

**Załącznik 3 – Autoreferat do wniosku o przeprowadzenie
postępowania habilitacyjnego**

**Dr Małgorzata Pająk
Pracownia Elektrochemicznych Źródeł Energii
Wydział Chemii
Uniwersytet Warszawski**

**Synteza znakowanej L-tyrozyny i jej pochodnych
oraz badanie ich enzymatycznych przemian metodami
kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów
izotopowych**

Warszawa
Styczeń, 2021

Spis treści

1. Imię i nazwisko	3
2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne	3
3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych	3
4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy	3
4.1. Wstęp.....	7
4.2. Syntezy izotopomerów pochodnych L-Tyr.....	10
4.2.1. <i>Halogenopochodne L-Tyr znakowane izotopami wodoru w łańcuchu bocznym lub pierścieniu</i>	<i>10</i>
4.2.2. <i>Metylowe pochodne L-Tyr znakowane deuterem w łańcuchu bocznym lub pierścieniu.....</i>	<i>13</i>
4.2.3. <i>Halogenopochodne tyraminy znakowane izotopami wodoru w łańcuchu bocznym.....</i>	<i>14</i>
4.3. Kinetyczne i rozpuszczalnikowe efekty izotopowe w wybranych reakcjach szlaku metabolicznego L-Tyr.....	15
4.3.1. <i>Halogenowe i metylowe pochodne L-Tyr w reakcji katalizowanej przez tyrozynazę.....</i>	<i>17</i>
4.3.2. <i>Halogenowe pochodne tyraminy w reakcji katalizowanej przez MAO A.....</i>	<i>18</i>
4.3.3. <i>Metylowe pochodne L-Tyr w reakcji katalizowanej przez LAAO.....</i>	<i>21</i>
4.4. Wpływ pochodnych L-Tyr na aktywność wybranych enzymów szlaku metabolicznego.....	22
4.5. Podsumowanie.....	28
4.6. Literatura.....	29
5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej.....	31
6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę.....	34
7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej.....	35

1. Imię i nazwisko: Małgorzata Pająk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe lub artystyczne :

Doktor nauk chemicznych - Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, 2008r.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Badanie enzymatycznych reakcji L-DOPY i jej pochodnych metodami izotopowymi”

Magister chemii - Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski, 2004r.

Tytuł pracy magisterskiej: „Synteza ureidowego mimetyku peptydu”

3. Informacja o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

10.2020 – obecnie - Adiunkt - Pracownia Elektrochemicznych Źródeł Energii, Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

10.2018 – 01.2021 - Specjalista badawczo-techniczny - Pracownia Elektrochemicznych Źródeł Energii, Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski (wykonawca w grantie **TECHMATSTRATEG 1/347431/14/NCBR/2018** - opracowanie składu elektrolitów na bazie cieczy jonowych do zastosowań w bateriach litowo-jonowych)

04.2017 – 09.2018 - Adiunkt naukowy – Pracownia Elektrochemicznych Źródeł Energii, Zakład Chemii Fizycznej i Radiochemii, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski (wykonawca w grantie EC Horyzont 2020, EU-685716 (SINTBAT) - opracowanie kompozytów elektrolitów na bazie rozpuszczalników organicznych do zastosowań w bateriach litowo-jonowych)

02.2009 – 03.2017 - Adiunkt – Pracownia Chemii Biomolekuł, Zakład Chemii Organicznej, Wydział Chemii, Uniwersytet Warszawski

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 ust. 1 pkt. 2 Ustawy

Cykl powiązanych tematycznie artykułów naukowych, zgodnie a art. 219 ust. 1 pkt 2b Ustawy.

W skład cyklu wchodzi 8 prac oryginalnych oraz 2 prace przeglądowe. Cztery prace są monoautorskie, w pięciu pracach jestem pierwszym autorem oraz autorem korespondencyjnym.

[H1] E. Winnicka, M. Pająk, K. Pałka, K. Czerwińska, M. Kańska, *Enzymatic synthesis of halogen derivatives of aromatic amino acids labeled with hydrogen isotopes*, J. Chem. Chem. Eng., 2014, 8, 54-60

Praca ta stanowi badania wstępne nad syntezą halogenowych pochodnych L-tyrozyny selektywnie znakowanych izotopami wodoru. Zostały w niej po raz pierwszy opisane metody syntezy 3'-fluoro- oraz 3'-chloro-L-tyrozyny znakowanej deuterem w pozycji 2 łańcucha bocznego, czyli 3'-fluoro-[2-²H]- oraz 3'-chloro-[2-²H]-L-tyrozyny. Wyniki uzyskane podczas realizacji tych badań pomogły mi zaplanować dalsze etapy pracy nad syntezą izotopomerów znakowanych trytem.

IF₂₀₁₉= brak punkty MNiSW= 8 (2014r) l. cyt.= 6

[H2] M. Pająk, K. Pałka, E. Winnicka, M. Kańska, *Syntheses of halogen derivatives of L-tryptophan, L-tyrosine and L-phenylalanine labeled with hydrogen isotopes*, J. Label. Compd. Radiopharm., 2016, 59, 4-8, DOI: 10.1002/jlcr.3357

Praca ta stanowi kontynuację badań nad syntezą izotopomerów halogenowych pochodnych L-tyrozyny selektywnie znakowanych izotopami wodoru. Zostały w niej opisane metody syntezy 3'-fluoro- oraz 3'-chloro-L-tyrozyny znakowanej trytem bądź deuterem i trytem w pozycji 2 łańcucha bocznego, takich jak 3'-fluoro-[2-³H]-, 3'-chloro-[2-³H]-, 3'-fluoro-[2-²H/³H]- oraz 3'-chloro-[2-²H/³H]-L-tyrozyna.

IF₂₀₁₉= 1,809 punkty MNiSW= 40 l. cyt.= 6

[H3] M. Pająk, M. Kańska, *Isotope effects in mechanistic studies of L-tyrosine halogen derivatives hydroxylation catalyzed by tyrosinase*, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2017, 314, 2123-2128, DOI: 10.1007/s10967-017-5526-1

W pracy tej opisałam metody syntezy halogenowych pochodnych L-tyrozyny znakowanych deuterem w pierścieniu, takich jak 3'-fluoro-[5'-²H]- oraz 3'-chloro-[5'-²H]-L-tyrozyna, a następnie wykorzystanie tych związków do wyznaczenia kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez tyrozinazę. Dokonałam analizy uzyskanych wyników pod kątem wpływu podstawnika halogenowego na mechanizm reakcji badanego enzymu. Określiłam również inhibujący wpływ 3'-jodo-L-tyrozyny na aktywność tyrozinazy.

IF₂₀₁₉= 1,137 punkty MNiSW= 40 l. cyt.= 8

[H4] M. Pająk, M. Kańska, *Isotope effects in the tyrosinase catalyzed hydroxylation of L-tyrosine methyl derivatives*, *Isot. Environ. Health Stud.*, 2018, 54, 548–557, DOI: 10.1080/10256016.2018.1505722

Praca ta zawiera opis metody syntezy [3',5'-²H₂]-α-metylo- oraz [3',5'-²H₂]-N-metylo-L-tyrozyny, jak również wyniki kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych w badaniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez tyrozynazę z wykorzystaniem zsyntezowanych izotopomerów. Opisałam również badania nad inhibitującym wpływem O-metylo-L-tyrozyny na aktywność tyrozynazy.

IF₂₀₁₉= 1,652

punkty MNiSW= 40

l. cyt.= 2

[H5] M. Pająk, M. Kańska, *Enzymatic syntheses of 3'-halotyramines, selectively ²H- and ³H-labeled in the side chain*, *Appl. Radiat. Isotop.*, 2018, 131, 8-12, DOI: 10.1016/j.apradiso.2017.10.032

W pracy tej opisałam metody syntez halogenowych pochodnych tyraminy, takich jak 3'-fluoro-, 3'-chloro- i 3'-jodotyramina, jej izotopomerów znakowanych deuterem lub trytem w pozycji (1R), takich jak 3'-fluoro-[(1R)-²H]-, 3'-chloro-[(1R)-²H]-, 3'-jodo-[(1R)-²H]-, 3'-fluoro-[(1R)-³H]-, 3'-jodo-[(1R)-³H]-tyramina oraz izotopomerów znakowanych w pozycji (1S), takich jak 3'-jodo-[(1S)-²H]-, 3'-jodo-[(1S)-³H]-, 3'-jodo-[(1S)-²H/³H]-, 3'-fluoro-[(1S)-³H]- i 3'-fluoro-[(1S)-²H/³H]-tyramina. Ponadto, opisałam metody syntez jodopochodnych L-tyrozyny znakowanych deuterem lub trytem w łańcuchu bocznym, takich jak 3'-jodo-[2-²H]-, 3'-jodo-[2-³H]-, 3'-jodo-[2-²H/³H]-L-tyrozyna, niezbędnych do otrzymania pochodnych tyraminy znakowanych w pozycji (1S).

IF₂₀₁₉= 1,270

punkty MNiSW= 70

l. cyt.= 4

[H6] M. Pająk, *Kinetic and solvent isotope effects in oxidation of halogen derivatives of tyramine catalyzed by monoamine oxidase A*, *J. Biochem.* 2020, 167, 49–54, DOI: 10.1093/jb/mvz089

W pracy tej wyznaczyłam efekty izotopowe w reakcji katalizowanej przez monoaminooksydazę A z wykorzystaniem zsyntezowanych w pracy [H5] pochodnych. Na podstawie otrzymanych wyników określiłam stereospecyficzność badanego enzymu oraz ustaliłam prawdopodobny mechanizm działania tego enzymu.

IF₂₀₁₉= 2,476

punkty MNiSW= 100

l. cyt.= 1

[H7] M. Pająk, *Microwave enhanced synthesis of halogenated derivatives of L-tyrosine labeled with deuterium in aromatic ring*, J. Radioanal. Nucl. Chem. 2020, 326, 857-860, DOI: 10.1007/s10967-020-07362-8

Praca ta zawiera opis oraz porównanie metod syntezy halogenopochodnych L-tyrozyny znakowanych deuterem w pierścieniu, takich jak 3'-fluoro-[5'-²H]-, 3'-chloro-[5'-²H]- oraz 3'-jodo-[2',5'-²H₂]-L-tyrozyna, z zastosowaniem ogrzewania klasycznego oraz z wykorzystaniem mikrofal.

IF₂₀₁₉= 1,137

punkty MNiSW= 40

l. cyt.= 0

[H8] M. Pająk, *Methylated derivatives of L-tyrosine in reaction catalyzed by L-amino acid oxidase: isotope and inhibitory effects*, J. Biochem., 2020, 168, 509–514, DOI: 10.1093/jb/mvaa066

W pracy tej opisałam metodę syntezy O-metylo-[2-²H]-L-tyrozyny oraz jej wykorzystanie do wyznaczenia efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez oksydazę L-aminokwasów. Opisałam także badania nad inhibitującym wpływem α-metylo- oraz N-metylo-L-tyrozyny na aktywność badanego enzymu.

IF₂₀₁₉= 2,476

punkty MNiSW= 100

l. cyt.= 0

[H9] M. Pająk, K. Pałka, E. Winnicka, M. Kańska, *The chemo- enzymatic synthesis of labeled L-amino acids and some of their derivatives*, J. Radioanal. Nucl. Chem., 2018, 317, 643–666, DOI: 10.1007/s10967-018-5932-z

Praca ta stanowi podsumowanie ponad 20 lat pracy naszego zespołu badawczego nad syntezą związków biologicznie aktywnych, znakowanych izotopami węgla i wodoru, niezbędnych do przeprowadzenia badań nad mechanizmami reakcji enzymatycznych metodą kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych oraz omawia wyniki naszych badań na tle literatury światowej. Opisane w niej zostały, między innymi, opracowane przeze mnie metody syntez halogenowych pochodnych L-tyrozyny, znakowanych izotopami wodoru w łańcuchu bocznym lub pierścieniu aromatycznym.

IF₂₀₁₉= 1,137

punkty MNiSW= 40

l. cyt.= 9

[H10] M. Pająk, *Pochodne L-tyrozyny jako leki oraz znaczniki do obrazowania nowotworów*, Przem. Chem. 2020, 99, 1541-1545, DOI: 10.15199/62.2020.10.21

Praca ta stanowi podsumowanie uzyskanych przeze mnie wyników badań kinetycznych w reakcjach szlaku metabolicznego L-tyrozyny, katalizowanych przez tyrozinazę, monoaminooksydazę A oraz oksydazę L-aminokwasową.

