odzyskiwałem wymywając go 0.3M roztworem amoniaku. Radioaktywność mierzyłem stosując koktajl scyntylacyjny do próbek wodnych Rotiszint. Pomiary wykonywałem na liczniku scyntylacyjnym Wallac 1409, Raytest, powtarzając je kilkakrotnie do momentu uzyskania 350 tysięcy zliczeń. Wartość efektu izotopowego wyznaczałem z aktywności właściwych produktu, wyjściowego substratu i stopnia konwersji stosując równanie (3).

Rozdział produktów reakcji:
Z roztworu produktów wybranego do analizy pobierałem 2ml mieszaniny, którą ekstrahowałem 3 x 1ml eteru dietylowego. Połączone warstwy eterowe przemyłem wodą. Warstwę wodną uzyskaną po ekstrakcji alkalizowałem za pomocą NaOH i nanosiłem na anionit Dowex 1x8 (OH^-). Złoże pozostawiałem na kilka godzin celem dobrego związania anionów z żywicą, którą następnie przemywałem wodą. Mleczan wymywałem 1M roztworem cytrynianu sodu.

3.2.2. Wyznaczanie kinetycznych efektów izotopowych za pomocą pomiarów kinetyki

Do wyznaczania KIE metodą niekonkurencyjną używałem otrzymanych poprzednio izotopomerów L-tyrozyny znakowanych deuterem w różnych pozycjach (3.1.4.). Wzbogacenie w izotop, oraz potwierdzenie znakowania w danej pozycji wykonano za pomocą ^{1}H-NMR i ESI MS (3.1.1.1.).

Eksperymenty wykonywałem stosując się do ogólnych zasad wykonywania tego typu pomiarów opisanych w podrozdziale 2.3.1. W procedurze wzorowałem się na pracy Kiicka i Phillipsa, 1988.

Do mieszaniny reakcyjnej dodawałem duży nadmiar układu LDH/NADH. W pomiarach kinetyki reakcji katalizowanej przez TPL umożliwia to detekcję powstającego pirogronianu, albowiem w wyniku jego szybkiej, następczej redukcji do L-mleczanu NADH ulega utlenianiu do NAD^+. Obydwie formy nukleotydu różnią się znacznie absorpcją przy długości fali 340nm, gdzie NAD^+ ma absorpcję zaniedbywalnie małą, a NADH silnie absorbuje światło (milimolowy współczynnik ekstynkcji wynosi 6.22).

Ponieważ stosowałem duży nadmiar LDH, o szybkości pojawiania się NAD^+ (i wynikającego z tego spadku absorpcji) decydowała tylko i wyłącznie szybkość pojawiania się pirogronianu – produktu reakcji rozkładu L-tyrozyny.

W celu wykonania pomiarów najpierw przygotowywałem mieszaninę zawierającą wszystkie reagenty bez substratu (tzn. enzym, kofaktor, LDH, NADH), oraz oddzielnie roztwór substratu o stężeniu 3mM (trudno jest sporządzić roztwory tyrozyny o dobrze określonym wyższym stężeniu ze względu na niską rozpuszczalność tego aminokwasu w wodzie). Z przygotowanej mieszaniny bez substratu pobierałem równe objętości do 6 kwarcowych kuwet, dodawałem odpowiednią ilość buforu, a potem substratu tak, aby objętość roztworu w każdej kuwecie była równa 1.5ml.

Podana strategia umożliwia ograniczenie błędów spowodowanych pipetowaniem roztworów. Równoległe przeprowadzenie pomiarów dla różnych stężeń wychodząc ze wspólnej mieszaniny enzymu i kofaktora także pozwala uniknąć błędów spowodowanych różnymi warunkami reakcji podczas eksperymentów nierównoległych.

Do pomiarów używałem zakresu stężeń substratu od 0.4mM do 2.5mM. Każda z sześciu kuwet zawierała inne stężenie substratu. Mierzyłem początkową szybkość reakcji (przeliczoną ze spadku absorpcji w czasie). Ponieważ NADH ulega w warunkach reakcji powolnemu rozkładowi (30.4nM/min) uwzględniałem poprawkę na tę reakcję uboczną.

Uzyskane dane (zależność szybkości reakcji od stężenia substratu) z każdego równoległego pomiaru (dla sześciu stężeń substratu) wykorzystałem do optymalizacji parametrów kinetycznych (k_{cat} i k_{cat}/K_m) reakcji do równania Michaelisa-Menten (7). Optymalizację wykonywałem za pomocą programu Enzfitter 1.05. Następnie uśredniałem parametry otrzymane z wszystkich pomiarów dla danego substratu.

Stosowane przez mnie stężenia substratu były ograniczone rozpuszczalnością tyrozyny, stąd też wyznaczyłem wartości k_{cat} z większymi błędami, niż typowe w pomiarach kinetyki. Parametr k_{cat}/K_m zwykle jest wyznaczany z większymi błędami eksperymentalnymi niż stała katalityczna. Jego wartość jest zależna od stosowanych stężeń substratów, dlatego też k_{cat}/K_m wyznaczałem dla podobnych stężeń substratów we wszystkich pomiarach. Stałej Michaelisa nie wyznacza się w tego typu eksperymentach.

KIE obliczałem dzieląc parametry uzyskane dla reakcji z L-tyrozyną nieznakowaną przez parametry reakcji z deuterowaną pochodną tego aminokwasu. Błędy pomiaru wyliczyłem z równania Studenta dla 95% poziomu ufności.

Procedura:
Przygotowałem mieszaninę zawierającą 0.326mM PLP, 0.652mM NADH, 88.4U/ml LDH, i 14.3nM (4.35U/ml) TPL (charakterystykę enzymów podałem w podrozdziale 3.1.). Do sześciu kuwet kwarcowych o grubości 1.00cm dodawałem po 0.230ml roztworu, a następnie różne objętości buforu i 3mM roztworu L-tyrozyny tak, aby objętość roztworu wynosiła 1.5ml. Stężenie substratu w tak przygotowanych roztworach wynosiło od 0.5 do 2.5mM. Mierzyłem równolegle spadek absorpcji we wszystkich 6 kuwetach przy 340nm za pomocą spektrofotometru UV-VIS 1202 Shimadzu. Uwzględniając milimolowy współczynnik NADH (6.22) wyznaczyłem szybkości reakcji dla różnych stężeń substratu, a następnie fitowałem do nich k_{cat} i k_{cat}/K_m używając równania (7) za pomocą programu Enzfitter 1.05 (Elsevier).

3.2.3. Wyniki i wnioski z wielkości zmierzonych kinetycznych efektów izotopowych w reakcji rozkładu L-tyrozyny katalizowanej przez TPL

3.2.3.1. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru

3.2.3.1.1. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 2

Tabele 1-3 przedstawiają wyniki pomiarów aktywności właściwych ^3H produktu (R_p) i wyjściowego substratu (R_0; ich stosunek to tzw. KIE obserwowany) deuteru i trytu w wodzie i w wodzie deuterowanej uzyskane dla L-tyrozyny znakowanej w pozycji 2. Tabele 1 i 2 przedstawiają efekty obserwowane trytu odpowiednio w wodzie i w wodzie deuterowanej w zależności od stopnia przereagowania f, stężeń enzymu ([TPL]), L-tyrozyny ([S]), fosforanu 5'-pirydoksalu ([PLP]), oraz czasu reakcji t.

Tabela 3 przedstawia KIE deuteru. Podałem w niej uzyskane wartości stałej katalitycznej (k_{cat}) oraz stosunków stałej katalitycznej do stałej Michaelisa (k_{cat}/K_m) w wodzie i w wodzie deuterowanej. Poniżej przedstawiłem wartości KIE $^1H/^2H$ (α) w pozycji 2 na te parametry. Wyznaczyłem także rozpuszczalnikowe efekty izotopowe (α_{rozp}) na k_{cat} i k_{cat}/K_m dla reakcji z L-tyrozyną i z [2-^{2}H]-L-tyrozyną. Wartości KIE deuteru w pozycji 2 są podobne do literaturowych (3.5 na k_{cat} i 2.5 na k_{cat}/K_m; Kiick & Phillips, 1988), podobnie efekty rozpuszczalnikowe dla L-tyrozyny (1.5 na k_{cat} i 1.8 na k_{cat}/K_m; Barbolina *et al.*, 2000).

Obserwowany KIE trytu ulega zmianie w trakcie reakcji. Interesujące wydawało się znalezienie czynnika odpowiedzialnego za taką zmianę. Pojawiające się produkty reakcji katalizowanej przez TPL (fenol, pirogronian, amoniak), jak i pojawiające się w wyniku działania układu LDH/NADH NAD^+ nie powodowały znaczącego wzrostu KIE. Sama obecność układu LDH/NADH również nie miała znaczenia dla wielkości efektu. Podobnie

zmiany stężenia substratu i enzymu, oraz czas reakcji nie wpływały proporcjonalnie na wielkość KIE. Pojawiający się w trakcie reakcji kwas 3-(*p*-hydroksyfenylo)-pirogronowy także nie miał wpływu na KIE. Te obserwacje oznaczają, że zmiana KIE trytu w trakcie reakcji jest powodowana przez nieco bardziej subtelne zjawiska, niż proste zmiany stężeń substratów i produktów reakcji.

Tabela 1. Stosunek aktywności właściwych ^{3}H produktu i wyjściowego substratu w pozycji 2 L-tyrozyny w trakcie reakcji

f	R_o/R_p	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.018	0.789	4.50	50.0	24.8	408
0.032	0.889	4.14	50.0	23.4	419
0.032	0.910	4.32	50.0	23.4	419
0.036	0.864	3.78	50.0	23.4	419
0.038	0.865	3.96	50.0	23.4	419
0.053	1.179	2.82	53.8	44.2	422
0.060	1.169	3.60	48.8	32.1	502
0.077	1.485	6.00	48.8	32.1	502
0.094	1.466	1.98	55.6	28.6	462
0.099	1.471	3.60	48.5	42.5	498
0.107	1.441	3.60	50.0	16.4	388
0.109	1.534	7.20	50.0	16.4	777
0.110	1.494	2.40	49.8	27.3	202
0.123	1.440	3.60	55.4	45.5	361
0.133	1.440	4.80	49.8	27.3	452
0.142	2.022	7.38	55.6	28.6	462
0.162	1.804	5.34	58.8	33.6	329
0.194	2.069	14.40	55.4	45.5	361
0.205	2.428	9.36	58.8	33.6	329
0.223	2.186	14.40	55.6	28.6	462
0.283	2.279	14.70	58.8	33.6	329
0.328	2.128	99.29	55.4	45.5	361

Tabela 2. Stosunek aktywności właściwych ^{3}H produktu i wyjściowego substratu w pozycji 2 L-tyrozyny w wodzie deuterowanej w trakcie reakcji

f	R_o/R_p	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.037	0.328	2.40	45.1	59.2	553
0.038	0.372	4.50	45.1	59.2	553
0.038	0.491	6.48	52.7	43.3	485
0.043	0.457	8.40	45.1	59.2	553
0.068	0.530	14.40	49.6	48.9	451
0.079	0.635	4.32	50.3	33.0	488
0.082	0.768	10.80	57.9	38.1	542
0.082	0.752	22.50	50.3	33.0	488
0.087	0.835	4.32	54.9	38.0	332
0.091	0.678	5.40	57.9	38.1	542
0.092	0.938	86.40	45.1	59.2	553
0.105	0.926	22.20	57.9	38.1	542
0.110	1.056	13.50	54.9	45.1	520
0.112	1.170	86.40	53.7	37.1	216
0.133	1.200	65.99	57.9	38.1	542
0.133	1.370	34.50	54.9	45.1	520
0.140	1.220	345.60	49.6	48.9	451
0.157	1.566	87.30	54.9	45.1	520
0.198	2.120	75.60	54.9	38.0	332
0.362	2.230	28.80	53.0	30.2	228
0.448	3.350	115.20	53.0	30.2	228
0.450	3.190	73.80	53.0	30.2	228

Po określeniu KIE deuteru metodą niekonkurencyjną (efekt na k_{cat}/K_m równy 2.4) spodziewałem się dużo większego, pierwszorzędowego efektu trytu w pozycji 2, tymczasem efekt ten rósł w trakcie reakcji od wartości odwrotnych do dużych wartości normalnych efektów izotopowych.

