

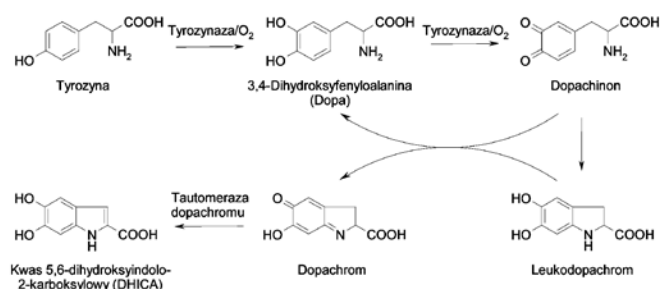
Błędy w badaniach reakcji enzymatycznych wynikające z nieprzewidzianych reakcji utleniania-redukcji

Beata GAŚOWSKA-BAJGER, Hubert WOJTASEK* – Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2014, 68, 4, 341–346

Ten artykuł jest dedykowany prof. Pawłowi Kafarskiemu z okazji jego 65-tych urodzin.

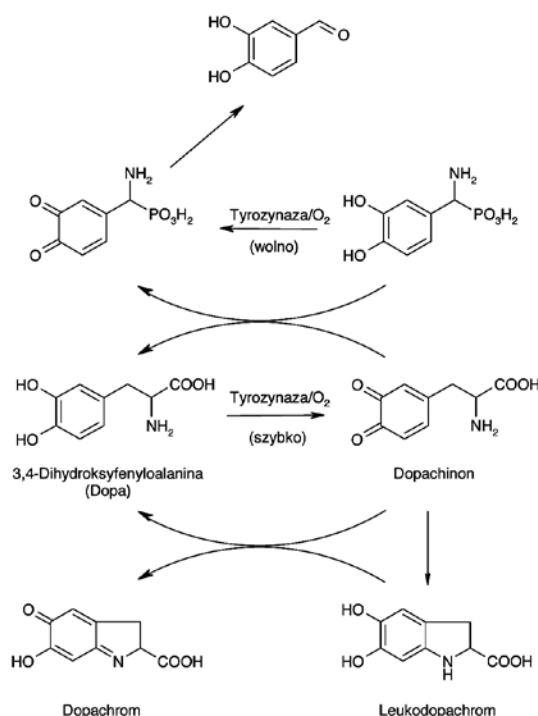
Zakład Biochemii Wydziału Chemii Uniwersytetu Opolskiego od ponad 10 lat zajmuje się analizą reakcji katalizowanych przez tyrozinazę (oksydoreduktazę monofenol, L-dopa:O₂, EC 1.14.18.1). Jest to kluczowy enzym w procesie melanizacji, katalizujący jego dwie pierwsze reakcje: *o*-hydroksylację tyrozyny do 3,4-dihydroksyfenyloalaniny (dopy) i utlenienie dopy do dopachinonu (Rys. 1) [1].



Rys. 1. Początkowe reakcje szlaku melanizacji [1]

Badania te rozpoczęto od analizy mechanizmu działania inhibitorowego fosfonowych aminokwasów aromatycznych na ten enzym. W 1987 r. opisano, że kwas amino-(3,4-dihydroksyfenylo)metanofosfonowy jest silnym inhibitorem tyrozinazy, podczas gdy pochodne monofenolowe (kwas amino-(3-hydroksyfenylo)metanofosfonowy i kwas amino-(4-hydroksyfenylo)metanofosfonowy) praktycznie nie wykazywały takiej aktywności [2]. Dane te zaintrygowały Autorów, ponieważ mechanizm działania tyrozinazy [1] w żaden sposób nie tłumaczył takich różnic. Przeprowadzono dokładną analizę utleniania naturalnych substratów tyrozinazy (tyrozyny i dopy) w obecności tych związków za pomocą metod spektrofotometrycznych i elektrochemicznych i wykazano, że silna inhibicja enzymu przez kwas amino-(3,4-dihydroksyfenylo)metanofosfonowy jest pozorna. Wyznaczone wcześniej stałe inhibicji zostały obliczone na podstawie pomiarów spektrofotometrycznych. W analizie reakcji katalizowanych przez tyrozinazę rutynowo wykorzystuje się pomiary spektrofotometryczne stężenia dopachromu, który nie jest produktem reakcji enzymatycznej, ale powstaje z bezpośredniego produktu tej reakcji (dopachinonu) w wyniku nieenzymatycznej cyklizacji (do leukodopachromu) i utlenienia (Rys. 1). Obie reakcje są wrażliwe na działanie czynników nukleofilowych i redukujących. Silne nukleofile (np. grupy tiolowe lub aminy) mogą konkurować z grupą aminową dopachinonu w jej ataku na układ *o*-chinonowy. Związki redukujące mogą natomiast redukować dopachinon z powrotem do dopy, nie dopuszczając w ten sposób do jego cyklizacji, bądź do utlenienia przezeń leukodopachromu. Wszystkie te reakcje przeciwdziałają powstaniu dopachromu, a więc, jeśli postęp reakcji enzymatycznej jest monitorowany poprzez pomiar jego absorbancji, to obserwuje się silny efekt inhibicji. W przypadku fosfonowych analogów aminokwasów aromatycznych okazało się, że kwas amino-(3,4-dihydroksyfenylo)metanofosfonowy redukuje dopachinon utleniając się do odpowiedniego chinonu, który rozpadł się