IF₂₀₁₉= 0,485

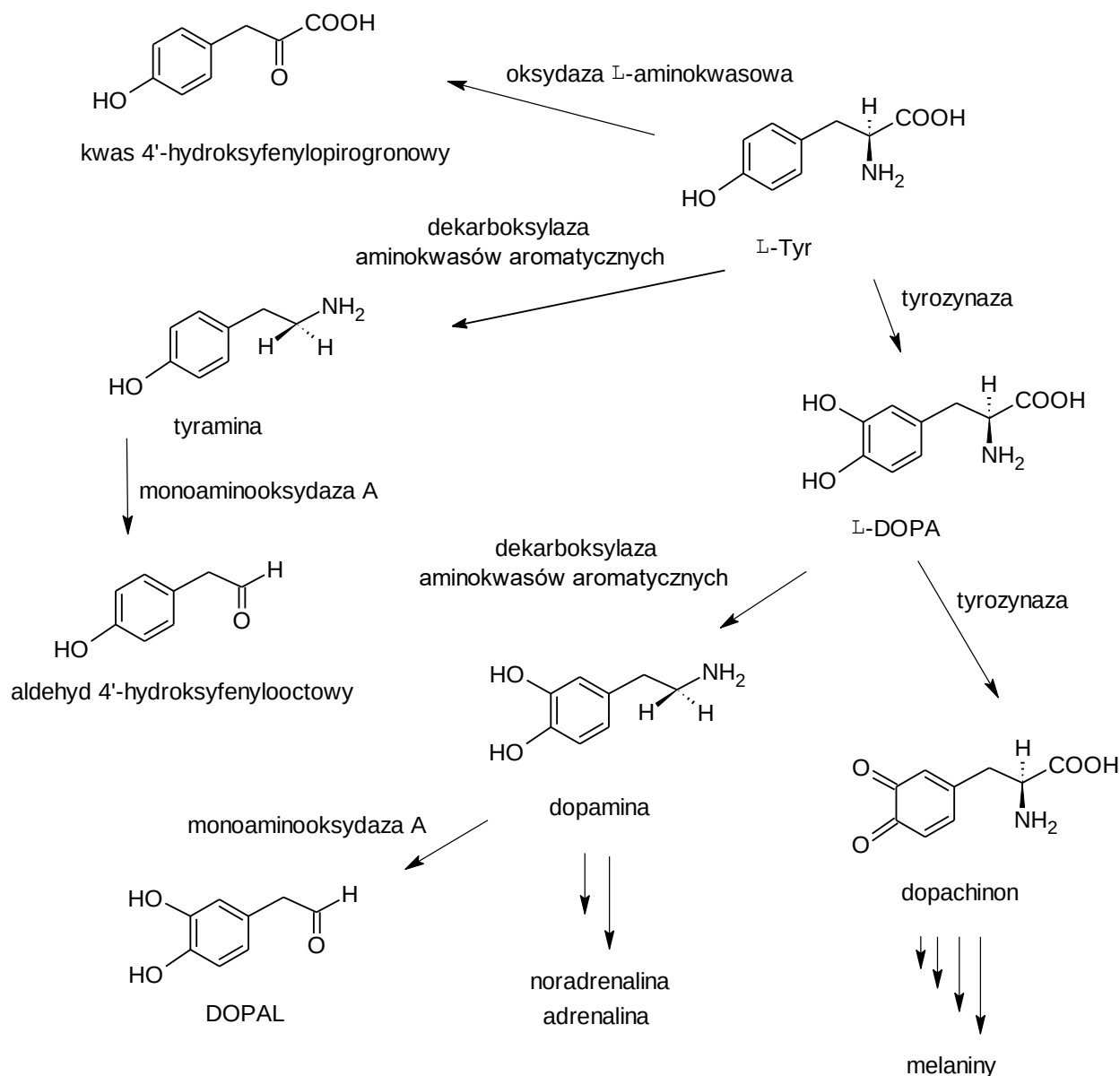
punkty MNiSW= 40

l. cyt.= 0

4.1. Wstęp

L-Tyrozyna (L-Tyr) jest aminokwasem aromatycznym, niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Jako prekursor ważnych związków biologicznie aktywnych bierze udział w wielu procesach metabolicznych. W jednym z etapów szlaku metabolicznego, którego fragment przedstawiono na rys. 1, L-Tyr jest enzymatycznie przekształcana w 3',4'-dihydroksy-L-fenylalaninę (L-DOPA) [1], która w kolejnym etapie ulega konwersji do dopaminy, będącej prekursorem neuroprzekaźników ośrodkowego układu nerwowego człowieka, takich jak adrenalina i noradrenalina [2]. L-DOPA, po utlenieniu do dopachinonu, jest substratem w syntezie melanin, które są naturalnymi barwnikami nadającymi kolor włosom, skórze, oraz tęczówce oka [3]. Ze względu na tak szerokie spektrum działania L-Tyr, zaburzenia jej metabolizmu prowadzą do wielu schorzeń, między innymi choroby Parkinsona, bielactwa, czerniaka, czy albinizmu [4-6]. W ostatnim dziesięcioleciu wzrosło zainteresowanie syntezą nowego typu radioznaczników, będących halogenowymi oraz metylowymi pochodnymi L-Tyr, znakowanych izotopami o krótkim czasie półrozpadu o potencjalnym zastosowaniu w pozytonowej tomografii emisyjnej PET (*positron emission tomography*) oraz tomografii emisyjnej pojedynczych fotonów SPECT (*single photon emission computed tomography*). 2'-[¹⁸F]fluoro-L-Tyr okazała się użytecznym znacznikiem do różnicowania tkanek zdrowych i nowotworów oraz obrazowania syntezy peptydów *in vivo* [7]. 3'-[¹⁸F]fluoro- α -metylo-L-Tyr jest wykorzystywana do wykrywania zmian przerzutowych w wątrobie [8]. 6'-[¹⁸F]fluoro-L-*m*-Tyr znalazła zastosowanie do śledzenia funkcji układu dopaminergicznego [9-11]. 3'-[⁷⁶Br]bromo- α -metylo-L-Tyr została poddana testom jako nowy znacznik do wykrywania złośliwych guzów, głównie nerek i pęcherza moczowego [12]. 2'-[¹²³I]jodo-L-Tyr jest potencjalnym wskaźnikiem do obrazowania nowotworów układu nerwowego, w szczególności glejaków [13]. 3'-[¹²⁵I]jodo- α -metylo-L-Tyr została

przetestowana pod kątem użyteczności w obrazowaniu zmian nowotworowych [14, 15]. 6'-[^{11}C]metylo-L-*m*-Tyr została zsyntezowana jako potencjalny radioznacznik do ilościowego obrazowania presynaptycznej aktywności dopaminy w mózgu [16], natomiast O-[^{11}C]metylo-L-Tyr została poddana testom klinicznym jako marker do śledzenia transportu aminokwasów w komórkach nowotworowych [17].

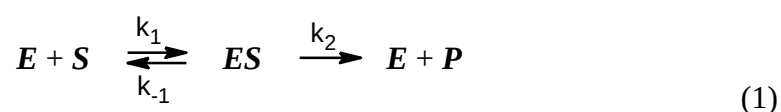


Rys. 1. Fragment szlaku metabolicznego L-Tyr.

Przed podaniem pacjentowi nowego typu związków ważne jest, aby sprawdzić, czy dodatkowe podstawniki w cząsteczce związku biologicznie aktywnego nie wpłyną na reakcje

enzymatyczne, w których dany związek uczestniczy. Udowodniono, że jodopochodne L-Tyr są inhibitorami hydroksylazy tyrozynowej, katalizującej przemianę L-Tyr do L-DOPA [18]. Bromopochodne L-Tyr wykazują działanie inhibitujące wobec dehalogenazy jodotyrozynowej, która metabolizuje jodotyrozynę podczas syntezy hormonów tarczycy [19]. Wykazano również, że kwas fluoroocetowy, będący metabolitem fluorotyrozyny, wpływa toksycznie na organizm człowieka [20]. Z kolei produkty przemiany metylowych pochodnych L-Tyr są inhibitorami oksydazy monoaminowej [21, 22]. **Celem moich badań było określenie wpływu podstawników halogenowych lub metylowych w cząsteczce L-Tyr na procesy enzymatyczne zachodzące z udziałem tego aminokwasu oraz określenie mechanizmu działania tyrozynazy, monoaminooksydazy A (MAO A) oraz oksydazy L-aminokwasowej (LAAO) wobec halogeno- oraz metylopo pochodnych L-Tyr. Jest to niezwykle ważne dla określenia toksyczności podawanych radiofarmaceutyków.** Jedną z niezwykle czułych metod, która pozwala na śledzenie przemian enzymatycznych, jest metoda kinetycznych KIE (*kinetic isotope effect*) i rozpuszczalnikowych SIE (*solvent isotope effect*) efektów izotopowych. Opiera się ona na wyznaczeniu stosunku stałych szybkości reakcji biegnącej ze związkiem zawierającym lżejszy izotop do stałej szybkości wyznaczonej dla reakcji przebiegającej ze związkiem podstawionym cięższym izotopem. Otrzymane wartości KIE oraz SIE pozwalają na wyjaśnienie mechanizmu działania danego enzymu, określenie etapu determinującego szybkość badanej reakcji oraz ustalenie wiązania zaangażowanego w tworzenie kompleksu aktywnego [23-25].

Schemat reakcji enzymatycznej, w której uczestniczy jeden substrat, przedstawiony jest zależnością (1) :



w której *E* oznacza enzym, *S* substrat, *P* produkt a *ES* kompleks Michaelisa - Mentena.

Dla większości reakcji enzymatycznych, początkowa szybkość reakcji *v* wyrażona jest wzorem (2):

$$v = V_{\max}[S]/(K_m + [S]) \quad (2)$$

w którym $V_{\max} = k_2[E]$ określa szybkość maksymalną, $K_m = (k_2 + k_{-1})/k_1$ określa stałą Michaelisa a $[S]$ oznacza stężenie substratu. Stosunek $V_{\max}^{\text{lekki}}/V_{\max}^{\text{ciężki}}$ określa wartość KIE dla $V_{\max}$, natomiast stosunek $(V_{\max}/K_m)^{\text{lekki}}/(V_{\max}/K_m)^{\text{ciężki}}$ daje wartość KIE dla $V_{\max}/K_m$. Wartości efektów izotopowych, zarówno dla $V_{\max}$, jak i dla $V_{\max}/K_m$ dostarczają informacji na temat mechanizmu badanej reakcji enzymatycznej. Jeśli podstawienie izotopowe wpływa na

proces wiązania substratu w centrum aktywnym enzymu, wówczas zostanie to uwidocznione w wartości KIE w parametrze $V_{\max}/K_m$. Wartość tego efektu będzie znacznie większa, niż wartość KIE dla $V_{\max}$. Jeśli podstawienie izotopowe wpływa na proces uwalniania produktu z kompleksu aktywnego, wówczas wartość KIE dla $V_{\max}$ będzie przewyższała wartość KIE dla $V_{\max}/K_m$. Metoda KIE wymaga użycia związków selektywnie znakowanych izotopami, dlatego aby wyznaczyć efekty izotopowe w reakcjach enzymatycznych, w których uczestniczą halogenowe oraz metylowe pochodne L-Tyr, należało otrzymać je znakowane. W związku z tym **szczególnie ważną częścią mojej pracy było opracowanie metod syntezy odpowiednich izotopomerów. Otrzymanie związków znakowanych w ściśle określonym miejscu cząsteczki, dodatkowo o sprecyzowanej stereochemii nie należało do zadań trywialnych i wymagało opracowania nowej strategii syntezy bądź modyfikacji istniejących procedur.** Podczas tego etapu badań skorzystałam z metod zarówno klasycznej chemii, w tym wymiany izotopowej w środowisku kwasowym, jak również z metod enzymatycznych, gdzie w obecności odpowiedniego enzymu zachodzi stereoselektywna wymiana izotopowa w cząsteczce pochodnej L-Tyr. **Otrzymane związki wykorzystałam do przeprowadzenia badań kinetycznych** reakcji utlenienia L-Tyr do L-DOPY, katalizowanej przez tyrozynazę, oksydacyjnej deaminacji L-Tyr do kwasu 4'-hydroksyfenylopirogronowego, katalizowanej przez LAAO oraz utlenienia tyraminy do aldehydu 4'-hydroksyfenylooctowego, katalizowanej przez MAO A (rys. 1). Wartości wyznaczonych efektów izotopowych oraz porównanie parametrów kinetycznych badanych reakcji ($V_{\max}$, K_m), pozwoliły na częściowe wyjaśnienie mechanizmów działania tych enzymów. **Ostatnim i zasadniczym etapem moich badań było określenie wpływu poszczególnych klas związków na aktywność wyżej wymienionych enzymów poprzez badanie ich właściwości inhibitujących, które mogą mieć znaczący wpływ na przebieg procesów enzymatycznych w organizmie.**

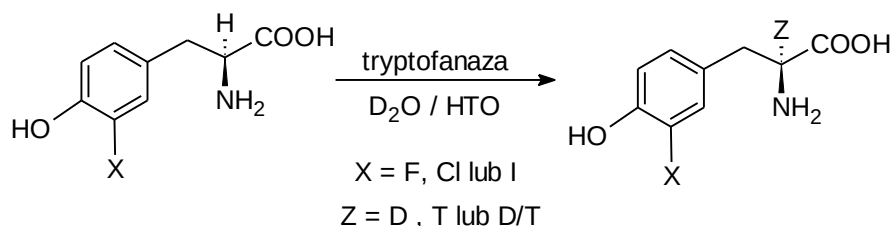
4.2. Syntezy izotopomerów pochodnych L-Tyr

4.2.1. *Halogenopochodne L-Tyr znakowane izotopami wodoru w łańcuchu bocznym lub pierścieniu*

W pierwszej kolejności niezbędne było opracowanie przeze mnie metod oraz przeprowadzenie syntez halogenowych pochodnych L-Tyr, takich jak 3'-fluoro-, 3'-chloro- oraz 3'-jodo-L-Tyr, selektywnie znakowanych izotopami wodoru w pozycji 2 łańcucha

bocznego, co zostało opisane w pracach [H1], [H2] oraz [H5]. Z danych literaturowych oraz moich wcześniejszych doświadczeń wynikało, że proces podstawienia izotopem wodoru w tej konkretnej pozycji może przebiegać na drodze enzymatycznej wymiany izotopowej pomiędzy atomem wodoru w pozycji α , a atomem deuteru bądź trytu, pochodzącym ze środowiska reakcyjnego (w tym przypadku buforu deuterowanego bądź trytowanego), katalizowanej przez tryptofanazę (EC 4.1.99.1) [26, 27]. Jednak, kiedy zastosuje się jako substrat cząsteczkę związku z dodatkowym podstawnikiem, wynik syntezy może być negatywny, gdyż enzym z założenia katalizuje reakcje ze związkami będącymi jego naturalnymi substratami.