Wyjaśniłem ten fakt przeprowadzając eksperyment ^{1}H-NMR mierząc widmo przed i po reakcji dla 3mM L-tyrozyny wzbogaconej w 50% deuterem w pozycji 2 z dodatkiem 0.05M PLP i 50U TPL/ml w wodzie deuterowanej (w buforze stosowanym do badań KIE). Po

około 15 minutach od rozpoczęcia reakcji zaobserwowałem prawie całkowity zanik sygnału protonu w pozycji α, ale stopień przekształcenia substratu w produkty był bardzo niski.

Tabela 3. KIE $^1H/^3H$ w pozycji 2 L-tyrozyny

	k_{cat} [s^{-1}] H_2O	k_{cat}/K_m [$s^{-1}*mM^{-1}$] H_2O	k_{cat} [s^{-1}] D_2O	k_{cat}/K_m [$s^{-1}*mM^{-1}$] D_2O	$\alpha_{V.rozp}$	$\alpha_{V/K.rozp}$
L-tyrozyna	3.50 ± 0.05	3.32 ± 0.30	2.35 ± 0.10	1.83 ± 0.19	1.49 ± 0.06	1.81 ± 0.25
[2-^{2}H]-L-tyrozyna	1.05 ± 0.08	1.37 ± 0.11	0.716 ± 0.013	0.82 ± 0.14	1.46 ± 0.11	1.67 ± 0.31
α	3.34 ± 0.25	2.42 ± 0.29	3.28 ± 0.13	2.24 ± 0.61	-	-

Oznacza to, że w początkowych etapach reakcji następuje bardzo szybka wymiana tego protonu z rozpuszczalnikiem, która jednak później ulega zahamowaniu. Dlatego obserwowałem zaniżone wartości obserwowanego KIE, gdyż aktywność właściwa trytu w izolowanej mieszaninie produktów jest zawyżona wskutek wymiany. Podczas dalszych etapów reakcji wymiana trytu z rozpuszczalnikiem zachodzi coraz wolniej, a aktywność właściwa ^3H w produktach maleje, gdyż proporcjonalnie więcej izotopu pochodzi z właściwej reakcji eliminacji, w której istnieje bardzo duży, pierwszorzędowy KIE $^1H/^3H$.

W tabelach 1 i 2 przedstawiłem wyniki eksperymentów wodzie i w wodzie deuterowanej podając wartości obserwowanego KIE (R_0/R_p) zamiast wartości KIE rzeczywistego, gdyż jego pomiar okazał się niemożliwy.

Pomiary wykonane dla obserwowanego efektu trytu w wodzie deuterowanej wykazały, że jest on niższy od podobnego efektu w wodzie zwykłej przy podobnym stopniu przereagowania. Prawdopodobnie woda deuterowana przesuwa proporcję szybkości deprotonacji i eliminacji jeszcze bardziej na korzyść oderwania protonu z pozycji 2.

Ciekawym zjawiskiem w reakcji katalizowanej przez TPL jest fakt częściowego przeniesienia protonu z pozycji 2 na atom 1' reszty aromatycznej eliminowanej podczas reakcji. Celem pomiaru transferu trytu na fenol ekstrahowałem go z mieszaniny produktu eterem dietylowym. Zmierzyłem jednak bardzo niewielki stopień przeniesienia (maksymalnie 0.9% dla reakcji w wodzie zwykłej, i 0.5% dla reakcji w wodzie deuterowanej) w porównaniu do literaturowego (Palcic *et al.*, 1987) zmierzonego dla przeniesienia deuteru (nawet 25%). Może to oznaczać, że efekt izotopowy na przeniesieniu protonu jest bardzo duży.

Sprawdziłem możliwość przeniesienia trytu z pozycji 2 na pozycję 3 tworzącego się pirogronianu izolując tworzony z niego ilościowo L-mleczan na żywicy anionowymiennej.

Stwierdziłem, że mniej niż 0.5% trytu jest przenoszone na pirogronian podczas reakcji w wodzie zwykłej, i mniej niż 0.8% podczas reakcji w wodzie deuterowanej

Duże KIE deuteru na k_{cat} i k_{cat}/K_m oznaczają, że atom wodoru w pozycji 2 odgrywa istotną rolę w przekształceniu kompleksu enzym – substrat w kompleks enzym – produkt.

Wykonałem pomiary KIE $^1H/^2H$ w wodzie i w wodzie deuterowanej ze względu na istotne informacje o wpływie rozpuszczalnika na proces deprotonacji atomu węgla w pozycji 2 L-tyrozyny. Z pomiarów wynika, że efekty izotopowe na k_{cat} i k_{cat}/K_m na atomie wodoru w pozycji 2 są podobne w wodzie i w wodzie deuterowanej; a także, że analogiczne efekty rozpuszczalnikowe $^1H/^2H$ są identyczne dla L-tyrozyny deuterowanej i niedeuterowanej w granicach błędu eksperymentalnego. Taka niezależność efektów oznacza, że zarówno atom wodoru w pozycji 2, jak i rozpuszczalnik mają wpływ na ten sam stan przejściowy reakcji eliminacji fenolu z L-tyrozyny.

Efekty deuteru na atomie wodoru w pozycji 2 są zawsze wyższe od efektów rozpuszczalnikowych co oznacza, że to oderwanie protonu z pozycji α ma większy wpływ na całkowitą szybkość początkową reakcji, niż wymiana protonów z rozpuszczalnikiem.

3.2.3.1.2. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 3

Tabele 4-6 przedstawiają kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 3. Tabele 4 i 5 zawierają wyniki badań KIE trytu w pozycji 3*S* (α) dla różnych stopni konwersji w produkt (f) w zależności od stężeń L-tyrozyny ([S]), fosforanu 5'-pirydoksalu ([PLP]), enzymu ([TPL]), i od czasu reakcji t. Tabela 6 przedstawia wynik badania KIE deuteru w pozycji 3 metodą niekonkurencyjną, podane są wartości k_{cat} i k_{cat}/K_m dla substratu znakowanego deuterem (Sigma), oraz efekty (α) na te wartości.

Efekt trytu w pozycji 3*S* zmienia się (podobnie do obserwowanego KIE trytu w pozycji 2) rosnąco w trakcie reakcji. Wartość efektu przyjmuje wartości normalne, dla większych stopni przereagowania typowe dla pierwszorzędowych efektów trytu. Wzrost KIE jest spowodowany tym, że cząstkowa reakcja, na której jest duży KIE w pozycji 3*S*, ulega zwolnieniu w trakcie trwania reakcji i zaczyna ona decydować o całkowitej szybkości reakcji. Podobne zmiany cząstkowych szybkości reakcji objawiają się także w początkowo szybkim odrywaniu protonu z pozycji 2 (3.2.3.1.1.).

W początkowych etapach reakcji KIE w pozycji 3*S* jest niski, dlatego nie zaobserwowałem go mierząc efekt deuteru w pozycji 3 (łącznie *S* i *R*) metodą niekonkurencyjną (1.0 na k_{cat}/K_m w granicach błędu eksperymentalnego), która pozwala na pomiar KIE na początkową szybkość reakcji.

Tabela 4. KIE $^{1}H/^{3}H$ w pozycji 3*S* L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.036	1.057	0.66	49.5	33.0	211
0.057	1.229	1.20	50.0	32.9	374
0.060	1.159	1.02	49.8	32.9	288
0.060	1.159	1.02	49.8	32.9	288
0.088	1.742	1.80	49.8	32.9	288
0.101	1.849	2.40	50.0	32.9	374
0.116	2.474	3.60	50.0	32.9	374
0.129	2.479	3.00	49.8	32.9	288
0.132	2.485	1.26	49.8	32.8	341
0.151	3.140	4.80	50.0	32.9	374
0.163	3.257	4.20	49.8	32.9	288
0.176	3.307	6.00	50.0	32.9	374
0.186	3.165	2.40	49.8	32.8	341
0.196	3.623	7.80	50.0	32.9	374
0.212	3.737	6.18	49.8	32.9	288
0.309	3.866	25.50	48.4	32.8	177
0.309	4.145	1.98	38.6	25.4	72.4

Nie udało mi się zaobserwować podobnego efektu deuteru metodą konkurencyjną za pomocą ^{1}H-NMR stosując równomolową mieszaninę L-tyrozyny (2.4mM) o naturalnym składzie izotopowym z izotopologiem znakowanym deuterem w obydwu pozycjach β (w układzie obecny był 0.04mM PLP, 0.8mM NADH, 16U/ml LDH i 56U TPL/ml w buforze stosowanym do badań KIE w wodzie deuterowanej – 0.1M fosforan potasu, 0.2M KCl, pH 8.3). Taka metoda jest obarczona dużym błędem eksperymentalnym, dodatkowo KIE można wyznaczyć w tym wypadku używając odpowiednich intensywności sygnału zmierzonych dla substratu, co w połączeniu z niską rozpuszczalnością tyrozyny w buforze reakcyjnym uniemożliwia nawet orientacyjne określenie KIE.

Bardzo ciekawy jest także fakt, że efekt trytu w pozycji 3*R* nie zmienia się, i po uśrednieniu wynosi 1.093 ± 0.029. Jest to typowa wartość dla drugorzędowego efektu trytu co oznacza, że atom wodoru 3*R* nie bierze bezpośredniego udziału podczas katalizy. Taka asymetria zachowania się obydwu geminalnych atomów wodoru jest bardzo ciekawym

zjawiskiem. Świadczy ona o dużym znaczeniu ułożenia przestrzennego w centrum aktywnym podczas katalizy.

Tabela 5. KIE $^{1}H/^{3}H$ w pozycji 3*R* L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.072	1.048	1.20	49.8	32.7	493.4
0.078	1.041	13.79	49.8	32.7	493.4
0.081	1.025	3.60	49.8	32.7	493.4
0.087	1.036	2.40	49.8	32.7	493.4
0.098	1.119	9.24	49.8	32.7	493.4
0.101	1.129	5.46	48.6	32.5	28.8
0.103	1.123	2.46	48.6	32.5	28.8
0.104	1.106	1.20	48.6	32.5	28.8
0.105	1.144	7.45	48.6	32.5	28.8
0.108	1.091	4.57	48.6	32.5	28.8
0.111	1.164	3.60	48.6	32.5	28.8
0.143	1.089	3.85	49.8	34.5	60.2

Tabela 6. KIE $^{1}H/^{2}H$ w pozycji 3 L-tyrozyny

	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}*mM^{-1}$]
L-tyrozyna	3.50 ± 0.05	3.32 ± 0.30
[3-$^{2}H_2$]-L-tyrozyna	3.21 ± 0.12	3.39 ± 0.11
α	1.09 ± 0.04	0.98 ± 0.10

Efekt izotopowy deuteru na k_{cat} jest nieco wyższy od efektu na k_{cat}/K_m (1.09 vs 1.0) co wskazuje na to, że atomy wodoru w pozycji 3 mają pewne niewielkie znaczenie dla etapu dysocjacji kompleksu enzym – produkt. Warto jednak pamiętać, że obydwa efekty są podobne w granicach błędu eksperymentalnego. Są to efekty drugorzędowe.

Zmierzyłem stopień zatrzymania trytu w powstającym w trakcie reakcji pirogronianie (przekształconym w L-mleczan) izolując go na żywicy jonowymiennej. Niespodziewanie okazało się, że w kwasie pirogronowym pozostaje mniej niż 1% trytu z pozycji 3*S*, i mniej niż 10% trytu w pozycji 3*R*. Oznacza to, że w końcowych etapach reakcji zachodzi bardzo szybka

wymiana atomów wodoru związanych z atomem węgla 3, ale przynajmniej w pozycji 3*R* nie ma ona znaczenia dla całkowitej szybkości reakcji, ponieważ KIE w tej pozycji jest niewielki.