następnie do 3,4-dihydroksybenzaldehydu (Rys. 2) [3]. Pochodne monofenolowe (kwas amino-(3-hydroksyfenylo)metanofosfonowy i kwas amino-(4-hydroksyfenylo)metanofosfonowy) oczywiście nie ulegały tym reakcjom, a więc nie obserwowano w ich przypadku efektu inhibicji.

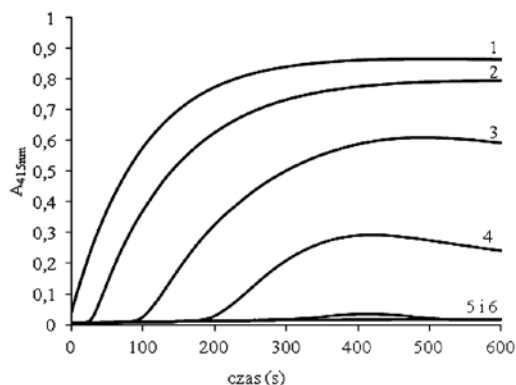


Rys. 2. Reakcje zachodzące w mieszaninie zawierającej tyrozinazę, dopę i kwas amino-(3,4-dihydroksyfenylo)metanofosfonowy [3]

Zafalszowania w analizie kinetyki reakcji enzymatycznych przez nieprzewidziane reakcje utleniania-redukcji dobrze ilustrują wyniki, jakie uzyskano w czasie badania wpływu związków z ugrupowaniem hydrazynowym na aktywność peroksydaz ssaków. Sól diamoniowa kwasu 2,2-azyno-bis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego) (ABTS) jest standardowo używana do monitorowania aktywności laktoperoksydazy. Badając aktywność tego enzymu wobec tego substratu w obecności karbidopy, leku przeciwko chorobie Parkinsona zawierającego ugrupowanie katecholowe i hydrazynowe, zaobserwowano opóźnione pojawienie się produktu utlenienia ABTS (ABTS⁺, Rys. 3), co mogło świadczyć o tym, że karbidopa jest preferencyjnie utleniana przez ten enzym, aż do jej wyczerpania, albo redukuje ABTS⁺. Odbarwienie roztworu ABTS⁺ po dodaniu karbidopy wykazało, że ta druga reakcja na pewno przynajmniej częściowo jest odpowiedzialna za obserwowaną w przypadku reakcji enzymatycznej łag fazę. Przegląd literatury potwierdził, że efekt taki stwierdzono wcześniej dla innych reduktorów [4, 5], a ABTS⁺ jest standardowo używany do oznaczania aktywności przeciwutleniającej [6]. Na podstawie tego typu pomiarów rutynowo obliczane są parametry inhibicji (K_i, IC₅₀, patrz przypadek fosfonowych aminokwasów powyżej). Tymczasem z Rysunku 3 wynika jednoznacznie, że wartości tych parametrów

Autor do korespondencji:
Dr hab. Hubert WOJTASEK, e-mail: Hubert.Wojtasek@uni.opole.pl

będą bardzo różne, w zależności od wybranego czasu pomiaru i zakresu stężeń, i wszystkie będą błędne. Taką metodą nie można ich po prostu wyznaczyć.



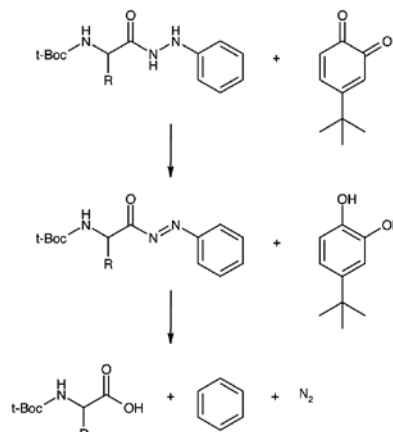
Rys. 3. Zmiany absorancji przy $\lambda=415$ nm w czasie utleniania ABTS (25 μM) przez laktoperoksydazę wołową (0,1 μM) bez karbidopy (1) i w jej obecności: 2–2 μM , 3–4 μM , 4–6 μM , 5–8 μM , 6–10 μM

Podobne przypadki, w których nieprzewidziane reakcje redoks doprowadziły do błędnej interpretacji wyników, spotkano jeszcze wielokrotnie w literaturze. Zazwyczaj pojawiają się one właśnie wtedy, gdy reakcje enzymatyczne (zwykle z udziałem oksydoreduktaz, ale nie tylko) są monitorowane spektrofotometrycznie przy jednej długości fali, według rutynowej metodyki. Tymczasem wielu tych pomyłek można by uniknąć, wykonując chociażby widma UV-Vis analizowanych mieszanin reakcyjnych lub też rozszerzając analizę o inne metody, np. elektrochemiczne lub chromatograficzne. Dalej przedstawiono kilka interesujących przykładów z literatury oraz własnych doświadczeń Autorów w tym zakresie.