Miejsce oraz stopień podstawienia deuterem określiłam na podstawie zmian integracji oraz multipletowości sygnałów w widmach ^1H NMR związków niepodstawionych oraz znakowanych. Dzięki analizie widm zaobserwowałam, że wymiana izotopowa nastąpiła tylko i wyłącznie w pozycji α , a stopień podstawienia wynosił niemal 100%, o czym świadczył zanik sygnału pochodzącego od atomu wodoru w pozycji 2 łańcucha bocznego. Zatem obecny w mieszaninie reakcyjnej enzym tryptofanaza katalizuje reakcję wymiany izotopowej poprzez labilizację protonu w pozycji 2 łańcucha bocznego halogenowych pochodnych L-Tyr (rys. 2).

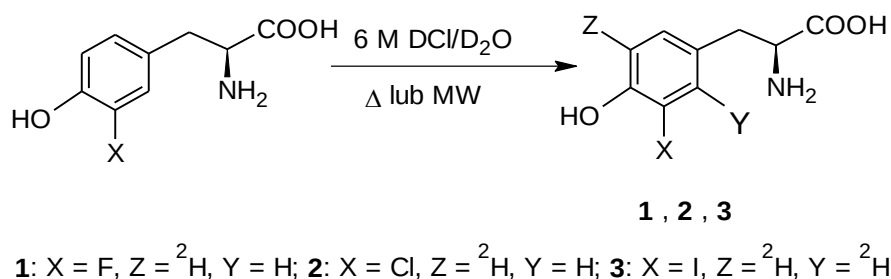


Rys. 2. Schemat reakcji syntezy halogenowych pochodnych L-Tyr znakowanych izotopami wodoru w pozycji 2 łańcucha bocznego.

Otrzymane izotopomery posłużyły mi jako substraty w reakcji syntezy kolejnej klasy związków znakowanych [H5], wykorzystanych w celu wyznaczenia efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez monoaminoooksydazę A [H6], co opiszę w dalszej części.

Kolejnym etapem badań było opracowanie metod syntezy 3'-fluoro-, 3'-chloro- oraz 3'-jodo-L-Tyr selektywnie znakowanych deuterem w pozycji 5' pierścienia, niezbędnych do wyznaczenia efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez tyrozynazę, co nie było wcześniej opisane w literaturze. Obecność dodatkowego podstawnika w cząsteczce L-Tyr mogła w znacznym stopniu utrudnić otrzymanie izotopomerów znakowanych w ściśle określonej pozycji, co wymagało ode mnie krytycznego podejścia do stosowanych wcześniej metod syntezy związków znakowanych.

Zaprojektowane izotopomery otrzymałam na dwa sposoby (rys. 3), co opisałam w pracach [H3] oraz [H7]. W pierwszym przypadku skorzystałam ze zmodyfikowanej metody wymiany izotopowej, zachodzącej w środowisku kwasowym i podwyższonej temperaturze, która została wcześniej opracowana w naszym zespole [28].



Rys. 3. Schemat reakcji syntezy halogenowych pochodnych L-Tyr znakowanych deuterem w pierścieniu.

W tym przypadku za pomocą widma protonowego rezonansu jądrowego potwierdziłam, że podstawienie izotopowe w cząsteczce 3'-fluoro- oraz 3'-chloro-L-Tyr było bliskie 100% i nastąpiło tylko i wyłącznie w pozycji 5' pierścienia. W przypadku cząsteczki 3'-jodo-L-Tyr podstawienie izotopowe w pozycji 5' wynosiło 96%, jednak inkorporacja deuteru nastąpiła także w miejsce 2' pierścienia, osiągając wartość 70%. Zastosowanie podwójnie znakowanego izotopomeru do badań kinetycznych mogłoby generować dodatkowe, drugorzędowe efekty izotopowe, co powodowałoby podwyższenie wartości liczbowych wyznaczanych KIE. Ze względu na to, że 3'-jodo-L-Tyr wykazała działanie inhibitujące wobec tyrozynazy (co zostanie opisane w dalszej części pracy) podjęłam decyzję, że pochodna ta nie będzie wykorzystana do badań KIE.

Ciekawe wyniki uzyskałam w przypadku ogrzewania mieszaniny reakcyjnej z zastosowaniem mikrofal (metoda MW), co stanowiło nowatorskie podejście w syntezie związków znakowanych [H7]. Taka metoda prowadzenia syntezy pozwoliła mi na uzyskanie inkorporacji deuteru na poziomie 65% w pozycji 5' cząsteczki fluoro- oraz chloropochodnej L-Tyr oraz 70% i 96% odpowiednio w pozycji 2' oraz 5' jodopochodnej L-Tyr, w bardzo krótkim czasie syntezy ($8 \times 1,5$ min.). Dla porównania, czas reakcji wymiany izotopowej z zastosowaniem klasycznej metody ogrzewania wynosił 24 godziny, czyli 120 razy wolniej niż w przypadku metody MW. **Zaproponowana przeze mnie metoda MW znacznie zmniejsza koszty syntezy oraz skraca czas jej prowadzenia.** Związki o stopniu wzbogacenia

izotopowego mniejszym niż 100% mogą posłużyć jako substraty w badaniach kinetycznych z zastosowaniem wzoru (3)

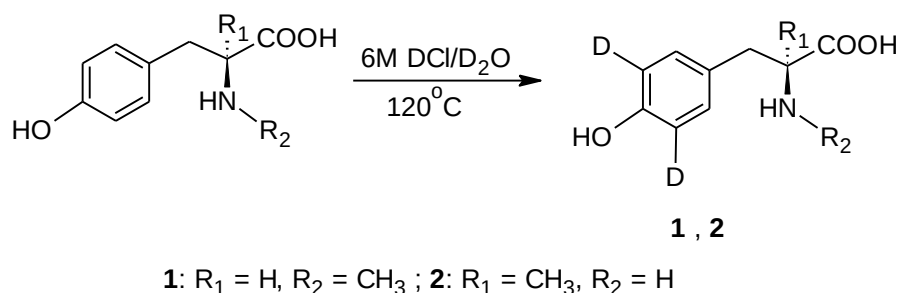
$$\alpha = p(\alpha_p - 1) + 1 \quad (3)$$

gdzie p oznacza stopień wzbogacenia deuterem, α skorygowany efekt izotopowy do wartości 100% wzbogacenia ($p = 100$), α_p zmierzony efekt izotopowy dla związku o wzbogaceniu deuterem na poziomie p [29].

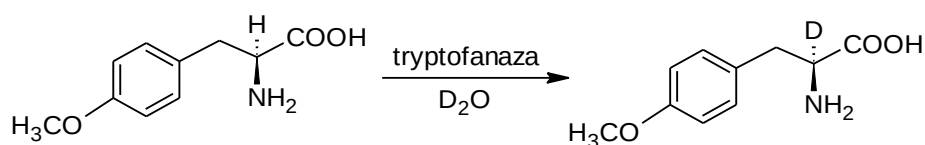
Metody syntez halogenowych pochodnych L-Tyr, znakowanych izotopami wodoru w pierścieniu oraz łańcuchu bocznym zostały także opisane w pracy przeglądowej [H9], która stanowi podsumowanie ponad 20 lat pracy naszego zespołu badawczego nad syntezą związków biologicznie aktywnych, znakowanych izotopami węgla i wodoru, niezbędnych do przeprowadzenia badań nad mechanizmami reakcji enzymatycznych metodą kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych oraz omawia wyniki naszych badań na tle literatury światowej.

4.2.2. Metylowe pochodne L-Tyr znakowane deuterem w łańcuchu bocznym lub pierścieniu

Opracowałam także metody syntez izotopomerów metylowych pochodnych L-Tyr, takich jak α -metylo-L-Tyr, N -metylo-L-Tyr oraz O -metylo-L-Tyr. α -Metylo-L-Tyr oraz N -metylo-L-Tyr, podwójnie znakowane deuterem w pozycji 2' oraz 5' pierścienia zostały zsyntezowane w wyniku wymiany izotopowej zachodzącej w środowisku kwasowym oraz podwyższonej temperaturze, z zastosowaniem ogrzewania klasycznego (rys. 4) i opisane w pracy [H4], natomiast O -metylo-L-Tyr, znakowana deuterem w pozycji 2 łańcucha bocznego, została zsyntezowana poprzez enzymatyczną wymianę izotopową, katalizowaną przez tryptofanazę (rys. 5). Metoda syntezy została opisana w pracy [H8]. W przypadku tego substratu enzym również przyspieszał wymianę izotopową poprzez labilizację atomu wodoru w pozycji α .



Rys. 4. Schemat reakcji syntezy α -metylo-L-Tyr oraz N -metylo-L-Tyr, znakowanych deuterem w pierścieniu.

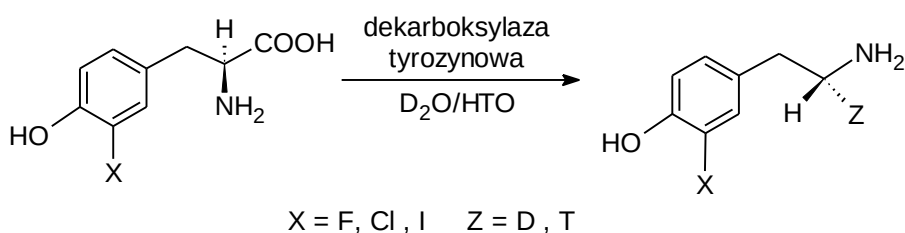


Rys. 5. Schemat reakcji syntezy O-metylo-L-Tyr, znakowanej deuterem w pozycji 2 łańcucha bocznego.

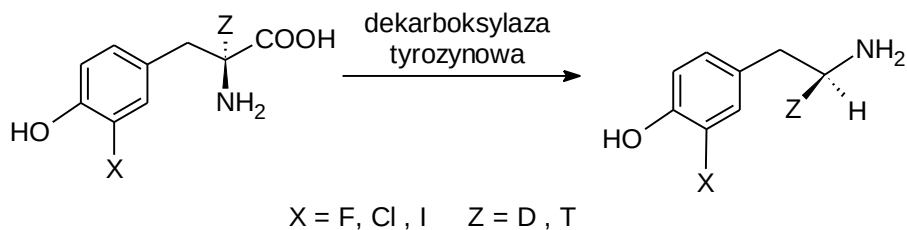
Miejsce oraz stopień podstawienia deuterem określiłam na podstawie zmian integracji oraz multipletowości sygnałów w widmach ^1H NMR związków niepodstawionych oraz znakowanych.

4.2.3. Halogenopochodne tyraminy znakowane izotopami wodoru w łańcuchu bocznym

Kolejną klasę związków, niezbędnych do wyznaczenia efektów izotopowych w reakcji katalizowanej przez monoaminooksydazę A, stanowiły halogenowe pochodne tyraminy takie jak 3'-fluoro-, 3'-chloro- oraz 3'-jodo-TA selektywnie znakowane izotopami wodoru w pozycji (1R) lub (1S) łańcucha bocznego. Metody syntezy tych związków zostały opisane w pracy [H5]. W wyniku enzymatycznej dekarboksylacji halogenopochodnych L-Tyr, katalizowanej przez dekarboksylazę tyrozynową (EC 4.1.1.25) otrzymałam izotopomery selektywnie znakowane w pozycji (1R) (rys. 6). Dekarboksylacja zsyntezowanych wcześniej [H1 oraz H2] halogenowych pochodnych L-Tyr, znakowanych izotopami wodoru w pozycji 2 łańcucha bocznego pozwoliła na zsyntezowanie izotopomerów halotyraminy znakowanych w pozycji (1S) (rys. 7).



Rys. 6. Schemat reakcji syntezy halogenowych pochodnych tyraminy, znakowanych izotopami wodoru w pozycji (1R) łańcucha bocznego.



Rys. 7. Schemat reakcji syntezy halogenowych pochodnych tyraminy, znakowanych izotopami wodoru w pozycji (1S) łańcucha bocznego.