Atomy wodoru w pozycji 3 cząsteczki L-tyrozyny nie ulegają wymianie z rozpuszczalnikiem podczas reakcji w obecności układu LDH/NADH, gdyż uniemożliwia on zachodzenie reakcji odwrotnej do rozkładu L-tyrozyny. Dowodem jest fakt, że KIE trytu zaobserwowany metodą radiochemiczną nie spada poniżej 1, co miałoby miejsce wskutek przechodzenia trytu do rozpuszczalnika analogicznie do eksperymentów z KIE w pozycji 2. Inna sytuacja jest w nieobecności tego układu, co potwierdziłem eksperymentem wykonanym za pomocą ^{1}H-NMR.

Seria widm wykonana podczas reakcji dla układu zawierającego 3mM L-tyrozynę, 0.05mM PLP, 50U/ml TPL w buforze używanym do pomiarów KIE w wodzie deuterowanej (0.1M fosforan potasu, 0.2M KCl, pH 8.3) wykazała powolną wymianę atomów wodoru w pozycji 3 podczas reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową (Tabela 7). Jednocześnie nie stwierdziłem istnienia sygnału od kwasu pirogronowego (przy 2.37ppm), co świadczy o szybkiej wymianie protonów tego kwasu z rozpuszczalnikiem. W tabeli 7 podałem zależność względnej intensywności sygnału protonów w pozycji 3 w zależności od stopnia przereagowania (f) wyznaczonego z względnej intensywności sygnału protonów aromatycznych tworzonego fenolu, oraz czasu reakcji t. Widma były zbierane w ciągu kwadransa poprzedzającego podany czas reakcji.

Tabela 7. Kinetyka wymiany protonów w pozycji 3 L-tyrozyny z wodą deuterowaną

f	względna intensywność sygnału 3H	**t** [min]
0.052	100	15
0.061	93	30
0.067	92	45
0.078	82	60
0.100	72	75
0.093	66	90
0.112	60	105
0.128	57	120
0.137	55	135
0.161	55	150
0.156	50	165
0.167	47	180
0.172	44	195

Podobny eksperyment w obecności 0.8mM NADH i 16U/ml LDH nie wykazał wymiany protonów w pozycji 3 L-tyrozyny, co jest dowodem na nieodwracalność reakcji eliminacji TPL powodowaną przekształceniem pirogronianu w L-mleczan. Jednocześnie nie udało mi się zaobserwować sygnału od protonu w pozycji 3 kwasu mlekowego (w kwasie o naturalnym składzie izotopowym zwykle jest to dublet przy 1.40ppm o stałej sprzężenia 7.0Hz; w wodzie deuterowanej należałoby się spodziewać singletu, gdyż atom wodoru w pozycji 2 tworzącego się L-mleczanu pochodziłby z wody deuterowanej), co potwierdza szybką wymianę protonu w pozycji 3 pirogronianu tworzącego się podczas działania TPL.

3.2.3.1.3. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 2',6'

Tabele 8-10 pokazują wyniki badania KIE wodoru w pozycji 2',6'. Oznaczenia wielkości w tabelach przedstawiłem w podobny sposób do poprzednich danych. Tabela 8 ilustruje wartości KIE trytu, a tabela 9 wstępne dane uzyskane dla podobnego efektu w obecności inhibitora – *S*-metylo-L-cysteiny (I).

Tabela 10 pokazuje wyniki uzyskane dla pomiarów KIE deuteru w pozycji 2',6' uzyskane metodą niekonkurencyjną. Używałem handlowo dostępnej [2',6'-$^{2}H_2$]-L-tyrozyny (Sigma).

Tabela 8. KIE $^{1}H/^{3}H$ w pozycji 2',6' L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.066	0.886	4.26	41.8	32.2	1339
0.076	0.951	6.66	41.8	32.2	1339
0.095	0.938	6.19	49.6	32.9	832
0.097	0.930	5.22	49.6	32.5	839
0.098	0.935	8.94	41.8	32.2	1339
0.100	0.920	3.42	49.6	32.5	839
0.106	0.922	1.44	49.6	32.5	839
0.106	0.884	2.34	49.6	32.5	839
0.108	0.902	7.44	49.6	32.9	1325
0.109	0.887	1.98	49.6	32.9	832
0.111	0.954	3.96	49.6	32.9	832
0.123	0.894	7.44	49.6	32.9	1325
0.187	0.888	6.01	49.0	31.9	1023
0.358	0.949	12.85	49.0	31.9	1023

Tabela 9. KIE $^1H/^3H$ w pozycji 2',6' L-tyrozyny w obecności inhibitora *S*-metylo-L-cysteiny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [mM]	[I] [mM]
0.059	3.096	3.6	48.5	133	4.37	61.4
0.071	3.873	5.3	48.5	133	4.37	61.4
0.152	6.258	67.1	48.5	133	4.37	61.6
0.155	6.766	66.1	48.5	133	4.37	61.4
0.163	5.993	81.3	48.5	133	4.37	61.6
0.175	4.721	80.7	48.5	133	4.37	61.4

Tabela 10. KIE $^1H/^2H$ w pozycji 2',6' L-tyrozyny

	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}*mM^{-1}$]
L-tyrozyna	3.50 ± 0.05	3.32 ± 0.30
[2',6'-$^2H_2$]-L-tyrozyna	3.38 ± 0.16	3.34 ± 0.24
α	1.04 ± 0.05	0.99 ± 0.12

Kinetyczny efekt izotopowy trytu w pozycji 2',6' jest efektem drugorzędowym odwrotnym (0.917 ± 0.015), co oznacza, że reakcja z izotopem cięższym w tej pozycji zachodzi nieco szybciej, niż z izotopem lżejszym. Podobnego efektu na k_{cat}/K_m nie zaobserwowałem dla deuteru, jednak jest to zrozumiałe w świetle faktu, że jest od mniejszy niż dla trytu, a błąd pomiaru kinetyki jest dużo większy niż metody radiometrycznej.

Odwrotny KIE trytu może oznaczać, że badany atom podczas stanu przejściowego decydującego o szybkości reakcji znajduje się w bardzo podobnym otoczeniu centrum aktywnego do tego, w jakim znajduje się w fenolu skompleksowanym z enzymem.

Efekty deuteru na k_{cat} i k_{cat}/K_m są równe 1.0 w granicach błędu eksperymentalnego.

Poczynione przez mnie obserwacje świadczą o tym, że atomy wodoru w pozycji 2',6' nie biorą bezpośredniego udziału w katalizie podczas enzymatycznego rozkładu L-tyrozyny.

Ciekawe wyniki dało badanie KIE trytu w obecności inhibitora – *S*-metylo-L-cysteiny. W takiej sytuacji obserwowałem wzrost KIE podczas reakcji do dużych wartości typowych dla efektu pierwszorzędowego. Zwykle inhibitory nie wpływają na wielkość KIE wyznaczanego metodą konkurencyjną. Zaobserwowane przez mnie zjawisko jest trudne do wyjaśnienia; być może powodem takiego zachowania jest to, że wytwarzany podczas reakcji fenol ze znacznikiem izotopowym może wchodzić w reakcję resyntezy L-tyrozyny z *S*-metylo-

L-cysteiny z pewnym odwrotnym efektem izotopowym powodując zubożenie produktu w tryt, a wielokrotne zajście takiego zjawiska jest możliwe dzięki dużemu nadmiarowi *S*-metylo-L-cysteiny. Jednocześnie może to powodować wzrost KIE podczas reakcji.

3.2.3.1.4. Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w pozycji 3',5'

Tabele 11-13 pokazują wyniki badania KIE wodoru w pozycji 3',5'. Oznaczenia wielkości w tabelach przedstawiłem w podobny sposób do poprzednich danych. Tabela 11 ilustruje wartości KIE trytu, a tabela 12 wstępne dane uzyskane dla podobnego efektu w obecności inhibitora – *S*-metylo-L-cysteiny (I).

Tabela 13 przedstawia wyniki uzyskane w oznaczaniu KIE na k_{cat} i k_{cat}/K_m metodą niekonkurencyjną. Deuterowana L-tyrozyna została otrzymana w naszym zespole (Kozłowska, 2003).

Tabela 11. KIE $^1H/^3H$ w pozycji 3',5' L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.085	1.015	2.76	49.8	33.1	272
0.087	1.019	1.80	49.8	33.1	272
0.087	1.011	1.26	49.8	33.1	272
0.092	1.002	0.66	49.8	33.1	272
0.119	0.990	1.86	49.9	10.3	266
0.132	1.000	3.06	49.9	10.3	266
0.134	1.003	1.86	49.8	34.9	343
0.148	0.998	4.26	49.9	10.3	266
0.155	0.986	5.40	49.9	10.3	266
0.210	1.015	3.60	49.8	34.9	248
0.230	0.986	7.20	48.6	36.0	508
0.265	1.015	3.60	48.2	31.6	427
0.276	1.015	10.87	48.6	36.0	508
0.427	0.985	10.87	47.0	30.9	95.3

Kinetyczny efekt izotopowy trytu w pozycji 3',5' wynosi 1.003 ± 0.007. Jego brak potwierdzają pomiary kinetyczne efektu deuteru (KIE na k_{cat}/K_m wynosi 1.0). KIE deuteru na k_{cat} jest wyższy, choć typowy dla efektów drugorzędowych (1.26). Ponieważ jest on znacząco większy od podobnego efektu w pozycji 2',6' (1.04) można przypuszczać, że jest to

wywołane bliskością grupy hydroksylowej zaangażowanej w dearomatyzację i rearomatyzację reszty fenolowej podczas reakcji. Porównanie efektów deuteru na k_{cat} i na k_{cat}/K_m pozwala na wysnucie wniosku, że atomy wodoru w pozycji 3',5' grają pewną rolę podczas dysocjacji kompleksu enzym – produkt.

Tabela 12. KIE $^{1}H/^{3}H$ w pozycji 3',5' L-tyrozyny w obecności inhibitora *S*-metylo-L-cysteiny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]	[I] [mM]
0.166	0.538	3.72	48.2	35.0	16.2	1.66
0.190	0.590	5.76	48.2	35.0	16.2	1.66
0.212	0.661	7.68	48.2	35.0	16.2	1.66

Tabela 13. KIE $^{1}H/^{2}H$ w pozycji 3',5' L-tyrozyny

	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$s^{-1}*mM^{-1}$]
L-tyrozyna	3.50 ± 0.05	3.32 ± 0.30
[3',5'-$^{2}H_2$]-L-tyrozyna	2.77 ± 0.14	3.37 ± 0.20
α	1.26 ± 0.06	0.99 ± 0.11

Dla pozycji 3',5' także wykonałem wstępne pomiary KIE trytu w obecności *S*-metylo-L-cysteiny. Odmiennie, niż miało to miejsce dla eksperymentów ze znacznikiem w pozycji 2',6' (3.2.3.1.3) zaobserwowałem znaczący odwrotny rosnący KIE. Być może tworzony w reakcji znakowany trytem fenol wchodzi w reakcję resyntezy L-tyrozyny z *S*-metylo-L-cysteiny z istotnym normalnym efektem izotopowym powodując wzbogacenie produktu w tryt. Znacznie trudniej wyjaśnić wzrost KIE podczas reakcji w tej sytuacji, co świadczy o złożoności mechanizmu kinetycznego reakcji katalizowanej przez TPL.

3.2.3.2. Kinetyczne efekty izotopowe $^{12}C/^{14}C$

3.2.3.2.1. Kinetyczny efekt izotopowy $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2

Tabela 14 przedstawia wyniki badania KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2. Dane zaprezentowałem w sposób podobny do poprzednich eksperymentów. Kinetyczny efekt izotopowy węgla zmienia się w trakcie reakcji. Aby lepiej uwidocznić tę tendencję, wyjątkowo zgrupowałem poszczególne dane z poszczególnych eksperymentów ze sobą.

KIE węgla maleje w trakcie reakcji od wartości normalnych, jakie spodziewałem się uzyskać dla pierwszorzędowego efektu $^{12}C/^{14}C$ (1.038) do dużych efektów odwrotnych (do

0.882). Oznacza to, że podczas reakcji następuje względna zmiana szybkości reakcji poszczególnych etapów katalizy. Początkowo o szybkości reakcji decyduje etap, na którym istnieje normalny KIE węgla (np. oderwanie protonu z pozycji 2), lecz później coraz bardziej wolny jest etap, na którym efekt w badanej pozycji jest odwrotny. Znalezienie etapu reakcji, na którym hipotetycznie można byłoby się spodziewać odwrotnego KIE węgla, jest jednak bardzo trudne.