Wszystkie zaproponowane przeze mnie metody syntez pozwoliły na otrzymanie związków o dużej czystości chemicznej i optycznej, a także wysokim wzbogaceniu izotopowym.

4.3. Kinetyczne i rozpuszczalnikowe efekty izotopowe w wybranych reakcjach szlaku metabolicznego L-Tyr

Zsyntezowane przeze mnie izotopomery posłużyły mi jako substraty do przeprowadzenia badań kinetycznych reakcji utlenienia L-Tyr do L-DOPY, katalizowanej przez tyrozynazę, utlenienia tyraminy do aldehydu 4'-hydroksyfenylooctowego, katalizowanej przez MAO A oraz oksydacyjnej deaminacji L-Tyr do kwasu 4'-hydroksyfenylopirogroonowego, katalizowanej przez LAAO metodą KIE i SIE.

W celu wyznaczenia parametrów kinetycznych ($V_{\max}$ i K_m), niezbędnych do obliczenia wartości efektów izotopowych w badanych reakcjach enzymatycznych, skorzystałam z niekonkurencyjnej metody pomiarów spektrofotometrycznych, która polega na przeprowadzeniu niezależnych pomiarów ze związkiem niepodstawionym oraz podstawionym izotopem, bądź z zastosowaniem medium reakcyjnego protonowanego lub deuterowanego. W przypadku reakcji katalizowanych przez tyrozynazę mierzyłam wzrost absorbancji przy długości fali $\lambda=475$ nm, który był wynikiem wzrostu stężenia powstającego podczas reakcji dopachromu. W przypadku reakcji katalizowanych przez MAO A oraz LAAO wykorzystałam reakcję następczą. Powstający podczas deaminacji nadtlenuk wodoru reagował z 4-aminoantypiryną oraz kwasem 3-(N-etylo-3-metyloanilino)-2-hydroksypropanosulfonowym w obecności peroksydazy, tworząc barwny związek absorbujący światło o długości fali $\lambda=570$ nm. W każdym przypadku wyznaczyłam szybkości początkowe dla sześciu różnych stężeń substratu, które pozwoliły na wyznaczenie parametrów $V_{\max}$ i K_m na podstawie równania Michaelisa-Mentena (2) z zastosowaniem programu Enzfitter 1.05. Następnie, w wyniku bezpośredniego porównania parametrów kinetycznych otrzymanych dla substratu

nieznakowanego i znakowanego wyznaczyłam wartości KIE, natomiast poprzez porównanie parametrów kinetycznych reakcji badanych w środowisku protonowanym i deuterowanym wyznaczyłam wartości SIE. Otrzymane wartości liczbowe poszczególnych efektów izotopowych zostały zebrane w tabelach 1 i 2.

Tabela 1. Wartości KIE w badanych reakcjach enzymatycznych pochodnych L-Tyr

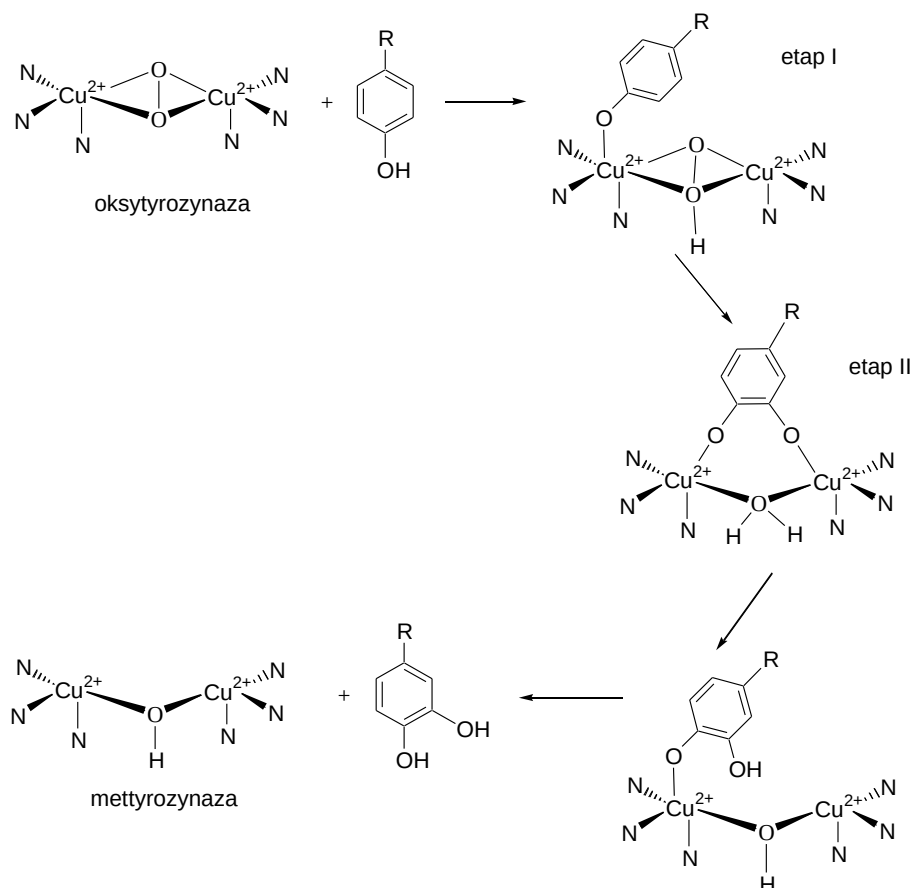
Enzym	Substrat	KIE dla $V_{\max}$	KIE dla $V_{\max}/K_m$
tyrozynaza	3'-fluoro-L-Tyr/ 3'-fluoro-[5'- ² H]-L-Tyr	$1,34 \pm 0,10$	$1,65 \pm 0,10$
	3'-chloro-L-Tyr/ 3'-chloro-[5'- ² H]-L-Tyr	$1,34 \pm 0,07$	$1,49 \pm 0,08$
	α -metylo-L-Tyr/ [3',5'- ² H ₂]- α -metylo-L-Tyr,	$1,46 \pm 0,11$	$1,37 \pm 1,7 \times 10^{-3}$
	N-metylo-L-Tyr/ [3',5'- ² H ₂]-N-metylo-L-Tyr	$1,51 \pm 5,18 \times 10^{-3}$	$1,62 \pm 4,08 \times 10^{-3}$
MAO A	3'-fluoro-TA/ 3'-fluoro-[(1R)- ² H]-TA	$1,65 \pm 0,07$	$1,25 \pm 0,05$
	3'-jodo-TA/ 3'-jodo-[(1R)- ² H]-TA	$1,34 \pm 0,05$	$1,1 \pm 0,2$
	3'-jodo-TA/3'-jodo-[(1S)- ² H]-TA	$1,06 \pm 0,10$	$1,31 \pm 0,05$
LAAO	O-metylo-L-Tyr/O-metylo-[2- ² H]-L-Tyr	$1,24 \pm 0,05$	$1,68 \pm 0,08$

Tabela 2. Wartości SIE w badanych reakcjach enzymatycznych pochodnych L-Tyr

Enzym	Substrat	SIE dla $V_{\max}$	SIE dla $V_{\max}/K_m$
tyrozynaza	3'-fluoro-L-Tyr	$2,93 \pm 0,22$	$1,84 \pm 0,14$
	3'-chloro-L-Tyr	$1,70 \pm 0,09$	$1,31 \pm 0,06$
	α -metylo-L-Tyr	$9,48 \pm 0,70$	$4,53 \pm 0,30$
	N-metylo-L-Tyr	$15,27 \pm 0,82$	$4,30 \pm 0,15$
MAO A	3'-jodo-TA	$2,83 \pm 0,35$	$6,94 \pm 0,20$
	3'-fluoro-TA	$3,03 \pm 0,30$	$2,33 \pm 0,10$
LAAO	O-metylo-L-Tyr	$1,30 \pm 0,09$	$2,55 \pm 0,31$

4.3.1. Halogenowe i metylowe pochodne L-Tyr w reakcji katalizowanej przez tyrozynazę

Tyrozynaza (EC 1.14.18.1) jest monooksygenazą, zawierającą w centrum aktywnym jony miedzi. Enzym ten jest odpowiedzialny za syntezę melanin w organizmie zwierząt oraz brązowienie grzybów, owoców i warzyw w obecności tlenu. Tyrozynaza katalizuje hydroksylację monofenoli do *o*-difenoli, wykazując aktywność krezolazową, a także utlenianie powstałych difenoli do *o*-chinonów, wykazując aktywność katalazową. W szlaku metabolicznym L-Tyr odpowiada za przekształcenie L-Tyr do L-DOPY (rys. 1). W pierwszym etapie reakcji następuje atak nukleofilowy grupy hydroksylowej na jon miedzi z jednoczesnym przeniesieniem protonu z grupy hydroksylowej do mostku tlenowego oksytyrozyny. W drugim etapie następuje elektrofilowy atak nadttlenku na pozycję C-3 w cząsteczce L-Tyr (rys. 8).



Rys. 8. Proponowany mechanizm działania tyrozynazy.

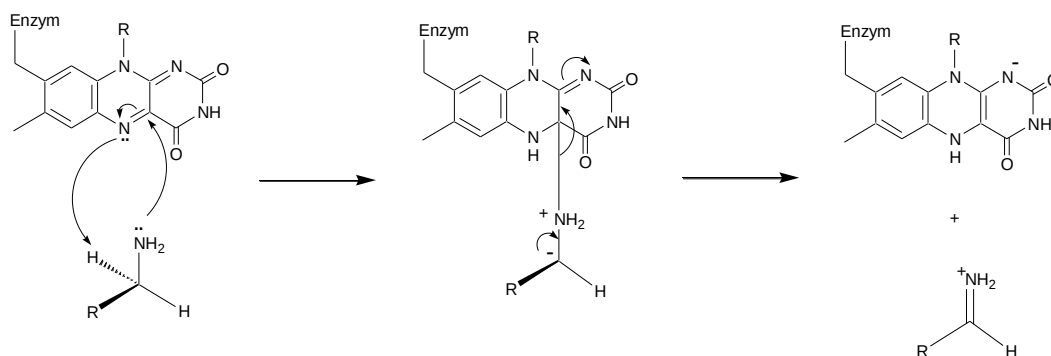
W procesie hydroksylacji L-Tyr, utworzenie wiązania C-O jest sprzężone z rozerwaniem wiązania C-H w pozycji 3', zachodzącym w etapie decydującym o szybkości badanego procesu. Wniosek ten został sformułowany na podstawie wartości efektów

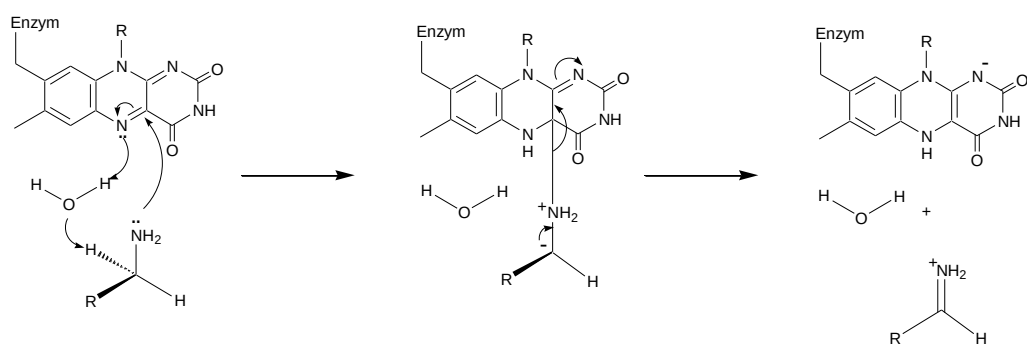
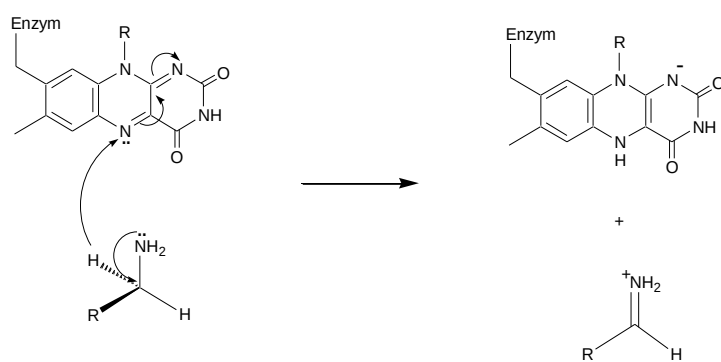
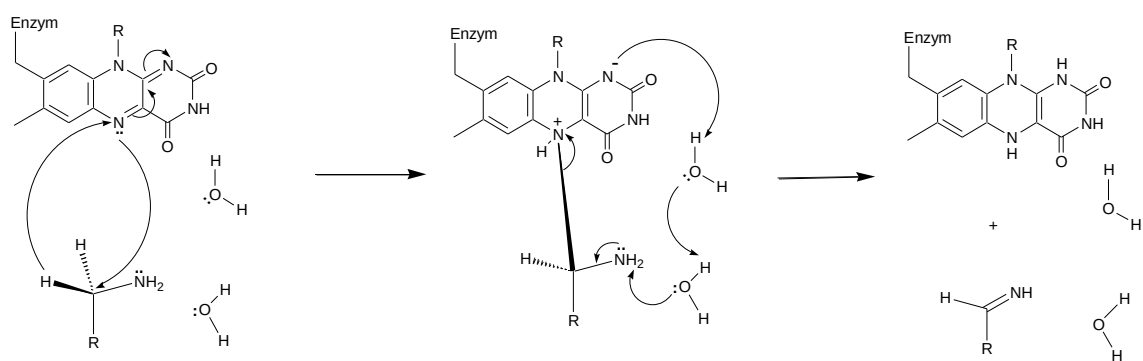
izotopowych (większych bądź bliskich 2) uzyskanych podczas naszych wcześniejszych badań [30]. W przypadku halogenowych pochodnych, uzyskałam niższe wartości KIE (tabela 1), co zostało opisane w pracy [H3]. **Wyniki te jednoznacznie wskazują, że reakcja z halogenopochodną przebiega według innego mechanizmu niż z naturalnym substratem.** Halogenek, zwiększając gęstość elektronową, utrudnia tworzenie wiązania C-O, co sugeruje, że tworzenie tego wiązania jest etapem decydującym o szybkości procesu hydroksylacji halogenopochodnych L-Tyr w obecności tyrozynazy. Wartości KIE dla pochodnych metylowych (tabela 1), opisane w pracy [H4], również są niższe od wartości uzyskanych dla L-Tyr, co sugeruje, że **w przypadku hydroksylacji α -metylo-L-Tyr oraz N-metylo-L-Tyr rozerwanie wiązania C-H w pozycji 3' nie jest etapem determinującym szybkość tego procesu enzymatycznego.** Uzyskane wartości SIE, zarówno dla halogenowych, jak i metylowych pochodnych L-Tyr (tabela 2) potwierdzają postulowany w literaturze udział cząsteczek rozpuszczalnika w procesie przeniesienia protonu grupy hydroksylowej do mostka tlenowego oksytyrozynazy [31].

4.3.2. *Halogenowe pochodne tyraminy w reakcji katalizowanej przez MAO A*

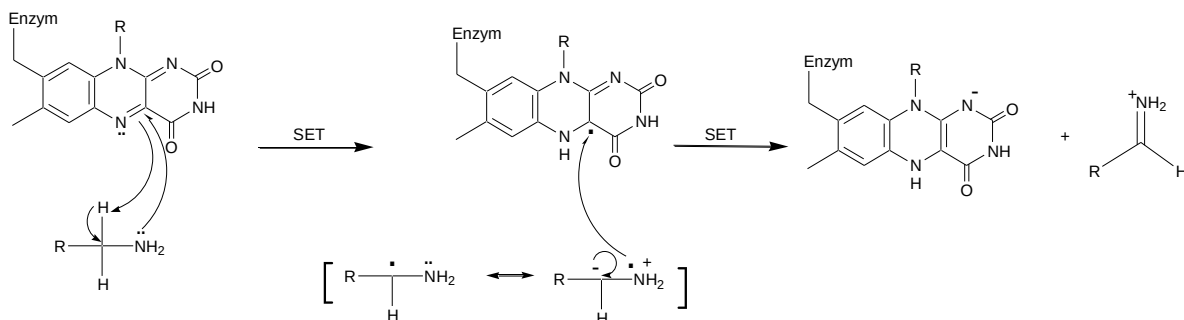
Monoaminoooksydaza A (MAO A, EC 1.4.3.4) jest mitochondrialnym flawoenzymem, katalizującym dwuetapową reakcję oksydacyjnej deaminacji amin biogennych. W pierwszym etapie powstaje imina z jednoczesną redukcją O_2 do H_2O_2 , w drugim natomiast dochodzi do nieenzymatycznej hydroksylacji iminy do odpowiedniego aldehydu. W literaturze postulowane są 4 mechanizmy, według których może zachodzić ta reakcja: polarny mechanizm nukleofilowy zachodzący w obecności wody lub bez jej udziału, bezpośrednie przeniesienie wodorku, dwuetapowe przeniesienie wodorku oraz mechanizm rodnikowy (rys. 9) [32, 33].

A



B**C****D**

E



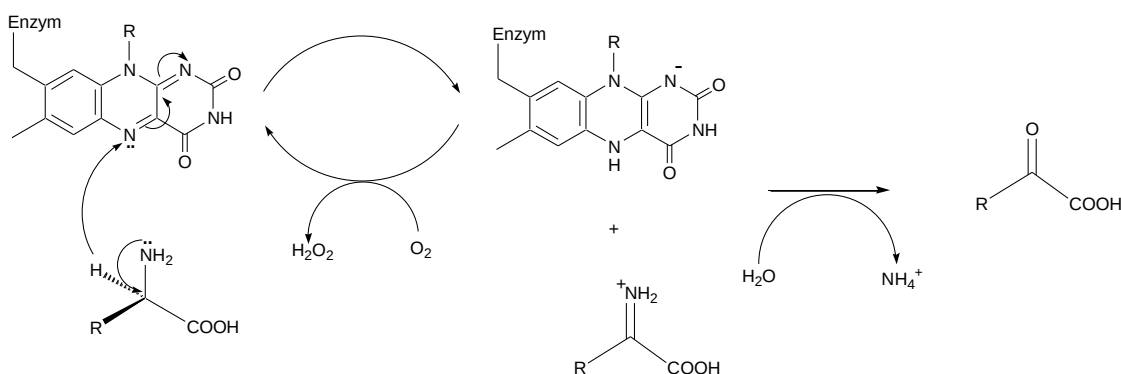
Rys. 9. Proponowane w literaturze mechanizmy działania enzymu MAO A: A) polarny nukleofilowy, B) polarny nukleofilowy wspomagany przez cząsteczki wody, C) bezpośrednie przeniesienie wodorku, D) dwuetapowe przeniesienie wodorku, E) mechanizm rodnikowy.

Pomimo wielu badań eksperymentalnych oraz symulacji komputerowych, poza wykluczeniem mechanizmu rodnikowego, nie udało się rozstrzygnąć, który z proponowanych mechanizmów jest najbardziej prawdopodobny. **Wyniki moich badań kinetycznych opublikowane w pracy [H6] rzuciły nowe światło na sposób działania MAO A.** Otrzymane wartości KIE (tabela 1) potwierdzają, że enzym ten powoduje stereospecyficzne oderwanie atomu wodoru z pozycji (1R) aminy. Wyższa wartość KIE dla $V_{\max}/K_m$, otrzymana dla izotopomeru znakowanego w pozycji (1S) świadczy o tym, że atom wodoru w pozycji (1S) uczestniczy w procesie wiązania substratu w centrum aktywnym enzymu. Warte podkreślenia są wyniki badań efektów rozpuszczalnikowych. Duże wartości SIE (tabela 2) ujawniają, że rozpuszczalnik odgrywa znaczącą rolę w procesie tworzenia kompleksu enzym-substrat. Zjawisko to zostało potwierdzone także za pomocą badań krystalograficznych [34]. Zaobserwowano 7 cząsteczek wody wypełniających przestrzeń pomiędzy substratem a resztami aminokwasów tworzących wgłębienie w centrum aktywnym enzymu. Dodatkowo, cząsteczka dinukleotydu flawino-adeninowego (FAD) oraz substrat tworzą wiązania wodorowe z dwiema cząsteczkami wody. **Zarówno dane krystalograficzne, jak i wyniki uzyskane przeze mnie, wskazują na możliwość przebiegu reakcji według polarnego mechanizmu nukleofilowego wspomaganego przez cząsteczki wody,** które działają jako nośnik protonu pomiędzy α -CH aminy a atomem N5 w cząsteczce FAD. Cząsteczki rozpuszczalnika mogą także stanowić akceptor protonu, co polaryzuje ugrupowanie aminowe i sprawia, że grupa aminowa staje się efektywniejszym nukleofilem w ataku na pierścień FAD, co jest postulowane w pracy Edmondsona i wsp. [35]. Wyższe wartości KIE dla $V_{\max}$ niż dla $V_{\max}/K_m$ wskazują na

możliwość zachodzenia zmian konformacyjnych w centrum aktywnym enzymu, co związane jest ze zmianą orientacji grup bocznych aminokwasów aromatycznych podczas wiązania substratu.

4.3.3. *Metylowe pochodne L-Tyr w reakcji katalizowanej przez LAAO*

Oksydaza L-aminokwasowa (LAAO, EC 1.4.3.2) jest flawoenzymem katalizującym dwuetapową reakcję przekształcania L-aminokwasów w α -ketokwasy. W pierwszym etapie następuje utlenienie substratu do α -iminokwasu z jednoczesną redukcją FAD do FADH₂. Następnie α -iminokwas jest nieenzymatycznie przekształcany w α -ketokwas. Dodatkowo, w obecności tlenu zachodzi utlenienie cząsteczki FADH₂ do FAD, z jednoczesnym uwolnieniem H₂O₂ (rys. 10).



Rys. 10. Schemat reakcji katalizowanej przez LAAO.

LAAO uczestniczy w metabolizmie komórek, ma działanie przeciwbakteryjne, przeciwnowotworowe oraz przeciwwirusowe, za co odpowiada tworzący się podczas reakcji nadtlenek wodoru. W organizmie człowieka LAAO reguluje funkcje układu odpornościowego oraz indukuje apoptozę komórek. W literaturze można znaleźć doniesienia na temat mechanizmu działania tego enzymu, jednakże tak jak w przypadku MAO A, informacje te są rozbieżne i wskazują na możliwość zachodzenia procesu przeniesienia protonu jak i jonu wodorkowego [36, 37] z pozycji α C aminokwasu do atomu N5 pierścienia FAD. Ze względu na to, że zarówno polarny mechanizm nukleofilowy, jak i bezpośrednie przeniesienie wodorku generują efekty izotopowe, nie ma możliwości rozróżnienia tych dwóch mechanizmów na podstawie otrzymanych przeze mnie wartości KIE opisanych w pracy [H8]. Jednakże wartości KIE większe od jedności (tabela 1) wskazują na to, że do rozerwania wiązania α C-H dochodzi

w etapie decydującym o szybkości badanego procesu. Wyższa wartość KIE dla $V_{\max}/K_m$ sugeruje, że atom wodoru w pozycji α odgrywa rolę w procesie wiązania substratu w centrum aktywnym enzymu. Również wyższa wartość SIE dla $V_{\max}/K_m$ (tabela 2) wskazuje na udział rozpuszczalnika w tym procesie. Jest to zgodne z pracą Pawelek'a i wsp. [38] oraz Harris'a i wsp. [39] którzy na podstawie danych krystalograficznych wykazali, że cząsteczka wody tworzy wiązanie wodorowe z atomem N5 pierścienia FAD. Ponadto rozpuszczalnik tworzy wiązanie wodorowe z aminową grupą boczną lizyny w domenie wiążącej substrat. Lizyna, działając jako zasada, zwiększa nukleofilowość cząsteczki wody w jej ataku na iminowy produkt pośredni reakcji katalizowanej przez LAAO. Rozpuszczalnik może być również źródłem drugorzędowych efektów izotopowych. W procesie dehydrogenacji ugrupowanie $\alpha\text{-C-NH}_2$ jest przekształcane w $\alpha\text{-C=NH}_2^+$ ze zmianą hybrydyzacji z sp^3 na sp^2 . W związku z tym, że protony grupy aminowej -NH_3^+ łatwo ulegają wymianie na deuter w obecności rozpuszczalnika deuterowanego tworząc -ND_3^+ , drugorzędowy efekt KIE związany jest z rozerwaniem jednego z wiązań $\alpha\text{-C-ND}_3^+$.

Podsumowując, wyniki uzyskane przeze mnie jednoznacznie wykazują, że zarówno atom wodoru w pozycji α , jak i rozpuszczalnik odgrywają kluczową rolę w procesie wiązania substratu w centrum aktywnym LAAO.

4.4. Wpływ pochodnych L-Tyr na aktywność wybranych enzymów szlaku metabolicznego

Niezwykle ważną częścią moich badań było określenia wpływu halogenowych oraz metylowych pochodnych L-Tyr na kinetykę badanych reakcji enzymatycznych. W tym celu skorzystałam z wykresu podwójnych odwrotności Lineweavera - Burka, wykreślonego na podstawie równania (4):

$$1/v = 1/V_{\max} + K_m/(V_{\max} \cdot [S]) \quad (4)$$

Przecięcie prostej z osią x wyznacza wartość $-1/K_m$, przecięcie z osią y wartość $1/V_{\max}$, a nachylenie prostej określa parametr $K_m/V_{\max}$. W obecności inhibitorów o różnym stężeniu otrzymuje się układ prostych, który pozwala na określenie typu inhibicji. Jeśli dany związek działa jako inhibitor kompetycyjny, wówczas proste przecinają się na osi y, w miejscu $1/V_{\max}$. Działanie inhibitora niekompetycyjnego ujawnia się w postaci prostych przecinających się na osi x, w miejscu $-1/K_m$. Jeśli badany związek jest inhibitorem akompetycyjnym, to otrzymuje

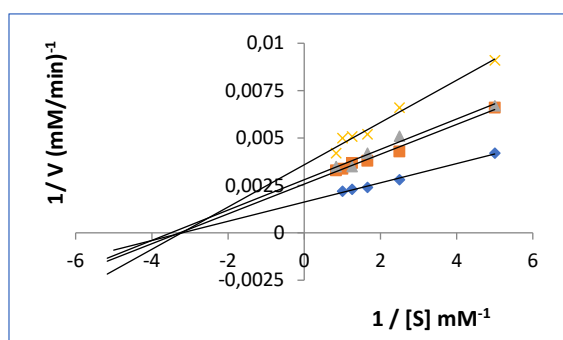
się układ prostych równoległych do siebie, a działanie inhibitora mieszanego powoduje, że proste przecinają się w dowolnym miejscu wykresu, innym niż osie x lub y. Stałe inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej dla badanych związków wyznaczyłam odpowiednio ze wzoru (5) i (6)

$$K_i = \frac{K_m \cdot [I]}{K'_m - K_m} \quad (5)$$

$$K'_i = \frac{V'_{max} \cdot [I]}{V_{max} - V'_{max}} \quad (6)$$

We wzorach tych K_m oznacza stałą Michaelisa, K'_m stałą Michaelisa w obecności inhibitora, $[I]$ stężenie inhibitora, V_{max} szybkość maksymalną reakcji a V'_{max} szybkość maksymalną reakcji w obecności inhibitora.