Tabela 14. KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2 L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.241	0.988	3.60	52.3	34.4	174
0.284	0.979	5.40	52.3	34.4	174
0.321	0.962	7.38	52.3	34.4	174
0.375	0.919	9.90	52.3	34.4	174
0.087	0.984	0.90	49.8	32.7	244
0.092	0.939	1.68	49.8	32.7	244
0.113	0.947	2.82	49.8	32.7	244
0.108	0.902	3.67	49.8	32.7	244
0.127	0.918	5.51	49.8	32.7	244
0.147	0.916	7.81	49.8	32.7	244
0.086	1.004	0.60	37.3	32.3	205
0.085	0.981	1.20	37.3	32.3	205
0.085	0.944	1.80	37.3	32.3	205
0.085	0.913	3.00	37.3	32.3	205
0.105	0.899	4.80	37.3	32.3	205
0.127	0.902	7.81	37.3	32.3	205
0.091	1.038	1.26	49.7	32.6	162
0.118	1.010	2.40	49.7	32.6	162
0.136	1.007	3.60	49.7	32.6	162
0.143	0.986	5.40	49.7	32.6	162
0.108	0.929	9.07	49.7	32.6	162
0.120	0.882	14.40	49.7	32.6	162

3.2.3.2.2. Kinetyczny efekt izotopowy $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 3

Tabela 15 przedstawia wyniki badania KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 3. Dane zaprezentowałem w sposób podobny do poprzednich eksperymentów.

W badaniach KIE węgla w pozycji 3 udało mi się przeprowadzić jedynie wstępne pomiary, gdyż otrzymałem zbyt małą ilość [3-^{14}C]-L-tyrozyny, aby przeprowadzić więcej eksperymentów.

Tabela 15. KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 3 L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.098	1.065	5.22	49.5	33.4	268
0.204	1.038	1.80	46.2	30.4	176
0.218	1.039	8.52	50.3	33.0	225
0.249	1.040	2.94	50.3	33.0	225

W badaniach KIE węgla w pozycji 3 udało mi się przeprowadzić jedynie wstępne pomiary, gdyż otrzymałem zbyt małą ilość [3-^{14}C]-L-tyrozyny, aby przeprowadzić więcej eksperymentów.

Otrzymana wartość KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 3 wynosi 1.046 ± 0.015. Jest to typowa wartość dla pierwszorzędowego efektu izotopowego $^{12}C/^{14}C$ zgodna z danymi otrzymanymi dla KIE $^{11}C/^{14}C$ (1.07; Axelsson *et al.*, 1992), które pozwoliły na przewidzenie KIE $^{12}C/^{14}C$ rzędu 1.04.

Otrzymany wynik pozwolił mi potwierdzić ważną rolę atomu węgla w pozycji 3 podczas reakcji katalizowanej przez fenololiazę tyrozynową. Należy jednak pamiętać o tym, że niewielka ilość wykonanych pomiarów powoduje większe ryzyko przypadkowości uzyskanych rezultatów.

3.2.3.2.2. Kinetyczny efekt izotopowy $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 1'

Tabela 16 przedstawia wyniki badania KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 1' (w pierścieniu aromatycznym). Dane zaprezentowałem w sposób podobny do poprzednich eksperymentów.

Podczas badania KIE w pozycji 1' również uzyskałem jedynie wstępne dane ze względu na zbyt małą radioaktywność otrzymanej przez mnie [1'-^{14}C]-L-tyrozyny.

KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 1' wynosi 1.004 ± 0.007, co jest niespodzianką w świetle dużego KIE w pozycji 3 (wywołanego prawdopodobnie rozerwaniem wiązania pomiędzy tym atomem, a atomem węgla 1' podczas eliminacji fenolu), albowiem należało się spodziewać

podobnego KIE na aromatycznym atomie węgla. Warto zauważyć, że KIE $^{1}H/^{3}H$ w pozycji 2',6' jest odwrotny (0.92; 3.2.3.1.3.), być może istnieje tendencja do szybszej reakcji z cięższymi atomami w tej części cząsteczki, która znajduje też odzwierciedlenie w KIE węgla 1' powodując obniżenie KIE.

Tabela 16. KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 1' L-tyrozyny

f	α	t [ks]	[PLP] [μM]	[TPL] [nM]	[S] [μM]
0.130	1.009	14.40	48.4	31.7	984
0.158	1.001	14.28	49.8	32.7	1363
0.161	1.004	10.86	49.8	32.7	1363

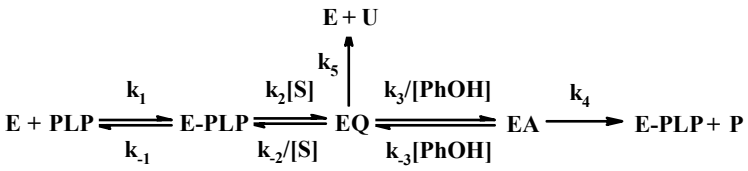
Interpretując ten wynik warto pamiętać, że liczba pomiarów KIE była zbyt niska, aby wysnuwać absolutnie pewne wnioski.

3.2.4. Rozważania nad ogólnym mechanizmem działania fenololiazy tyrozynowej

W wykonanych przeze mnie badaniach bardzo ważną wskazówką co do mechanizmu reakcji są zmiany kinetycznych efektów izotopowych węgla w pozycji 3 i wodoru w pozycji 3S, a także początkowo szybka deprotonacja substratu. Takie zjawiska świadczą o zmianach względnych szybkości reakcji cząstkowych w trakcie katalizy.

Zmiany KIE mogą być spowodowane kilkoma czynnikami – np. inhibicją jednego z etapów reakcji poprzez produkt, względnymi zmianami stężeń produktów przejściowych w centrum aktywnym (gdy nie jest słuszne założenie stanu stacjonarnego twierdzące, że szybkość rozkładu produktu przejściowego jest równa szybkości jego tworzenia), czy też kumulacją silnie wiążącego się z enzymem produktu pośredniego, który może oddysocjowywać od enzymu.

W zaproponowanym przez mnie modelu działania TPL (Schemat 50) pominąłem możliwość dysocjacji kompleksu enzym – produkt przejściowy, gdyż to powodowałoby racemizację L-tyrozyny, a taki proces nie został wykryty podczas badań (R. S. Phillips, prywatne doniesienie).



Schemat 50. Proponowany mechanizm kinetyczny reakcji katalizowanej przez TPL

Na schemacie 50 E oznacza enzym, S – substrat, E-PLP – kompleks enzym-PLP, EQ – kompleks enzym-chinoidowy produkt przejściowy powstały po oderwaniu atomu wodoru w pozycji 2, EA – kompleks enzym-α-aminoakrylan, P – produkt (pirogronian amonu), U – produkty uboczne (kwas 3-(*p*-hydroksyfenylo)-pirogronowy i fosforan 5'-pirydoksaminy). Reakcje są opisywane przez stałe szybkości opisujące odwracalne wiązanie PLP przez enzym (stała szybkości wiązania k_1 i rozpadu k_{-2}), deprotonację (stała k_2, i stała reprotonacji k_{-2}), eliminację fenolu (k_3, i stała odwrotnej reakcji addycji fenolu do α-aminoakrylanu k_{-3}), oraz nieodwracalne (wskutek stosowanej następczej reakcji z LDH/NADH przekształcającej ilościowo pirogronian do L-mleczanu) tworzenie produktu z α-aminoakrylanu (k_4), i tworzenie produktów ubocznych z kompleksu EQ (k_5).

W rozważaniach można pominąć etap wiązania kofaktora, którego stała dysocjacji wynosi 0.6μM (Chen *et al.*, 1995), co pozwala założyć, że praktycznie cały wolny enzym występuje w roztworze jako holoenzym E-PLP; a także reakcję uboczną, której stała szybkości jest bardzo niska ($1.9*10^{-5}s^{-1}$; Faleev *et al.*, 2003).

Zasada Schiffa PLP-L-tyrozyna nie ulega spontanicznemu tworzeniu w warunkach reakcji (ani także po ogrzaniu mieszaniny) przy nieobecności TPL, co stwierdziłem nie obserwując zmian w widmie ^{1}H-NMR mieszaniny PLP i L-tyrozyny w porównaniu z widmami tych substancji.

Przyjęty przeze mnie model pozwala wytłumaczyć względne zmiany szybkości reakcji poprzez możliwość zachodzenia resyntezy L-tyrozyny z tworzącego się w znaczących ilościach podczas reakcji fenolu oraz α-aminoakrylanu. Wtedy szybkości reakcji cząstkowych eliminacji i addycji fenolu będą się zmieniać podczas trwania reakcji. Dzięki obecności fenolu w późniejszych etapach reakcji będzie powstawać więcej kompleksu enzym-chinoid, który angażuje centrum aktywne enzymu utrudniając wiązanie substratu i jego deprotonację. To może tłumaczyć jedynie początkowo szybką deprotonację substratu.

Pojawiający się fenol zmienia także proporcję pomiędzy rozpadem kompleksu enzym-α-aminoakrylan w kierunku produktów i w kierunku substratów. To może być przyczyną pojawiania się w trakcie reakcji dużego KIE wodoru w pozycji 3*S*.

Zaproponowany model nie tłumaczy dobrze braku wpływu na hamowanie deprotonacji w eksperymentach z [2-^{3}H]-L-tyrozyną z dodatkiem fenolu pomimo widocznego wpływu na zahamowanie reakcji eliminacji. Możliwym wyjaśnieniem jest konieczność początkowego utworzenia wystarczającej ilości kompleksu enzym α-aminoakrylan, który także może odgrywać rolę w angażowaniu enzymu i utrudnianiu wiązania oraz deprotonacji substratu.

Po przyjęciu uproszczeń wzór na szybkość reakcji wyrażoną jako k_{cat}/K_m (21) będzie miał postać:

$$k_{cat} / K_m = \frac{k_4 * k_3 * k_2}{k_4 * k_3 + k_4 * k_{-2} + k_{-2} * k_{-3} * [PhOH]} \tag{21}$$

Obserwowane parametry kinetyczne na początkową szybkość reakcji są mierzone wtedy, gdy ilość fenolu jest znikoma, można więc założyć niską szybkość addycji fenolu. W takim wypadku eliminacja fenolu może być rozważana jako nieodwracalna, i wzór na początkową szybkość (22) reakcji będzie miał następującą postać:

$$k_{cat} / K_m = \frac{k_3 * k_2}{k_3 + k_{-2}} \tag{22}$$

Porównanie $(k_{cat}/K_m)_i$ uzyskanego dla reakcji z dodatkiem fenolu i bez niego umożliwia (po przekształceniach) wyprowadzenie wzoru (23):

$$\frac{k_{cat} / K_m}{(k_{cat} / K_m)_i} = 1 + \frac{k_{-3} * k_{-2} * [PhOH]}{k_4 * (k_3 + k_{-2})} \tag{23}$$

z którego wynika, że:

$$K_i = \frac{k_4 * (k_3 + k_{-2})}{k_{-3} * k_{-2}} \tag{24}$$

Mierząc szybkości reakcji w sposób opisany dla pomiarów KIE metodą niekonkurencyjną dla różnych stężeń fenolu (od 20 do 300μM) i porównując je z szybkością policzoną dla wyznaczonych uprzednio parametrów kinetycznych dla L-tyrozyny wyznaczyłem wartości stałej inhibicji K_i w wodzie i w wodzie deuterowanej optymalizując k_{cat} i K_m do wyników pomiarów za pomocą programu Enzfitter 1.05 (Elsevier). Rezultaty pomiarów z udziałem fenolu przedstawia tabela 17.