Zastosowanie tej metody graficznej pozwoliło mi ustalić, że 3'-jodo-L-Tyr jest mieszanym inhibitorem tyrozynazy (rys. 11). Wyniki badań zostały opisane w publikacji [H3]. Związek ten wiąże się nie tylko z wolnym enzymem, lecz także z kompleksem enzym–substrat. Wraz ze wzrostem stężenia inhibitora maleje szybkość maksymalna reakcji katalizowanej przez tyrozynazę oraz zmniejsza się powinowactwo tego enzymu do substratu, co ujawnia się we wzroście stałej K_m (tabela 3). Stałe inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej, wyznaczone ze wzorów 5 i 6, wynoszą odpowiednio $K_i = 5,6$ mM oraz $K'_i = 3,3$ mM.

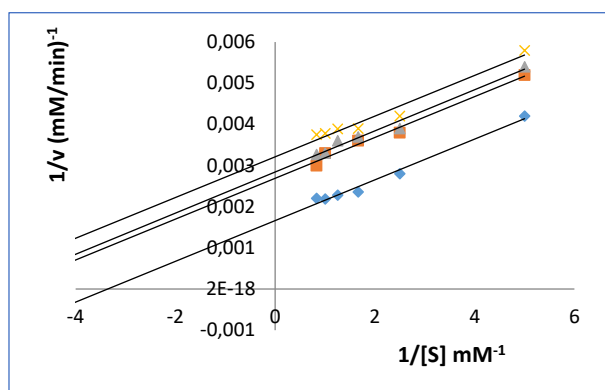


Rys. 11. Określenie typu inhibicji z zastosowaniem wykresu Lineweavera-Burka (stężenie 3'-jodo-L-Tyr: ♦ = 0 mM; ■ = 1 mM; ▲ = 2 mM; × = 3 mM)

Tabela 3. Parametry kinetyczne w reakcji hydroksylacji L-Tyr w obecności 3'-jodo-L-Tyr jako inhibitora

Związek	V_{max} (mM×min ⁻¹)	K_m (mM)
L-Tyr	558 ± 3	0,24 ± 0,02
L-Tyr/ 1mM 3'-jodo-L-Tyr	397 ± 33	0,28 ± 0,05
L-Tyr/ 2 mM 3'-jodo-L-Tyr	359 ± 13	0,32 ± 0,03
L-Tyr/ 3 mM 3'-jodo-L-Tyr	307 ± 4	0,39 ± 0,01

Ustaliłam także, że tyrozynaza ulega inhibicji pod wpływem *O*-metylo-L-Tyr. Wyniki tych badań zostały opisane w publikacji [H4]. Wraz ze wzrostem stężenia inhibitora maleje zarówno szybkość maksymalna reakcji, jak również stała Michaelisa (tabela 4), zatem *O*-metylo-L-Tyr wykazuje typ inhibicji akompetycyjnej (rys. 12) wiążąc się z kompleksem enzym-substrat w miejscu odrębnym od centrum aktywnego enzymu.

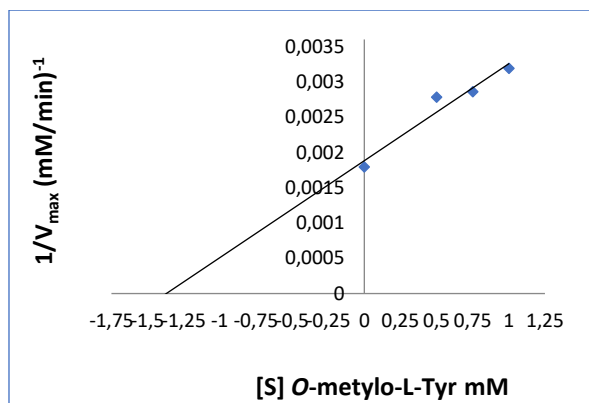


Rys. 12. Określenie typu inhibicji z zastosowaniem wykresu Lineweavera-Burka (stężenie *O*-metylo-L-Tyr: $\blacklozenge$ = 0 mM; $\blacksquare$ = 0,5 mM; $\blacktriangle$ = 0,75 mM; $\times$ = 1 mM)

Tabela 4. Parametry kinetyczne w reakcji hydroksylacji L-Tyr w obecności *O*-metylo-L-Tyr jako inhibitora

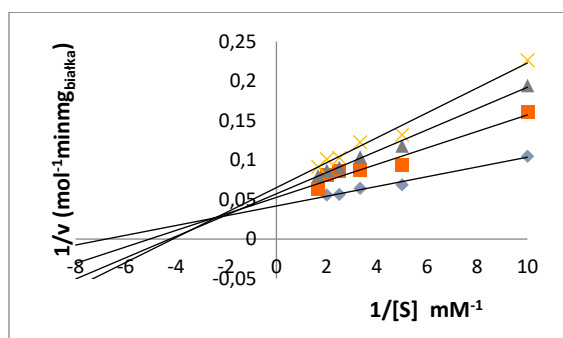
Związek	$V_{\max}$ (mMmin ⁻¹)	K_m (mM)	% inhibicji
L-Tyr	558 ± 3	$0,24 \pm 0,02$	-
L-Tyr/ 0,5 mM <i>O</i> - metylo-L- Tyr	359 ± 9	$0,19 \pm 0,01$	35
L-Tyr/ 0,75 mM <i>O</i> -metylo- L-Tyr	349 ± 5	$0,16 \pm 0,01$	37
L-Tyr/ 1 mM <i>O</i> - metylo-L- Tyr	313 ± 2	$0,15 \pm 0$	44

Stała inhibicji dla *O*-metylo-L-Tyr wynosi 1,37 mM i została wyznaczona na podstawie wykresu odwrotności szybkości maksymalnej od stężenia inhibitora (rys. 13). Jest to wartość znacznie mniejsza niż wyznaczona dla 3'-jodo-L-Tyr, zatem *O*-metylo-L-Tyr jest silniejszym inhibitorem tyrozynazy.



Rys. 13. Wykres zależności $1/V_{\max}$ od stężenia inhibitora (0; 0,5; 0,75 i 1 mM *O*-metylo-L-Tyr) w reakcji hydroksylacji L-Tyr katalizowanej przez tyrozynazę.

Zbadałam również wpływ α -metylo-L-Tyr oraz *N*-metylo-L-Tyr na aktywność oksydazy L-aminokwasowej. Uzyskane wyniki zostały opisane w pracy [H8]. Związki te wykazały działanie inhibitujące wobec badanego enzymu. α -Metylo-L-Tyr działa jako inhibitor mieszany (rys. 14). Wraz ze wzrostem jej stężenia maleje szybkość maksymalna reakcji, a parametr K_m rośnie (tabela 5) co oznacza, że inhibitor zmniejsza powinowactwo enzymu do substratu. α -Metylo-L-Tyr wiąże się z wolnym enzymem i „naśladuje” działanie inhibitora kompetycyjnego. Stałe inhibicji kompetycyjnej i niekompetycyjnej dla tego związku wynoszą odpowiednio $K_i = 3,12$ mM oraz $K_i' = 5,69$ mM.



Rys. 14. Określenie typu inhibicji z zastosowaniem wykresu Lineweavera-Burka (stężenie α -metylo-L-Tyr: $\blacklozenge = 0$ mM; $\blacksquare = 1$ mM; $\blacktriangle = 2$ mM; $\times = 3$ mM)

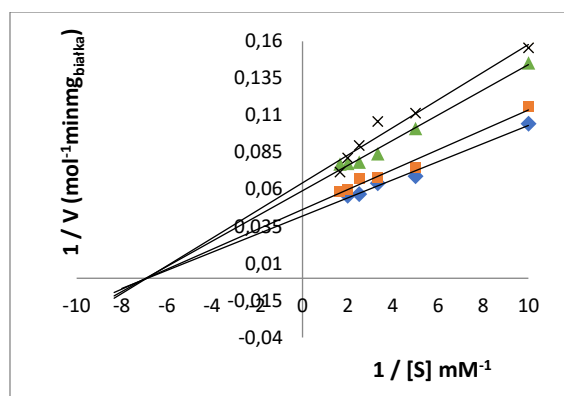
Tabela 5. Parametry kinetyczne w reakcji oksydacyjnej deaminacji L-Tyr w obecności α -metylo-L-Tyr jako inhibitora

Związek	$V_{\max}$ (mol min^{-1} mg białka^{-1})	K_m (mM)	% inhibicji
L-Tyr	$22,68 \pm 0,20$	$0,13 \pm 0,01$	-
L-Tyr/ 1 mM α - metylo-L- Tyr	$18,40 \pm 1,17$	$0,19 \pm 0,01$	19
L-Tyr/ 2 mM α - metylo-L- Tyr	$16,8 \pm 0,32$	$0,20 \pm 0,01$	26
L-Tyr/ 3 mM α - metylo-L- Tyr	$15,84 \pm 0,43$	$0,24 \pm 0,02$	30

N-metylo-L-Tyr działa jako inhibitor niekompetycyjny (rys. 15) ze stałą inhibicji $K_i' = 7,96$ mM i może oddziaływać zarówno z wolnym enzymem, jak i z kompleksem enzym–substrat, nie zmieniając powinowactwa enzymu do substratu (parametr K_m pozostaje niezmienny, tabela 6). Porównując wartości stałych inhibicji można stwierdzić, że α -metylo-L-Tyr jest silniejszym inhibitorem oksydazy L-aminokwasowej. Wskazują na to również wartości procentowej inhibicji (tabela 5 i 6), które są mniejsze dla pochodnej *N*-metylowanej.

Dane krystalograficzne [38, 39] wykazały, że proces wiązania substratu w kanale katalitycznym LAAO uwarunkowany jest oddziaływaniami elektrostatycznymi oraz hydrofobowymi. W procesie tym znaczącą rolę odgrywa także obecność wodoru w pozycji α C.

Podczas wiązania substratu reszta aminokwasowa argininy tworzy wiązanie wodorowe z grupą karboksylową substratu, natomiast grupa boczna glicyny tworzy wiązanie wodorowe z grupą aminową substratu. **Niezdolność *N*-metylo-L-Tyr oraz α -metylo-L-Tyr do wiązania się z cząsteczką enzymu w miejscu wiązania substratu potwierdza, że oddziaływania elektrostatyczne oraz wodór w pozycji α C są kluczowe dla procesu wiązania ligandu.**



Rys. 15. Określenie typu inhibicji z zastosowaniem wykresu Lineweavera-Burka (stężenie *N*-metylo-L-Tyr: $\blacklozenge$ = 0 mM; $\blacksquare$ = 1 mM; $\blacktriangle$ = 2 mM; $\times$ = 3 mM)

Tabela 6. Parametry kinetyczne w reakcji oksydacyjnej deaminacji L-Tyr w obecności *N*-metylo-L-Tyr jako inhibitora

Związek	$V_{\max}$ (molmin^{-1} mgbiałka^{-1})	K_m (mM)	% inhibicji
L-Tyr	$22,68 \pm 0,20$	$0,13 \pm 0,01$	-
L-Tyr/ 1 mM <i>N</i> - metylo-L- Tyr	$19,58 \pm 1,28$	$0,13 \pm 0,01$	13
L-Tyr/ 2 mM <i>N</i> - metylo-L- Tyr	$18,20 \pm 0,53$	$0,13 \pm 0,01$	20
L-Tyr/ 3 mM <i>N</i> - metylo-L- Tyr	$17,12 \pm 0,53$	$0,13 \pm 0,02$	24

Procent inhibicji określiłam na podstawie wzoru: $(\%) = [(V_1 - V_2)/V_1] \times 100$, gdzie V_1 to szybkość reakcji z L-Tyr a V_2 to szybkość reakcji z odpowiednią metylową pochodną L-Tyr.