Tabela 17. Inhibicja enzymatycznego rozkładu L-tyrozyny przez fenol

substrat	rozpuszczalnik	K_i [μM]
L-tyrozyna	H_2O	144 ± 28
L-tyrozyna	D_2O	149 ± 38
[3-$^2H_2$]-L-tyrozyna	H_2O	96 ± 25

Wyznaczona K_i dla inhibitora mieszanego – fenolu – to bardzo cenny parametr reakcji pozwalający uzyskać dodatkowe dane dotyczące cząstkowych szybkości reakcji. Stałe inhibicji w wodzie i wodzie deuterowanej są do siebie podobne (należy jednak uwzględnić duży błąd eksperymentalny podczas wyznaczania tych parametrów), co może oznaczać, że

stałe szybkości k_{-2}, k_3, k_{-3} i k_{-4} tworzące K_i nie zależą od składu izotopowego wody. Jest to szczególnie ważne stwierdzenie dla stałej reprotonacji k_{-2} opisującej powrót protonu na atom węgla w pozycji 2 substratu.

Wartość K_i dla L-tyrozyny deuterowanej w pozycji 3 jest cenną informacją w kontekście dużego wzrostu KIE trytu w pozycji 3*S* podczas reakcji. Wiedząc, że podczas przekształcania *α*-aminoakrylanu w produkty (opisywanego przez stałą szybkości k_4) następuje oderwanie atomów wodoru w pozycji 3, można się spodziewać dużego pierwszorzędowego KIE na k_4 i niewielkich efektów na pozostałe cząstkowe stałe szybkości reakcji. Odzwierciedleniem takiego zjawiska może być istotna różnica pomiędzy stałymi inhibicji dla fenolu wyznaczonymi w reakcji z L-tyrozyną i z [3-$^2H_2$]-L-tyrozyną, dla której wartość K_i powinna być niższa. Zaobserwowałem takie zjawisko w reakcji katalizowanej przez TPL, jednak duży błąd eksperymentalny utrudnia interpretację wyników.

Wykorzystując dane eksperymentalne i literaturową wartości stałej szybkości deprotonacji ($k_2 = 80s^{-1}$; Sundararaju *et al.*, 2000) można optymalizować pozostałe nieznane parametry reakcji do równań:

1. na obserwowany KIE $^1H/^3H$ w pozycji 2 (25):

$$\frac{R_0}{R_p} = \frac{1-(1-f)^{\frac{k_2}{k_4*k_3+k_4k_{-2}+k_{-2}*k_{-3}*f*[S]}*\frac{k_4*k_3+k_4k_{-2H}+k_{-2H}*k_{-3}*f*[S]}{k_{2H}}}}{f} - n \tag{25}$$

gdzie wykładnik potęgi w mianowniku to wyrażenie na rzeczywisty KIE wodoru w pozycji 2, a n to stosunek radioaktywności właściwej trytu uwolnionego wskutek deprotonacji atomu węgla bez zajścia eliminacji fenolu, do radioaktywności właściwej wyjściowej L-tyrozyny. Równanie (26) opisuje wartość n:

$$n = \exp\{-\frac{k_{2H}*(1-f) - \frac{k_{-2H}*k_2*p}{k_3+k_{-2}*(1-p)+k_{-2H}*p-\frac{k_3*k_{-3}*f*[S]}{k_4+k_{-3}*f*[S]}}}{[K_m+(1-f)*[S]]}*[E-PLP]*[S]*t\} \tag{26}$$

2. na KIE $^1H/^3H$ w pozycji 3*S* (27):

$$\alpha_H = \frac{k_3+k_{-2}+\frac{k_{-2}*k_{-3}*f*[S]}{k_{4H}}}{k_3+k_{-2}+\frac{k_{-2}*k_{-3}*f*[S]}{k_4}} \tag{27}$$

3. na KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2 (28):

$$\alpha_C = \frac{k_4*k_3*k_2}{k_4*k_3+k_4*k_{-2}+k_{-2}*k_{-3}*[PhOH]}*\frac{k_{4C}*k_{3C}+k_{4C}*k_{-2C}+k_{-2C}*k_{-3C}*[PhOH]}{k_{4C}*k_{3C}*k_{2C}} \tag{28}$$

Parametry bez dodatkowych indeksów oznaczają wartości stałych w reakcji z L-tyrozyną o naturalnym składzie izotopowym, z indeksem C – wartości parametrów w reakcji z [2-^{14}C]-L-tyrozyną, z indeksem H – dla reakcji z [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyną. [S] i [E] to początkowe stężenia substratu i enzymu; f to stopień przereagowania, t to czas reakcji, a p oznacza prawdopodobieństwo reprotonacji kompleksu EQ oderwanym trytonem.

Podczas konstrukcji powyższych równań założyłem, że KIE trytu w pozycji 2 obserwuję tylko na stałych k_2 i k_{-2} jako, że produkty przejściowe powstałe po oderwaniu trytu są identyczne z tymi tworzonymi przez substrat nieznakowany, dlatego też nie należy się spodziewać efektu izotopowego na pozostałych stałych szybkości reakcji cząstkowych, również na eliminacji fenolu, gdyż zmierzony przez mnie stopień przeniesienia trytu z pozycji 2 na fenol jest zaniedbywalnie mały (mniejszy od 0.9%).

Wyprowadzając równanie na KIE ^{1}H/^{3}H w pozycji 3*S* założyłem, że duży efekt izotopowy w tym miejscu cząsteczki może istnieć tylko na stałą k_4, albowiem nie zaobserwowałem znaczącego KIE deuteru na szybkość początkową opisywaną równaniem (22), a doświadczenia z fenolem jako inhibitorem reakcji potwierdziły istnienie dużego KIE deuteru tylko na k_4. Dlatego przyjąłem, że pozostałe stałe szybkości reakcji cząstkowych dla [3*S*-^{3}H]-L-tyrozyny są takie same, jak podczas reakcji z izotopologiem protowym.

Podobnie można skorzystać z równań 25 i 26, aby policzyć stałe szybkości reakcji cząstkowych dla reakcji w wodzie deuterowanej.

Aby wyznaczyć stałe szybkości reakcji z uzyskanych przez mnie danych eksperymentalnych używając zaproponowanego powyżej modelu kinetycznego reakcji należy przeprowadzić równoległą optymalizację szukanych parametrów do przedstawionych równań. Są one zbyt skomplikowane, aby użyć standardowego oprogramowania stosowanego do fitowania danych. Rozwiązaniem problemu może być napisanie specjalnego programu, który umożliwi wspomnianą optymalizację parametrów reakcji katalizowanej przez TPL.

3.2.5. Perspektywy badania mechanizmu działania fenololiazy tyrozynowej

Przeprowadzone przeze mnie pionierskie badania nad mechanizmem działania TPL odpowiedziały na niektóre stawiane wcześniej pytania, ale także otworzyły nowe kwestie dotyczące badanego procesu:

1. napisanie odpowiedniego oprogramowania pozwalającego na analizę parametrów reakcji za pomocą wyprowadzonych przeze mnie równań;
2. wyznaczenie KIE ^{12}C/^{14}C w pozycjach 3 i 1' L-tyrozyny z większej ilości pomiarów;

3. wyznaczenie konkurencyjnych KIE $^{2}H/^{3}H$ w pozycji 2 w wodzie i w wodzie deuterowanej, co powinno pozwolić na lepsze poznanie procesu deprotonacji i wpływu rozpuszczalnika w badanej reakcji;
4. pomiar KIE wodoru w pozycji 3*S* metodą konkurencyjną radiometrycznie (używając różnych kombinacji znaczników wodorowych), jak i za pomocą spektroskopii, celem głębszego wglądu w zmiany efektu w tej pozycji. Podobnie należy zbadać wpływ rozpuszczalnika na KIE w pozycji 3 wyznaczone metodą konkurencyjną i niekonkurencyjną;
5. badanie stałych inhibicji fenolem reakcji z L-tyrozyną znakowaną deuterem w pozycji 2 i 3 katalizowanej przez TPL w wodzie i w wodzie deuterowanej celem zbadania wpływu rozpuszczalnika na stałą inhibicji mieszanej;
6. badanie KIE trytu w różnych pozycjach cząsteczki L-tyrozyny w obecności różnych stężeń inhibitorów ulegających *β*-eliminacji (np. *S*-metylo-L-cysteina), jak i nie ulegających temu procesowi (np. L-fenyloalanina);
7. wpływ produktów przejściowych i ich analogów na wartości KIE.

Jestem przekonany, że fenololiaza tyrozynowa będzie jeszcze niejednokrotnie przedmiotem bardzo ciekawych badań mechanistycznych.

4. PODSUMOWANIE

W ramach wykonanej przeze mnie pracy udało się osiągnąć zamierzone cele.

Zsyntetyzowałem 4 L-tyrozyny znakowane ^{14}C, 3 L-tyrozyny znakowane deuterem i 4 L-tyrozyny znakowane trytem łącząc metody chemiczne i enzymatyczne. Uprzednio zoptymalizowałem warunki syntezy i wypróbowałem również inne metody otrzymywania znakowanych L-tyrozyn.

Otrzymałem L-tyrozynę znakowaną węglem-14 w czterech pozycjach:

- [1-^{14}C]-L-tyrozynę z K^{14}CN poprzez pośrednie produkty kwas [1-^{14}C]-malonowy, kwas [1-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy i [1-^{14}C]-L-fenyloalaninę;
- [2-^{14}C]-L-tyrozynę z kwasu [2-^{14}C]-malonowego poprzez kwas [2-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy i [2-^{14}C]-L-fenyloalaninę;
- [3-^{14}C]-L-tyrozynę z alkoholu [1-^{14}C]-benzylowego poprzez kwas [3-^{14}C]-(*E*)-cynamonowy i [3-^{14}C]-L-fenyloalaninę;
- [1'-^{14}C]-L-tyrozynę z kwasu [2-^{14}C]-malonowego poprzez [2-^{14}C]-malonian dietylu, [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesan etylu, kwas [1'-^{14}C]-*p*-hydroksybenzoesowy i [4'-^{14}C]-fenol.

Uzyskałem jako pierwszy [2-^{14}C]-, [3-^{14}C]- i [1'-^{14}C]-L-tyrozynę używając pionierskiej metody syntezy przez kondensację Knoevenagela prowadzącą do kwasu cynamonowego, enzymatyczną addycję amoniaku i utlenianie otrzymanej L-fenyloalaniny do L-tyrozyny znakowanej w części alifatycznej. Podobnie nowa była zastosowana przez mnie strategia syntezy [1'-^{14}C]-L-tyrozyny.

Otrzymałem L-tyrozynę znakowaną deuterem w trzech pozycjach:

- [2-^{2}H]-L-tyrozynę dwiema metodami enzymatycznymi: poprzez wymianę protonu w pozycji *α*, oraz z fenolu i *S*-metylo-L-cysteiny stosując wodę deuterowaną jako rozpuszczalnik;
- [3*S*-^{2}H]-L-tyrozynę przyłączając enzymatycznie amoniak do kwasu (*E*)-*p*-kumarowego w wodzie deuterowanej;
- [3*R*-^{2}H]-L-tyrozynę z kwasu [3-^{2}H]-(*E*)-cynamonowego poprzez [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaninę.

Syntezy [2-^{2}H]-L-tyrozyny z udziałem tryptofanazy, [3*S*-^{2}H]-L-tyrozyny z udziałem amoniakoliazy fenyloalaninowej i [3*R*-^{2}H]-L-tyrozyny przez addycję amoniaku i enzymatyczne utlenianie otrzymanej [3*R*-^{2}H]-L-fenyloalaniny zostały przeprowadzone po raz pierwszy.

Otrzymałem również L-tyrozynę znakowaną trytem w czterech pozycjach:

- [2-^{3}H]-L-tyrozynę dwiema metodami: poprzez enzymatyczną wymianę protonu w pozycji *α*, oraz z wody trytowej poprzez kwas [2-$^{3}H_2$]-malonowy, kwas [2-^{3}H]-(*E*)-cynamonowy oraz [2-^{3}H]-L-fenyloalaninę;
- [3*S*-^{3}H]-L-tyrozynę dwiema metodami: poprzez enzymatyczną addycję amoniaku do kwasu (*E*)-*p*-kumarowego w wodzie trytowej, oraz w wyniku podobnej reakcji z kwasem (*E*)-cynamonowym przez [3*S*-^{3}H]-L-fenyloalaninę;
- [3*R*-^{3}H]-L-tyrozynę z kwasu [3-^{3}H]-(*E*)-cynamonowego przez [3*R*-^{3}H]-L-fenyloalaninę;
- [2',6'-$^{3}H_2$]-L-tyrozynę dwiema metaodami: przez utlenianie [2',6'-$^{3}H_2$]-L-fenyloalaniny, oraz z wody trytowej przez [$^{3}H_5$]-fenol i [3,5-$^{3}H_2$]-fenol.

Otrzymałem jako pierwszy [3*R*-^{3}H]-, [3*S*-^{3}H]- i [2',6'-$^{3}H_2$]-L-tyrozynę.

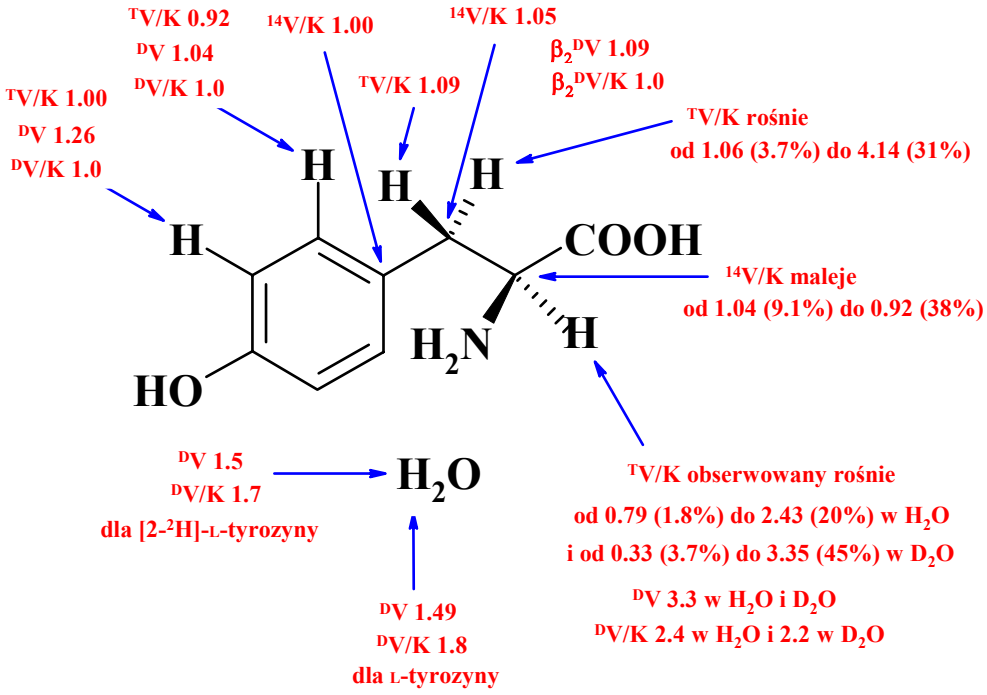
Używając nowatorskiej strategii syntetycznej takiej, jak dla znaczników węglowych w pozycjach alifatycznych alifatycznych L-tyrozyny, otrzymałem [2-^{3}H]-, [3*R*-^{2}H]-, [3*R*-^{3}H]-, [1-^{14}C,3*S*-^{3}H]- i [2',6'-^{3}H]-L-tyrozynę. Nowością są też metody syntezy L-tyrozyny znakowanej trytem w pozycji 2 za pomocą tryptofanazy, oraz w pozycji 3*S* z kwasu (*E*)-*p*-kumarowego, podobnie jak enzymatyczna synteza [2',6'-^{3}H]-L-tyrozyny z odpowiednio znakowanego fenolu otrzymanego przez katalityczną wymianę protonów aromatycznych fenolu z wodą.

Opracowane i wykonane przez mnie syntezy znakowanej L-tyrozyny mogą w przyszłości znaleźć istotne zastosowanie w badaniach biochemicznych, a także medycznych. Po odpowiednich modyfikacjach mających na celu skrócenie i uproszczenie procedur syntetycznych mogą zostać użyte w syntezie związków znakowanych izotopami krótkożyciowymi stosowanymi w tomografii pozytonowej.

Otrzymane przez mnie związki użyłem następnie w badaniach mechanizmu działania fenololiazy tyrozynowej z *Citrobacter freundii* stosując do tego celu kinetyczne efekty izotopowe węgla i wodoru. Wyznaczyłem 3 efekty $^{12}C/^{14}C$, 16 efektów deuteru i 8 efektów trytu. Schemat 51 przedstawia uzyskane przeze mnie wyniki. V i V/K oznaczają, odpowiednio, KIE na k_{cat} i k_{cat}/K_m. Indeksy górne T, D i 14 oznaczają, odpowiednio KIE $^{1}H/^{3}H$, $^{1}H/^{2}H$ i $^{12}C/^{14}C$.

Efekty $^{12}C/^{14}C$ w pozycjach 2, 3, 1', i efekty $^{1}H/^{3}H$ (dla aromatycznych atomów wodoru także w obecności inhibitorów TPL) określiłem metodą konkurencyjną stosując podwójne znakowanie. Efekty $^{1}H/^{2}H$ wyznaczyłem metodą niekonkurencyjną poprzez pomiar parametrów kinetycznych reakcji (k_{cat} i k_{cat}/K_m, a także stałej inhibicji fenolem dla reakcji z L-tyrozyną w wodzie i w wodzie ciężkiej, i z [3-$^{2}H_2$]-L-tyrozyną w wodzie) dla substratu nieznakowanego i znakowanego deuterem. Wyznaczyłem efekty izotopowe we wszystkich

pozycjach wodoru w cząsteczce L-tyrozyny. Podobnie określiłem również efekty rozpuszczalnikowe $^{1}H/^{2}H$ dla L-tyrozyny i [2-^{2}H]-L-tyrozyny.



Schemat 51. Kinetyczne efekty izotopowe w reakcji TPL z L-tyrozyną

Efekty $^{12}C/^{14}C$ w pozycjach 1, 2,3, 1', i $^{1}H/^{3}H$ określiłem metodą konkurencyjną stosując podwójne znakowanie. Efekty $^{1}H/^{2}H$ wyznaczyłem metodą niekonkurencyjną poprzez pomiar parametrów kinetycznych reakcji (k_{cat} i k_{cat}/K_m) dla substratu nieznakowanego i znakowanego deuterem. Wyznaczyłem efekty we wszystkich pozycjach wodoru w cząsteczce L-tyrozyny. Podobnie określiłem również efekt rozpuszczalnikowy $^{1}H/^{2}H$.

W mojej pracy po raz pierwszy udało się określić efekt $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2, oraz wykonać wstępne pomiary podobnego efektu w pozycjach 3 i 1' w badanej reakcji. Po raz pierwszy także określiłem efekty trytu dla wszystkich pozycji wodoru w L-tyrozynie. Efekty deuteru także zostały wyznaczone po raz pierwszy poza efektem w pozycji 2.

Wykonane przez mnie badania zaowocowały bardzo ciekawymi obserwacjami, albowiem stwierdziłem:

- zmianę efektu izotopowego trytu z postępem reakcji w pozycjach 2 i 3*S*, podobną zmianę KIE $^{12}C/^{14}C$ w pozycji 2;
- szybką wymianę protonu w pozycji 2 z rozpuszczalnikiem tylko w początkowych etapach reakcji;

- niewielki transfer trytu z pozycji 2 na aromatyczny atom węgla tworzącego się w reakcji fenolu;
- niezależność efektów rozpuszczalnikowego i w pozycji 2 od siebie $^{1}H/^{2}H$ świadczącą o tym, że zarówno rozpuszczalnik oraz atom wodoru w pozycji 2 są zaangażowane w tworzenie tego samego stanu przejściowego reakcji;
- większe znaczenie oderwania protonu z pozycji 2, niż jego wymiany z rozpuszczalnikiem dla szybkości reakcji;
- asymetrię zachowania się KIE trytu w pozycji 3*R* i 3*S*;
- odrywanie protonów z pozycji 3 po zajściu eliminacji fenolu;
- istnienie dużego KIE w pozycji 3*S* na etapie tworzenia produktów z α-aminoakrylanu;
- brak istotnego wpływu wody na szybkość końcowych etapów reakcji;
- pewne znaczenie wodoru w pozycji 3',5' dla dysocjacji kompleksu enzym – produkt;
- wpływ inhibitorów kompetycyjnych na wielkość efektu izotopowego trytu w pierścieniu aromatycznym; taki KIE zmienia się w podczas reakcji.

Na podstawie obserwacji zaproponowałem kinetyczny model reakcji. Bazując na zaproponowanym modelu użyłem pomiarów kinetyki w obecności inhibitora i jednocześnie produktu reakcji fenolu do wyznaczenia niektórych parametrów reakcji.

Moja praca pozwoliła wyjaśnić niektóre zagadnienia dotyczące reakcji enzymatycznego rozkładu tyrozyny katalizowanego przez fenololiazę tyrozynową, ale również nasunęła wiele kolejnych pytań dotyczących tego tematu, co rysuje ciekawe perspektywy w dalszych badaniach mechanizmu tej reakcji.

BIBLIOGRAFIA

F. W. Alexander; E. Sandmeier; P. K. Mehta; P. Christen; *Eur. J. Biochem.*, 953-960, **219** (3), 1994.

W. J. Albery; *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 227-263, **31**, 1980.

A. Antson; B. V. Strokopytov; G. N. Murshudov; M. N. Isupov; E. H. Harutyunyan; T. V. Demidkina; D. G. Vassylyev; Z. Dauter; H. Terry; K. S. Wilson; *FEBS Lett.*, 256-260, **302**, 1992.

A. Antson; T. V. Demidkina; P. Gollnick; Z. Dauter; R. L.Von Tersch; J. Long; S. N. Berezhnoy; R. S. Phillips; E. H. Harutyunyan; K. S. Wilson; *Biochemistry*, 4195-4206, **32**, 1993.

S. Aronoff; „Techniques of Radiobiochemistry", 189, Iowa State College Press, Ames, Iowa, USA, 1957.

Y. Asano; J. J. Lee; T. L. Shieh; F. Spreafico; C. Kowal; H. G. Floss; *J. Am. Chem. Soc.*, 4314-4320, 107 (14), 1985.

W. Augustyniak; R. Kański; M. Kańska; *J. Lab. Compd. Radiopharm.*, 553-560, **44**, 2001a.

W. Augustyniak; J. Bukowski; J. Jemielity; R. Kański; M. Kańska; *J. Radioanal. Nucl. Chem.*; 371-374, **247**(2), 2001b.

W. Augustyniak; P. Suchecki; J. Jemielity; R. Kański; M. Kańska; *J. Lab. Compd. Radiopharm.*, 553-560, **45**, 2002.

W. Augustyniak; P. Suchecki; J. Jemielity; R. Kański; M. Kańska; *Syntheses and Applications of Isotopically Labeled Compounds*, 2004, w druku.