Określiłam również aktywność enzymatyczną MAO A wobec halogenowych pochodnych tyraminy, co zostało opisane w pracy [H6]. 3'-Fluoro-TA oraz 3'-jodo-TA nie wykazały działania inhibitującego wobec MAO A, jednakże aktywność enzymu wobec halogenowych pochodnych TA była znacznie mniejsza niż w przypadku zastosowania TA jako substratu (tabela 7). Enzym ten wykazywał jedynie 11% swojej aktywności wobec fluoropochodnej TA oraz 4% wobec jodopochodnej. Wzrastała natomiast wartość stałej Michaelisa co świadczy o tym, że **powinowactwo MAO A do halogenopochodnych TA jest mniejsze niż do niepodstawionego substratu, zatem enzym ten znacznie mniej skutecznie metabolizuje halogenopochodne TA.** W związku z tym, w przypadku nadmiernej podaży

tego typu pochodnych, może dochodzić do akumulacji tych związków w organizmie człowieka.

Tabela 7. Parametry kinetyczne w reakcji deaminacji TA oraz jej halogenopochodnych, katalizowanej przez MAO A (procent aktywności został wyznaczony ze wzoru: (%) = $100 - [(V_1 - V_2)/V_1] \times 100$, gdzie V_1 to szybkość reakcji z TA a V_2 to szybkość reakcji z odpowiednią halogenopochodną.

Związek	$V_{\max}$ ($\mu\text{molmin}^{-1}\text{mgbiałka}^{-1}$)	K_m (mM)	aktywność enzymu (%)
TA	4200 ± 40	$0,019 \pm 0,001$	100
3'-fluoro-TA	440 ± 40	$0,060 \pm 0,003$	11
3'-jodo-TA	170 ± 10	$0,036 \pm 0,002$	4

Otrzymane wartości stałych inhibicji dla przetestowanych związków są relatywnie wysokie, osiągające wartości kilku milimoli. Radioznaczniki podawane są pacjentowi w ilościach mikro- bądź nanomolowych, ponieważ ich radioaktywności właściwe są bardzo wysokie, dochodzące do GBq/ μmol . W związku z tym, znakowane pochodne, omówione we wstępie, nie powinny zaburzać reakcji szlaku metabolicznego L-Tyr. Inaczej jest w przypadku α -metylo-L-Tyr, która pod nazwą handlową *Metyrozyna* jest lekiem stosowanym u chorych z guzami układu neuroendokrynnego [40, 41], redukującym objawy towarzyszące nadmierowej produkcji amin katecholowych (ból głowy, podwyższone ciśnienie). Dobowa dawka *Metyrozyny* wynosi 4 g, więc we krwi może osiągać stężenia przewyższające stałą inhibicji, a co za tym idzie, wpływać hamująco na reakcję katalizowaną przez oksydazę L-aminokwasową, szczególnie w przypadku przedawkowania tego leku. W związku z tym, że enzymy z grupy LAAO uczestniczą w organizmie człowieka w reakcjach immunologicznych oraz mechanizmach obronnych, zahamowanie procesu katalizowanego przez LAAO może mieć negatywne skutki zdrowotne.

Zaobserwowanie efektu inhibitującego w przypadku procesów enzymatycznych może być interesujące pod względem wykorzystania inhibitorów w różnych gałęziach przemysłu. Inhibitory enzymów często wykorzystywane są jako leki w chorobach

metabolicznych bądź neurodegeneracyjnych. Inhibitory MAO A znalazły zastosowanie jako antydepresanty [42], zwiększając poziom amin katecholowych (w tym dopaminy) w mózgu chorego. Inhibitory tyrozynazy stosuje się w przemyśle kosmetycznym jako środki rozjaśniające przebarwienia, które powstają podczas nadmiernej melanogenezy, związanej ze wzmożoną aktywnością tyrozynazy [43]. Ze względu na to, że wiele stosowanych inhibitorów wykazuje niekorzystne działania uboczne, poszukiwane są nowe związki mające inhibitujący wpływ na enzymy szlaku metabolicznego L-Tyr. W związku z tym, **uzyskane przeze mnie wyniki nad inhibitującym wpływem halogenowych i metylowych pochodnych L-Tyr mogą zapoczątkować badania nad wykorzystaniem tych związków jako potencjalnych leków bądź komponentów produktów kosmetycznych.**

Podsumowanie badań kinetycznych reakcji utlenienia L-Tyr do L-DOPY, katalizowanej przez tyrozynazę, oksydacyjnej deaminacji L-Tyr do kwasu 4'-hydroksyfenylopirogronowego, katalizowanej przez LAO oraz utlenienia tyraminy do aldehydu 4'-hydroksyfenylooctowego, katalizowanej przez MAO A, a także wpływu halogenowych i metylowych pochodnych L-Tyr na aktywność badanych enzymów stanowi praca przeglądowa [H10], która miała na celu przybliżenie szerszemu gronu odbiorców jak ważną tematyką, z punktu widzenia późniejszych zastosowań medycznych, są kinetyczne i rozpuszczalnikowe efekty izotopowe jako skuteczne narzędzie stosowane w badaniach mechanizmów reakcji enzymatycznych.

4.5. Podsumowanie

W przedstawionym powyżej cyklu publikacji zaprezentowałam rezultaty badań nad syntezą izotopomerów halogenowych i metylowych pochodnych L-Tyr oraz ich wykorzystaniem do badania mechanizmów wybranych reakcji enzymatycznych szlaku metabolicznego L-Tyr metodą kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych. Za swoje największe osiągnięcia uważam:

- ✓ opracowanie skutecznych metod syntezy, wydzielania i oczyszczania halogenowych oraz metylowych pochodnych L-Tyr, selektywnie znakowanych izotopami wodoru w pierścieniu lub łańcuchu bocznym, które nie były wcześniej opisane w literaturze,
- ✓ wyznaczenie po raz pierwszy kinetycznych i rozpuszczalnikowych efektów izotopowych w reakcji przemiany halogenowych pochodnych L-Tyr, katalizowanej przez tyrozynazę, których wyniki przyczyniły się do wyjaśnienia mechanizmu działania tego enzymu oraz wykazanie, że 3'-jodo-L-Tyr jest mieszanym inhibitorem tyrozynazy,

- ✓ wyznaczenie efektów izotopowych w reakcji przemiany metylowych pochodnych L-Tyr, katalizowanej przez tyrozinazę, których wyniki potwierdzają uzyskane dla halogenowych pochodnych wnioski dotyczące mechanizmu działania tego enzymu, oraz wykazanie, że O-metylo-L-Tyr jest akompetycyjnym inhibitorem tyrozinazy, co nie było opisane wcześniej w literaturze,
- ✓ potwierdzenie jednego z czterech postulowanych w literaturze mechanizmów działania MAO A poprzez wyznaczenie efektów izotopowych w reakcji deaminacji halogenowych pochodnych tyraminy,
- ✓ wyznaczenie po raz pierwszy efektów izotopowych w reakcji przemiany metylowych pochodnych L-Tyr, katalizowanej przez oksydazę L-aminokwasową, których wyniki jednoznacznie wskazują, że wodór w pozycji α C oraz rozpuszczalnik odgrywają istotną rolę w procesie wiązania substratu oraz wykazanie, że N-metylo-L-Tyr jest niekompetycyjnym, a α -metylo-L-Tyr jest mieszanym inhibitorem oksydazy L-aminokwasowej,
- ✓ wykazanie, że powinowactwo enzymów szlaku metabolicznego L-Tyr zmniejsza się względem substratów zawierających podstawnik halogenowy bądź metylowy, co może prowadzić do nadmiernej akumulacji halogenowych bądź metylowych pochodnych L-Tyr w organizmie.

Główny cel badań został osiągnięty. Ponad wszelką wątpliwość wykazałam, że wprowadzenie dodatkowego podstawnika do cząsteczki L-tyrozyny wpływa negatywnie na wybrane przeze mnie reakcje szlaku metabolicznego tego aminokwasu. Wnioski płynące z moich badań mogą stanowić wytyczne dla osób stosujących znakowane halogenowe oraz metylowe pochodne L-tyrozyny w diagnostyce medycznej. Planując syntezy nowych pochodnych L-Tyr, o potencjalnym zastosowaniu do obrazowania PET oraz SPECT, należy sprawdzić, czy nie będą one wpływały negatywnie na przemiany metaboliczne w organizmie chorego.

4.6. Literatura

- [1] V.L. Hearing, T.M. Ekel, *Biochem. J.* 1976, 157, 549.
- [2] M.A. Medina, J.L. Urdiales, C. Rodríguez-Caso, F.J. Ramírez, F. Sánchez-Jiménez, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 2003, 38, 23.
- [3] P.A. Riley, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1997, 29, 1235.
- [4] Y.H. Song, *The Lancet* 1997, 350, 82.
- [5] W.S. Oetting, *Pigment Cell Res.* 2000, 13, 320.

- [6] B. Thomas, *Antioxid. Redox Signal.* 2009, 11, 2077.
- [7] J. Castillo Meleán, J. Ermert, H.H. Coenen, *Org. Biomol. Chem.* 2011, 9, 765.
- [8] S. Kodaira, T. Nakajima, Y. Arisaka, A. Tokue, T. Higuchi, Y. Tsushima, *SpringerPlus* 2016, 5, 618.
- [9] S. Jordan, J.L. Eberling, K.S. Bankiewicz, D. Rosenberg, P.G. Coxson, H.F. VanBrocklin, J.P. O'Neil, M.E. Emborg, W.J. Jagust, *Brain Res.* 1997, 750, 264.
- [10] M.-C. Asselin, L.M. Wahl, V.J. Cunningham, S. Amano, C. Nahmias, *Phys. Med. Biol.* 2002, 47, 1961.
- [11] S. Asari, K.-ichi Fujimoto, A. Miyauchi, T. Sato, I. Nakano, S.-ichi Muramatsu, *BMC Neurol.* 2011, 11, 35.
- [12] Y. Ohshima, H. Hanaoka, S. Watanabe, Y. Sugo, S. Watanabe, H. Tominaga, N. Oriuchi, K. Endo, N.S. Ishioka, *Nucl. Med. Biol.* 2011, 38, 857.
- [13] M. Keyaerts, T. Lahoutte, B. Neyns, V. Caveliers, C. Vanhove, H. Everaert, K. Kersemans, P.R. Franken, J. Mertens, A. Bossuyt, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 2007, 34, 994.
- [14] S. Nakajima, N. Shikano, T. Kotani, M. Ogura, R. Nishii, M. Yoshimoto, N. Yamaguchi, Y. Iwamura, N. Kubota, N. Ishikawa, K. Kawai, *Nucl. Med. Biol.* 2007, 34, 1003.
- [15] N. Shikano, Y. Kanai, K. Kawai, N. Ishikawa, H. Endou, *Nucl. Med. Biol.* 2003, 30, 31.
- [16] M. Kanazawa, H. Ohba, N. Harada, T. Kakiuchi, S. Muramatsu, H. Tsukada, *J. Nucl. Med.* 2016, 57, 303.
- [17] K. Ishiwata, H. Tsukada, K. Kubota, T. Nariai, N. Harada, K. Kawamura, Y. Kimura, K. Oda, R. Iwata, K. Ishii, *Nucl. Med. Biol.* 2005, 32, 253.
- [18] D.K. Ness, G.L. Foley, D. Villar, L.G. Hansen, *Fundam. Appl. Toxicol.* 1996, 30, 153.
- [19] A.R. Mani, J.C. Moreno, T.J. Visser, K.P. Moore, *Free Radic. Biol. Med.* 2016, 90, 243.
- [20] H.H. Coenen, *PET studies on amino acid metabolism and protein synthesis*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 1993.
- [21] W.J. Keller, G.G. Ferguson, *J. Pharm. Sci.* 1976, 65, 1539.
- [22] W.J. Keller, G.G. Ferguson, *J. Pharm. Sci.* 1977, 66, 1048.
- [23] D.B. Northrop, *Biochemistry* 1975, 14, 2644.
- [24] W.W. Cleland, *Arch. Biochem. Biophys.* 2005, 433, 2.
- [25] R.L. Schowen, *J. Label. Compd. Radiopharm.* 2007, 50, 1052.
- [26] M.N. Kazarinoff, E.E. Snell, *J. Biol. Chem.* 1980, 255, 6228.
- [27] M. Pająk, M. Kańska, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2009, 281, 365.
- [28] M. Pająk, M. Kańska, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2009, 279 455.