B. S. Axelsson; P. Bjurling; O. Matsson; B. Langstrom; *J. Am. Chem. Soc.*, 1502-1503, **114**, 1992.

Q. Bai; R. L. Somerville; *J. Bacteriol.*, 6173-6186, **180**, 1998.

J. E. Baldwin; R. L. Dyer; C. Si; A. J. Pratt; M. A. Russel; *Tetrahedron Lett.*; 3745-3746, **28**, 1987.

M. V. Barbolina; R. S. Phillips; P. D. Gollnick; N. G. Faleev; T. V. Demidkina; *Prot. Eng.*, 207-215, **13** (3), 2000.

A. R. Battersby; E. J. Chrystal; J. Staunton; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 31-42, 1980.

N. P. Bazhulina; Y. V. Morozov; A. I. Papisova; T. V. Demidkina; *Eur. J. Biochem.*, 1830-1836, **267**, 2000.

A. J. Bennett; M. L. Sinnott; *J. Am. Chem. Soc.*, 7287-7294, **108**, (23) 1986.

J. Beyer; S. Lang-Fugmann; A. Mühlbauer; W. Steglich; *Synthesis*, 1047-1051, 1998.

P. Bjurling; G. Antoni; Y. Watanabe; B. Langstrom; *Acta Chem. Scand.*, 178-182, **44** (2), 1990a.

P. Bjurling; Y. Watanabe; S. Oka; T. Nagasawa; H. Yamada; B. Langstrom; *Acta Chem. Scand.*, 183-188, **44** (2), 1990b.

N. Brot; Z. Smit; H. Weissbach; *Arch. Biochem Biophys.*; 1-6, **112**, 1965.

N. Brot; H. Weissbach; *Methods in Enzymology*, 642, **17A**, 1970.

J. Bukowski; J. Szul; R. Kański; M. Kańska; *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 635, **243**, 2000.

J. Bukowski, Praca doktorska, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, 2001.

H. Chen; R. S. Phillips; *Biochemistry*, 11591-11599, **32**, 1993.

H. Chen; P. Gollnick; R. S. Phillips; *Eur. J. Biochem.*, 540-549, **229**, 1995a.

H. Chen; T. V. Demidkina; R. S. Phillips; *Biochemistry*, 12276-12283, **34**, 1995b.

W. W. Cleland; wykład podczas Gordon Research Conference on Isotopes in Biological and Chemical Sciences, Ventura, USA, luty 2004.

P. F. Cook; N. J. Oppenheimer; W. W. Cleland; *Biochemistry*, 1817-1825, **20**, 1981.

P. F. Cook; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 203-245, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

T. V. Demidkina; I. V. Myagkikh; A. V. Azhayev; *Eur. J. Biochem.*, 311-316, **170**, 1987.

T. V. Demidkina; I. V. Myagkikh; *Biochimie*, 565-571, **71**, 1989.

T. V. Demidkina; M. V. Barbolina; N. G. Faleev; B. Sundararaju; P. D. Gollnick; R. S. Phillips; *Biochem. J.*, 745-752, **363**, 2002.

R. K. Dua; E. W. Taylor; R. S. Phillips; *J. Am. Chem. Soc.*, 1264-1270, **115**, 1993.

S. Duffey; M. Blum; *Insect Biochem.*, 57-65, **7**, 1977.

S. Duffey; J. Aldrich; M. Blum; *Comp. Biochem. Physiol.*, 101-102, **56B**, 1977.

G. W. Elmer; C. Linden; G. G. Meadows; *Cancer Treat. Rep.*, 1055-1062, **63**(6), 1979.

H. Enei; H. Matsui; K. Yamashita; S. Okumura; H. Yamada; *Agr. Biol. Chem*, 1861-1868, **36**, 1972.

H. Enei; K. Yamashita; S. Okumura; H. Yamada; *Agr. Biol. Chem.*, 485-492, **37**, 1973.

N. G. Faleev; M. S. Sadovnikova; N. S. Martinkowa, V. M. Belikov; *Enzyme Microb. Technol.*, 219-224, **3**, 1981.

N. G. Faleev; S. B. Ruvinov; T. V. Demidkina; I. V. Myagkikh; M. Y. Gololobov; V. I. Bakhmutov; V. M. Belikov; *Eur. J. Biochem.*, 395-401, **177**, 1988.

N. G. Faleev; S. N. Spirina; T. V. Demidkina; R. S. Phillips; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001-2004, 1996a.

N. G. Faleev; S. N. Spirina; V. S. Ivoilov; T. V. Demidkina; R. S. Phillips; *Zeitschrift für Naturforschung*, 363-370, **51**, 1996b.

N. G. Faleev; Y. N. Zhukov; E. N. Khurs; O. I. Gogoleva; M. V. Barbolina; N. P. Bazhulina; V. M. Belikov; T. V. Demidkina; R. M. Khomutov; *Eur. J. Biochem.*, 6897-6902, **267**, 2000.

N. G. Faleev; O. V. Axenova; T. V. Demidkina; R. S. Phillips; *Biochim. Biopys. Acta*, 260-265, **1647**, 2003.

K. J. Fasth; B. Langstrom; *Acta Chem. Scand.,* 720-725, **44** (7), 1990.

F. Foor; N. Morin; K. A. Bostian; *Appl. Environ. Microbiol.*, 3070-3075, **59**, 1993.

S. Fukui; S. Ikeda; M. Fuijmura; H. Yamada; H. Kumagai; *Eur. J. Biochem*, 155-165, **51**, 1975.

E. D. German; A. M. Kuznetsov; R. R. Dogonadze; *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1128, **76**, 1980.

K. L. Grant; J. P. Klinman; *Biochemistry*, 6597-6605, **28**, 1989.

J. D. Hermes; C. A. Roeske; M. H. O'Leary; W. W. Cleland; *Biochemistry*, 5106-5114, **21**, 1982.

T. Hirahara; S. Horinouchi; T. Beppu; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 341-346, **39**, 1993.

J. M. Hoffman; A. M. Smith; C. S. Rooney; T. E. Fisher; J. S. Wai; C. M. Thomas; D. L. Bamberger; J. L. Barnes; T. M. Williams; J. H. Jones; B. D. Olson; J. A. O'Brien;

M. E. Goldman; J. H. Nunberg; J. C. Quintero; W. A. Schleif; E. A. Emini; P. S. Anderson; *J. Med. Chem*., 953-966, **36**, 1993.

W. P. Huskey; R. L. Schowen; *J. Am. Chem. Soc.*, 5704-5706, **105**, 1983.

A. Ikeda; H. Hara; S. Sugimoto; S. Fukui; *FEBS Lett.*, 307-311, **56**(2), 1975.

S. Iwamori; T. Oikawa; K. Ishiwata; N. Makiguchi; *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 77-85, **16**, 1992.

J. Jemielity, Praca doktorska, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, 2001.

S. Kaneko; K. Ishiwata; K. Hatano; H. Omura; K. Ito; M. Senda; *Appl. Radiat. Isot.*, 1025-1032, **50,** 1999.

T. Katayama; H. Suzuki; T. Koyanagi; H. Kumagai; *Appl. Environ. Microbiol.*, 4764-4771, **66**, 2000.

T. Katayama; H. Suzuki; K. Yamamoto; H. Kumagai; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1823-1827, **63**, 1999.

S. Kaufman w „Methods in Enzymology", 809-816, vol. 5, S. P. Colowick; N. O. Kaplan (Eds); Academic Press, New York and London, 1962.

D. M. Kiick; R. S. Phillips; *Biochemistry*, 7333-7338, **27**, 1988.

K. Kim; P. A. Cole; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1205-1208, **9**, 1999.

G. W. Kirby; J. Michael; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 115-120, 1973.

M. Kozłowska, Praca magisterska, Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego, 2003.

H. Kumagai; N. Kashima; H. Yamada; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 796-801, **39** (5), 1970a.

H. Kumagai; H. Yamada; H. Matsui; H. Ohkishi; K. Ogata; *J. Biol. Chem.*; 1767-1772, **245**, 1970b.

H. Kumagai; H. Yamada; H. Matsui; H. Ohkishi; K. Ogata; *J. Biol. Chem.*; 1773-1777, **245**, 1970c.

H. Kumagai; H. Kashima; H. Yamada; H. Enei; S. Okumura; *Agr. Biol. Chem.*, 472-482, **36**, 1972.

H. Kumagai; H. Yamada; F. Masugi; S. Fukui; *Biochem. Biophys. Acta*, 510-514, **327**, 1973.

H. Kumagai; T. Utagawa; H. Yamada; *J. Biol. Chem.*, 1661-1667, **250**, 1975.

M. B. Kupletskaia; *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 827-831, 15(6), 1979.

S. G. Lee; S. P. Hong; Y. H. Choi; Y. J. Chung; M. H. Sung; *Protein Expr. Purif.*, 263-70, **11**(3), 1997.

L. C. Kurz; C. Freiden; *J. Am. Chem. Soc.*, 4198-4203, **102**, 1980.

B. L. Lewis; V. L. Schramm; *J. Am. Chem. Soc.*, 4785-4798, **125**, 2003.

I. Lloyd-George; T. M. Chang; *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.*, 323-333, **21**, 1993.

G. M. Loudon; A. S. Radhakrishna; M. R. Almond; J. K. Blodgett; R. H. Boutin; *J. Org. Chem.*, 4272-4276, **49**, 1984.

S. S. Makarchenka; A. S. Moskal'chuk; V. V. Glushkova; T. I. Kogai; L. G. Polyakova; *Ibid.*, 1246, **11**, 1975.

I. I. Maletina; V. V. Orda; L. M. Yagupol'shii; *J. Org. Chem. (USSR)*, 294, **10**, 1974.

S. Massarrat; *Natur*e, 508-509, 206(983), 1965.

J. T. McFarland; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 73-126, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

D. McKenzie; D. A. Robb; *FEMS Microbiol. Lett.*, 255-258, **9**, 1980.

G. G. Meadows; J. DiGiovanni; L. Minor; G. W. Elmer; *Cancer Res.*, 167-171, **36**(1), 1976.

G. G. Meadows; L. Boze; G. W. Elmer; *J. Pharm. Sci.*, 1503-1505, **66**(10), 1977.

G. G. Meadows; G. S. Cantwell; *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 535-45, **30**(3), 1980.

L. Melander; W. H. Saunders, Jr.; Reaction Rates of Isotopic Molecules, John Wiley & Sons, New York, 1980.

S. Milstien; S. Kaufman; *J. Biol. Chem.*; 4777-4781, **250**(12), 1975.

B. Mouratou; P. Kasper; H. Gehring; P. Christen; *J. Biol. Chem.*, 1320-1325, **274**, 1999.

T. Muro; H. Nakatani; K. Hiromi; H. Kumagai; H. Yamada; *Eur. J. Biochem.*, 633-640, **84**, 1978.

A. Murray, III; D. L. Williams; „Organic Syntheses with Isotopes", 438, part 1, Interscience Publishers, Inc., New York, 1958.

T. Nagasawa; T. Utagawa; J. Goto; C. J. Kim; Y. Tani; H. Kumagai; H. Yamada; *Eur. J. Biochem.*, 33-40, **117**, 1981.

T. Nagasawa; T. Ishii; H. Yamada; *FEMS Microbiol. Lett.*, 269-272, **30**, 1985.

K. Nishiyama; M. Oba; R. Ueno; A. Morita; Y. Nakamuro; M. Kainosho; *J. Lab. Compd. Radiopharm.*, 831-838, **34** (9), 1994.

D. B. Northrop; *Biochemistry*, 2644-2651, **14**, 1975.

D. B. Northrop; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 182-202, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

D. B. Northrop; K. R. Rebholz; K. M. Bencke Marti; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 182-202, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

L. N. Owen; P. A. Robins; *J. Chem. Soc.*, 326-333, 1949.

M. M. Palcic, S. J. Shen; E. Schleicher; H. Kumagai; S. Sawada; H. Yamada; H. G. Floss; *Z. Naturforsch.*, 707-318, **42c**, 1987.

P. Paneth; *J. Am. Chem. Soc.*, 7070-7071, **107**, 1985.

H. S. Park; J. Y. Lee; H. S. Kim; *Biotechnol. Bioeng.*, 339-343, **58**, 1998.

J. S. Park; M. Enoki; A. Ohbu; K. Fan; K. Niki; *J. Mol. Struct.*, 343-353, **242** (1), 1991.

V. Parker; wykład podczas Gordon Research Conference on Isotopes in Biological and Chemical Sciences, Ventura, USA, luty 2004.

D. W. Parkin; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 269-290, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

R. S. Phillips; *Arch. Biochem. Biophys.*, 302-310, **256**, 1987.

R. S. Phillips; K. Ravichandran; R. Von Tersch; *Enzyme Microb. Technol.*, 80-83, **11**, 1989.

R. S. Phillips; R. L. von Tersch; F. Secundo; *Eur. J. Biochem.*, 658-663, **244**, 1997.

R. S. Phillips; T. V. Demidkina; L. N. Zakomirdina; S. Bruno; L. Ronda; A. Mozzarelli; *J. Biol. Chem.*, 21592-21597, **277** (24), 2002.

R. S. Phillips; T. V. Demidkina; N. G. Faleev; *Biochim. Biopys. Acta*, 167-172, **1647**, 2003.

H. F. Pierson; G. G. Meadows; *Biochim Biophys Acta.*, 177-186, **676**(2), 1981.

S. V. Pletnev; M. N. Isupov; Z. Dauter; K. S. Wilson; N. G. Faleev; E. G. Harutyunyan; T. V. Demidkina; *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 37-42, **38**, 1996.

J. A. Profitt; D. S. Watt; *J. Org. Chem.*, 127-128, **40**, 1975.

D. M. Quinn; L. D. Sutton; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 331-338, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

A. S. Radhakrishna; M. E. Parham; R. M. Riggs; G. M. Loudon; *J. Org. Chem.*, 1746-1747, **44**, 1979.

P. Rapp; H. Kumagai; H. Yamada; T. Ueno; H. Fukami; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 241-247, **64**(1), 1975.

W. H. Saunders; *J. Am. Chem. Soc.*, 164-169, **107**, 1985.

S. Sawada; H. Kumagai; H. Yamada; R. K. Hill; *J. Am. Chem. Soc.,* 4334-4337, **97** (15), 1975.

H. Q. Smith; R. L. Somerville; *J. Bacteriol.*, 5914-5921, **179**, 1997.

P. G. Strange; J. Staunton; H. R. Wiltshire; A. R. Battersby; K. R. Hanson; E. A. Havir; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 3545, 1972

B. Sundararaju; A. A. Antson; R. S. Phillips; T. V. Demidkina; M. V. Barbolina; P. Gollnick; G. Guy Dodson; K. S. Wilson; *Biochemistry*, 6502-6510, **36**, 1997.

A. Sundararaju; H. Chen; S. Shilcutt; R. S. Phillips; *Biochemistry*, 8546-8555, **39**, 2000.

H. Suzuki; T. Katayama; K. Yamamoto; H. Kumagai; *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2339-2341, **59**, 1995.

G. Swain; E. C. Stivers; J. F. Reuwer, Jr.; L. J. Schaad; *J. Am. Chem. Soc.*, 5885-5893, **80**, 1958.

K. Swaminathan; N. Venkatasubramanian; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II*, 1161-1166, 1975.

R. A. Swaringen Jr.; D. A. Yeowell; J. C. Wisowaty; H. A. El-Sayad; E. L. Stewart; M. E. Darnofall; *J. Org. Chem.*, 4825-4829, **44**, 1979.

M. Toney; wykład podczas International Isotope Effects Conference, Uppsala, Szwecja, czerwiec 2003.

J. T. Tong; P. E. Yankwich; *J. Phys. Chem.*, 540-543, **61**, 1964.

G. Truhlar; W. L. Haase; J. T. Hynes; *J. Phys. Chem.*, 2664-2682, **87**, 1983.

S. Udenfriend; J. R. Cooper; *J. Biol. Chem.*, 227-233, **196**, 1952.

K. I. Voivodov; N. N. Zueva; V. I. Iakovleva; I. V. Berezin; *Prikl Biokhim Mikrobiol.*, 192-198, **23**(2), 1987.

T. E. Walker; C. Matheny; C. B. Storm; H. Hayden; *J. Org. Chem.*, 1175-1179, **51** (8), 1986.

Y. Watanabe; K. Suzuki; H. Tsukada; S. Oka; T. Nagasawa; H. Yamada; P. Bjurling; B. Langstrom; O. Inoue; *Acta Radiol. Suppl.*, 110-111, **376**, 1991.

E. B. Watkins; R. S. Phillips; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2099-2100, **11**, 2001a.

E. B. Watkins; R. S. Phillips; *Biochemistry*, 14862-14868, **40**, 2001b.

P. M. Weiss; w "Enzyme Mechanism from Isotope Effects", 291-312, P. F. Cook (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston, London, 1991.

G. Wells; A. Seaton; M. F. G. Stevens; *J. Med. Chem.*, 1550-1562, **43**, 2000.

N. H. Werstiuk w „Isotopes in the Physical and Biomedical Sciences", 131, vol. 1, E. Buncel; J. R. Jones (Eds); Elsevier, Amsterdam-Oxford-New York-Tokyo, 1987.

H. Yamada; H. Kumagai; N. Kashima; H. Torii; H. Enei; S. Okumura; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 370-374, **46**, 1972.

M. Yokoyama; T. Sugai; H. Ohta; *Tetrahedron: Asymmetry*, 1081-1084, **4**, 1993.

DOROBEK NAUKOWY AUTORA ROZPRAWY

Wyniki uzyskane podczas wykonywania pracy stanowią podstawę 7. publikacji, oraz były prezentowane jako wystąpienia ustne i plakaty, łącznie w postaci 8. komunikatów na konferencjach międzynarodowych, oraz 7. komunikatów na konferencjach krajowych.

Publikacje

1. R. Lipinski, **W. Augustyniak**, R. Kanski, M. Kanska, *Kinetic isotope effects in the studies of the mechanism of action of L-tyrosine phenol lyase,* Annals of Polish Chemical Society, 3-5, 2 (1), 2003.
2. **W. Augustyniak**, P. Suchecki, J. Jemielity, R. Kański, M. Kańska, *Syntheses of tritium labelled isotopomers of L-tyrosine*, J. Label. Compd. Radiofarm., 45, 559-567, 2002.
3. **W. Augustyniak**, R. Kański. M. Kańska, *Synthesis of carbon-14 labeled [1-^{14}C]-, and [2-^{14}C]-L-tyrosine,* J. Label. Compd. Radiofarm., 44, 553-560, 2001.
4. **W. Augustyniak**, J. Bukowski, J. Jemielity, R. Kański, M. Kańska, *Enzymatic synthesis of carbon-14 labeled isotopomers of L-phenylalanine,* J. Radioanal. Nucl. Chem., 247, 371-374, 2001.
5. **W. Augustyniak**, R. Kanski, M. Kanska, *Hydrogen kinetic isotope effects in the studies of the mechanism of action of L-tyrosine phenol lyase*, Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds, 2004, w druku.
6. **W. Augustyniak**, P. Suchecki, R. Kanski, M. Kanska, *Syntheses of carbon and hydrogen isotopomers of L-tyrosine*, Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds, 2004, w druku.
7. M. Kanska, E. Boroda, **W. Augustyniak**, R. Kanski, *Enzymatic syntheses of aromatic amino acids labeled with carbon and hydrogen isotopes*, Synthesis and Application of Isotopically Labelled Compounds, 2004, w druku.

Komunikaty

Konferencje międzynarodowe

1. **W. Augustyniak,** R. Kanski, M. Kanska, *Studies of the mechanism of action of L-tyrosine phenol-lyase*, Gordon Research Conference on Isotopes in Biological & Chemical Sciences, Ventura, USA, luty 2004.
2. **W. Augustyniak**, E. Boroda, M. Kozlowska, R. Kanski, M. Kanska, *Syntheses of isotopomers of aromatic L-amino acids*, Gordon Research Conference on Isotopes in Biological & Chemical Sciences, Ventura, USA, luty 2004.
3. **W. Augustyniak**, R. Kanski, M. Kanska, *Hydrogen kinetic isotope effects in the studies of the mechanism of action of L-tyrosine phenol lyase,* International Isotope Effects Conference, Uppsala, Szwecja, czerwiec 2003.
4. **W. Augustyniak**, R. Kanski, M. Kanska, *Hydrogen kinetic isotope effects in the studies of the mechanism of action of L-tyrosine phenol lyase*, 8th International Symposium on The Synthesis and Application of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, Boston, USA, czerwiec 2003.

5. **W. Augustyniak**, P. Suchecki, R. Kanski, M. Kanska, *Syntheses of carbon and hydrogen isotopomers of L-tyrosine*, 8th International Symposium on The Synthesis and Application of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, Boston, USA, czerwiec 2003.
6. M. Kanska, E. Boroda, **W. Augustyniak**, R. Kanski, *Enzymatic syntheses of aromatic amino acids labeled with carbon and hydrogen isotopes*, 8th International Symposium on The Synthesis and Application of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds, Boston, USA, czerwiec 2003.
7. **W. Augustyniak**, M. Kanska, R. Kanski, *Kinetic isotope effects in enzymatic decomposition of L-tyrosine*, 223rd American Chemical Society Meeting, Orlando, USA, kwiecień 2002.
8. M. Kanska, **W. Augustyniak**, R. Kanski, *Enzymatic Synthesis of Multilabeled L-Tyrosine,* 220th National American Chemical Society Meeting, Washington D.C., USA, sierpień 2000.

Konferencje krajowe

1. **W. Augustyniak**, R. Kański, M. Kańska, *Kinetyczne efekty izotopowe wodoru w badaniach mechanizmu działania liazy L-tyrozyna fenol*, XLVI Zjazd PTChem i SITPChem, Lublin, Polska, wrzesień 2003.
2. **W. Augustyniak**, M. Kańska, R. Kański, *Kinetyczne efekty izotopowe $^{1}H/^{3}H$ w reakcji rozkładu L-tyrozyny katalizowanego przez liazę tyrozyna-fenol*, XLV Zjazd PTChem i SITPChem, Kraków, Polska, wrzesień 2002.
3. C. A. Schortinghuis, M. K. S. Vink, **W. Augustyniak**, H. E. Schoemaker, F. L. van Delft, F. P. J. T. Rutjes, *Nitrile Hydrolyzing Enzymes in the Synthesis of Enantiopure Building Blocks*, Studiegroep Ontwerp en Synthese, Lunteren, Holandia, październik 2001.
4. **W. Augustyniak**, P. Suchecki, R. Kański, M. Kańska, *Kinetyczne efekty izotopowe trytu w reakcji eliminacji katalizowanej przez β–tyrozynazę*, Krajowa Konferencja Radiochemiczna, Kazimierz Dolny, maj 2001.
5. **W. Augustyniak**, R. Kański, M. Kańska, *Enzymatyczna synteza selektywnie znakowanych izotopomerów L-tyrozyny*, XLIII Zjazd PTChem i SITPChem, Łódź, Polska, wrzesień 2000.
6. **W. Augustyniak**, J. Bukowski, J. Jemielity, M. Kańska, R. Kański, *Enzymatyczne syntezy izotopomerów [1-^{14}C]- i [2-^{14}C]-L-fenyloalaniny*, XLII Zjazd PTChem i SITPChem, Rzeszów, Polska, wrzesień 1999.
7. J. Bukowski, J. Szul, **W. Augustyniak**, R. Kański, M. Kańska, *Multienzymatyczna synteza znakowanej [3-^{14}C]-L-fenylalaniny,* XLI Zjazd PTChem i SITPChem, Wrocław, Polska, wrzesień 1998.

Publikacje nie związane z rozprawą doktorską

1. J. Zuberek, A. Wyslouch-Cieszynska, A. Niedzwiecka, M. Dadlez, J. Stepinski, **W. Augustyniak**, A. C. Gingras, H. Lonnberg, S. K. Burley, N. Sonenberg, R. Stolarski, E. Darzynkiewicz; *Phosphorylation of eIF4E attenuates its interaction with cap analogs by electrostatic repulsion; Intein-Mediated Protein Ligation strategy to obtain phosphorylated protein*; 9, RNA, 52-61, 2003.

2. A. Koralewska, **W. Augustyniak**, A. Temeriusz, M. Kanska, *Effects of cyclodextrins on the catalytic activity of tyrosine phenol lyase*, Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry, 2004, w druku.

Komunikaty konferencyjne międzynarodowe nie związane z rozprawą doktorską

1. A. Koralewska, **W. Augustyniak**, A. Temeriusz, M. Kanska, *Effects of cyclodextrins on the catalytic activity of tyrosine phenol lyase*, 28th International Symposium on Macrocyclic Compounds, Gdansk, Polska, lipiec 2003.
2. C. Gingras, B. Raught, S. P. Gygi, **W. Augustyniak**, J. Marcotrigiano, A. Wyslouch-Cieszynska, R. D. Polakiewicz, R. Aebersold, N. Sonenberg, *Phosphorylation of 4E-BP1 is an ordered, hierarchical process*, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Translational Control, Cold Spring Harbor, USA, wrzesień 2000.