- [29] D.W. Parkin, *Enzyme mechanism from izotope effects*, P.F. Cook (ed.), CRS Press, Boca Raton, 1991
- [30] M. Kańska, S. Dragulska, M. Pająk, K. Pałka, E. Winnicka, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2015, 305, 371.
- [31] L.G. Fenoll, M.J. Penalver, J.N. Rodriguez-Lopez, P.A. Garcia-Ruiz, F. Garcia-Canovas, J. Tudela, *Biochem. J.* 2004, 380, 643.
- [32] V.E. Atalay, S.S. Erdem, *Compt. Biol. Chem.* 2013, 47, 181.
- [33] E. Abad, R.K. Zenn, J. Kästner, *J. Phys. Chem. B.* 2013, 117, 14238.
- [34] S.-Y. Son, J. Ma, Y. Kondou, M. Yoshimura, E. Yamashita, T. Tsukihara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008, 105, 5739.
- [35] D.E. Edmondson, C. Binda, A. Mattevi, *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, 464, 269.
- [36] F. Castellano, V. Molinier-Frenkel, *Molecules*, 2017, 22, 2151.
- [37] L. Pollegioni, P. Motta, G. Molla, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 9323.
- [38] P.D. Pawelek, J. Cheah, R. Coulombe, P. Macheroux, S. Ghisla, A. Vrielink, *EMBO J.* 2000, 19, 4204.
- [39] C.M. Harris, L. Pollegioni, S. Ghisla, *Eur. J. Biochem.* 2001, 268, 5504.
- [40] K.N. Green, S.K. Larsson, D.G. Beevers, P.G. Bevan, B. Hayes, *Thorax.* 1982, 37, 632.
- [41] M. Naruse, F. Satoh, A. Tanabe, T. Okamoto, A. Ichihara, M. Tsuiki, T. Katabami, M. Nomura, T. Tanaka, T. Matsuda, T. Imai, M. Yamada, T. Harada, N. Kawata, K. Takekoshi, *Endocr. J.* 2018, 65, 359.
- [42] R.R. Ramsay, K.F. Tipton, *Molecules*, 2017, 22, 1192.
- [43] T. Pillaiyar, M. Manickam, V. Namasivayam, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2017, 32, 403.

5. Informacja o wykazaniu się istotną aktywnością naukową albo artystyczną realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej lub instytucji kultury, w szczególności zagranicznej

Współczesna strategia rozwoju nauki wymaga wielodyscyplinarności nurtów badawczych, dlatego też w 2009 roku nawiązałam współpracę naukową z Zakładem Biochemii II Wydziału Lekarskiego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Kooperacja ta miała służyć wymianie informacji oraz doświadczeń, rozwijaniu umiejętności badawczych i naukowych pracowników obu wydziałów, a także realizacji wspólnych przedsięwzięć badawczych. Ze względu na to, że moje prace są ukierunkowane na procesy związane

z diagnostyką medyczną, współpraca z WUM wydawała mi się jak najbardziej wskazana. Wymiana myśli naukowej pozwoliła na określenie, które procesy zachodzące w organizmie człowieka są szczególnie wrażliwe na zaburzenia, prowadzące do występowania objawów klinicznych. Dzięki współpracy możliwa była realizacja badań nad syntezą związków biologicznie aktywnych znakowanych izotopowo oraz badaniem ich wpływu na procesy biologiczne zachodzące w organizmie człowieka z wykorzystaniem infrastruktury badawczej Wydziału Chemii UW oraz II Wydziału Lekarskiego WUM. W wyniku współpracy powstało 7 prac naukowych dotyczących syntezy związków znakowanych oraz ich wykorzystania do badania mechanizmów reakcji enzymatycznych, z których 6 wchodzi do dorobku habilitacyjnego. Otrzymane przeze mnie wyniki badań nad mechanizmami reakcji enzymatycznych pozwolą na zaprojektowanie celowanej terapii chorób związanych z zaburzonym metabolizmem L-tyrozyny w oparciu o konkretny model działania enzymów szlaku metabolicznego tego aminokwasu i racjonalne projektowanie przyszłych leków. Aktualnie współpraca ma charakter głównie merytoryczny.

W ostatnim czasie podjęłam również współpracę z Katedrą Technologii Leków i Biotechnologii Farmaceutycznej na Wydziale Farmaceutycznym WUM. Celem prac badawczych naszego zespołu jest opracowanie nowego typu matryc, opartych na porowatym węglu przewodzącym (PWP) pokrytych odpowiednimi czynnikami aktywnymi, takimi jak immobilizowane enzymy czy komórki. Zaproponowane przez nas reaktory biochemiczne, czy to będące składnikiem ogniw przepływowych, czy użyte w celu metabolizowania związków chemicznych, zyskują nowe możliwości zastosowań. Dotychczasowe badania wskazują na możliwość zastosowania matryc w postaci paneli, o zadanym i niezmiennym kształcie w ogniwach przepływowych, gdzie będą stanowić elektrodę oraz w systemach przepływowych transformacji katalitycznej i biokatalitycznej zarówno w syntezie, jak i metabolizmie leków w ściekach. Wytworzony przez nas materiał elektrodowy oparty na PWP z immobilizowanym enzymem może przyczynić się również do rozwoju technologii bioogniów paliwowych.

W 2017 roku, równoległe z wykonywaniem badań do habilitacji, podjęłam pracę w grupie prof. dr. hab. Andrzeja Czerwińskiego w Pracowni Elektrochemicznych Źródeł Energii (PEZE), gdzie zajęłam się pionierską tematyką wykorzystania cieczy jonowych w bateriach wodorkowych. Moje doświadczenie w chemii organicznej, oraz znajomość tematyki dotyczącej cieczy jonowych, pozwoliło zaoferować nowe podejście do zagadnień elektrochemicznych. Wymagało to ode mnie zapoznania się z problemami elektrochemicznymi oraz z technikami pomiarowymi, których do tej pory nie stosowałam w swojej pracy badawczej. W związku z tym, w 2019 roku odbyłam staż naukowy w Instytucie Inżynierii Materiałów

Wydziału Nauk Ścisłych i Technicznych Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach, gdzie zapoznałam się z niestosowanymi w PEZE zaawansowanymi metodami pomiaru lokalnego napięcia kontaktowego sondą Kelvina oraz lokalną elektrochemiczną spektroskopią impedancyjną, które zamierzam wykorzystywać w dalszej pracy badawczej wykonując pomiary korozyjne materiałów elektrodowych stosowanych w ogniwach wodorkowych. Ponadto, w Instytucie Inżynierii Materiałów UŚ została przeprowadzona część badań korozyjnych stopów palladu z innymi metalami szlachetnymi, które kontynuowane dalej były na Wydziale Chemii UW. Obecnie, na podstawie uzyskanych wyników, przygotowwany jest manuskrypt, który zostanie wysłany do specjalnego wydania czasopisma *Materials*. Zapoczątkowana współpraca jest kontynuowana i będzie rozwijana w najbliższej przyszłości poprzez realizację wspólnych projektów badawczych.

Kolejnym aspektem mojej działalności naukowej jest praca w ramach grupy badawczej Radiochemia dla Medycyny i Przemysłu. Głównym celem działalności są prace w zakresie opracowania metod syntezy i znakowania związków biologicznie czynnych wykorzystywanych w technikach PET i SPECT oraz weryfikacja ich oddziaływania w układzie in-vivo z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Nasza grupa posiada nowoczesny sprzęt, co umożliwia prowadzenie badań na światowym poziomie w dziedzinie obrazowania molekularnego oraz syntezy związków znakowanych radioizotopowo. Moje doświadczenie w radiochemicznej syntezie organicznej oraz biosyntezie pozwala planować badania nad otrzymywaniem nowych farmaceutyków o potencjalnym wykorzystaniu w medycynie nuklearnej. Jednocześnie zamierzam kontynuować swoją tematykę habilitacyjną poprzez opracowanie szybkiej syntezy jednego z badanych przez mnie związków w celu wprowadzenia promieniotwórczego znacznika np. ^{11}C , dzięki czemu będzie można śledzić jego metabolizm w organizmie z zastosowaniem techniki PET. Ponadto, zamierzam opracować nowe metody syntezy związków biologicznie aktywnych z zastosowaniem cieczy jonowych jako środowiska reakcyjnego. Udowodniono, że zastąpienie tradycyjnego rozpuszczalnika znacznie przyspiesza oraz podnosi wydajność reakcji, a także pozwala na otrzymanie związków o określonej czystości optycznej, co jest niezwykle ważne w przypadku syntez radiofarmaceutyków. Dodatkowo, ciecze jonowe mogą zastąpić konwencjonalny rozpuszczalnik w przebiegu reakcji z wykorzystaniem enzymów, pozwalając wyeliminować działanie toksyczne rozpuszczalników organicznych.

Aktualnie prowadzę wielodyscyplinarne badania, których wyniki mogą mieć zastosowanie w różnych dziedzinach nauki, w tym medycynie czy przemyśle.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę lub sztukę

Już jako doktorantka wykazywałam się aktywnością dydaktyczną. Prowadziłam zajęcia laboratoryjne z Chemii Organicznej I dla studentów Międzywydziałowych Studiów Ochrony Środowiska oraz zajęcia z Biochemii dla studentów Wydziału Chemii. Sprawowałam także opiekę nad 3 pracami magisterskimi. Po zatrudnieniu na Wydziale Chemii UW w latach 2009-2017, prowadziłam zajęcia na Pracowni i Laboratorium z Biochemii dla studentów I roku studiów II stopnia oraz Laboratorium Specjalizacyjnym w Zakładzie Dydaktycznym Chemii Organicznej. Obecnie prowadzę zajęcia z Chemii Fizycznej dla studentów Wydziału Chemii. Dodatkowo, w latach akademickich 2009/2010-2016/2017 sprawowałam opiekę nad 3 pracami magisterskimi, kierowałam 5 pracami magisterskimi oraz 11 pracami licencjackimi.

Aktywnie uczestniczyłam także w upowszechnianiu nauki. W latach 2009-2016 pełniłam funkcję Koordynatora Pikniku Naukowego Polskiego Radia i Centrum Nauki Kopernik.

Prowadziłam także:

- Zajęcia laboratoryjne z uzdolnioną młodzieżą z Krajowego Funduszu na Rzecz Dzieci (lata 2009 -2016)
- Zajęcia laboratoryjne na Forum Młodych Chemików w 2014 roku
- Zajęcia laboratoryjne z uzdolnioną młodzieżą w ramach III etapu Uniwersytetu Młodego Chemika (rok akademicki 2019/2020)
- Warsztaty fizyko-chemiczne z Manufakturą Naukowców w 2020 roku

Moja działalność organizacyjna obejmowała:

- pomoc podczas organizacji 50 Zjazdu Absolwentów UW oraz uroczystości obchodów 200-lecia chemii uniwersyteckiej w Warszawie
- organizację części pokazów w ramach Festiwalu Nauki
- pełnienie funkcji członka Kolegium Elektorów Wydziału Chemii w kadencji 2016-2020
- od 2014 roku pełnienie funkcji protokolantki obron doktorskich

7. Inne informacje dotyczące kariery zawodowej

Jak wspomniałam w punkcie 5, w 2017 roku podjęłam prace badawcze nad zastosowaniem cieczy jonowych w bateriach wodorkowych, które prowadziłam równolegle z pracą habilitacyjną. Moje doświadczenie w pracy chemika-syntetyka pozwoliło na zaplanowanie późniejszych syntez cieczy jonowych, które nie są dostępne handlowo oraz dobór cieczy jonowej o najbardziej korzystnej budowie przestrzennej do zastosowań w pomiarach elektrosorpcji wodoru. Jest to niezwykle ważny temat z punktu widzenia możliwych zastosowań aplikacyjnych. Układem modelowym dla baterii wodorkowych jest układ pallad-wodór, a badanie sorpcji i desorpcji wodoru z palladu przyczynią się do poznania procesów zachodzących podczas ładowania i rozładowywania ogniw wodorkowych, w których są stosowane stopy metali przejściowych jako elektroda ujemna (anoda). Elektrode dodatnią stanowi układ redoks oksywodorotlenek niklu/wodorotlenek niklu ($\text{NiOOH}/\text{Ni}(\text{OH})_2$). W bateriach wodorkowych elektrolit stanowi stężony roztwór wodorotlenku potasu, który jest elektrolitem powodującym korozję metali. Zastosowanie cieczy jonowej jako elektrolitu może ochronić powierzchnię metalu przed korozją. Pozwoli jednocześnie na zastosowanie innego układu redoks jako elektrody dodatniej. Uzyskane przeze mnie wyniki badań nad elektrosorpcją wodoru z cieczy jonowych zostały opublikowane w 3 bardzo dobrych czasopismach elektrochemicznych (J. Electroanal. Chem., Electrochim. Acta, Electrochem. Commun.).

Ciecze jonowe coraz częściej są również stosowane jako rozpuszczalniki w ogniwach litowo-jonowych, co prowadzi do poprawy parametrów ich pracy oraz obniżenia kosztów ich otrzymywania. Takie prace nad układami Li/ciecz jonowa/ katoda, które byłyby prowadzone wspólnie z grupą zajmującą się ogniwami litowymi, zamierzam podjąć w niedalekiej przyszłości. Celem tych badań byłoby wytworzenie niepalnych i niepalnych elektrolitów ciekłych z cieczą jonową lub ich mieszaniną oraz rozpuszczoną solą nieorganiczną do ich zastosowania w wysokoenergetycznych akumulatorach energii jakimi są m.in. ogniwa litowo-jonowe. Otrzymany elektrolit zastąpiłby obecnie stosowane składające się z palnych i droższych rozpuszczalników organicznych. Zwiększyłoby to m. in. bezpieczeństwo użytkowania baterii litowo-jonowych. Tego typu układy cieszą się coraz większym zainteresowaniem środowiska naukowego.

Ta niezwykle interesująca tematyka badawcza może w przyszłości zaowocować oryginalnymi osiągnięciami projektowymi, konstrukcyjnymi bądź technologicznymi oraz stanowić podstawę zgłoszenia patentowego.

Małgorzata Pańka