W 2004 r. jeden z autorów (H.W.) natknął się na artykuł opisujący efekt działania tetrahydropterydyn na aktywność tyrozynazy [7], który był oczywistą krytyką badań opublikowanych przez innych autorów [8]. Zespół brytyjski udowodnił, że tetrahydropterydyny hamują allosterycznie aktywność tyrozynazy [7], podczas gdy grupa z Korei Południowej wykazała, że inhibicja jest pozorna, a obserwowany efekt wynika z redukcji dopachinonu przez tetrahydropterydyny [8]. Publikacja zespołu brytyjskiego zawierała jednak liczne błędy i niedociągnięcia – w badaniach tych nie zastosowano m.in. pomiarów zużycia tlenu, opierając się wyłącznie na punktowych pomiarach spektrofotometrycznych. Skłoniło to autora do napisania artykułu polemicznego przedstawiającego te uchybienia oraz brak odniesień do wielu faktów opisanych wcześniej w literaturze [9]. Niestety, krytyka ta nie doprowadziła do korekty popełnionych błędów. Wręcz przeciwnie – w odpowiedzi zespół brytyjski powielił poprzednie błędy i dołożył nowe [10]. Co ciekawe, stymulację monofenolazowej aktywności tyrozynazy przez tetrahydropterydynę w sposób analogiczny do innych czynników redukujących, takich jak np. kwas askorbinowy, zaobserwowano prawie cztery dekady wcześniej [11]. Zjawisko to jest zgodne z modelem zaproponowanym przez zespół koreański, a sprzeczne z doniesieniem zespołu brytyjskiego.

W swoich badaniach Autorzy niniejszej publikacji postanowili wykorzystać reakcje utleniania-redukcji, w których uczestniczyłyby produkty utlenienia fenoli lub katecholi przez tyrozynazę. Wkrótce po wyjaśnieniu mechanizmu „inhibicji” tyrozynazy przez kwas amino-(3,4-dihydroksyfenylo)metanofosfonowy natknęli się na artykuły opisujące zastosowanie tego enzymu do utlenienia hydrazydów aminokwasów [12, 13]. Reakcja ta została wykorzystana w syntezie peptydów, jednak jej wydajność była bardzo niska. Uznali więc, że proces ten można udoskonalić wykorzystując pośrednie utlenienie ugrupowania hydrazynowego przez tyrozynazę, stosując jako przenośnik elektronów fenol lub katechol (Rys. 4). Przeprowadzili takie reakcje m.in. z 4-*tert*-butylo-katecholem, który tyrozynaza utlenia do stabilnego 4-*tert*-butylo-*o*-benzoquinonu, odpornego na atak nukleofilów, np. wody. W obecności

śladowych ilości tego katecholu reakcja deprotekcji fenylolohydrazdów aminokwasów zachodziła wielokrotnie szybciej przy użyciu znacznie mniejszych ilości enzymu [14].

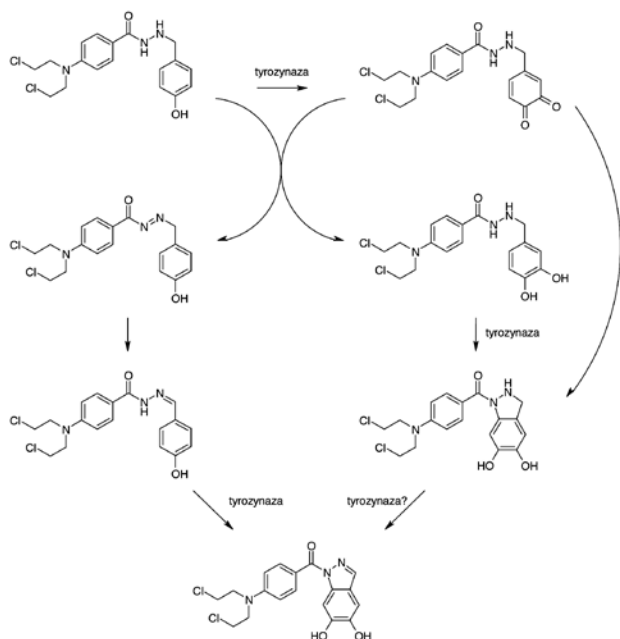


Rys. 4. Reakcja zachodząca pomiędzy wygenerowanym enzymatycznie 4-*tert*-butylo-*o*-benzoquinonem i fenylolohydrazdem aminokwasu [14]

W literaturze pochodne hydrazyny pojawiały się wielokrotnie w kontekście reakcji katalizowanych przez tyrozynazę. Enzym ten został między innymi zastosowany w biosensorze elektrochemicznym do wykrywania pochodnych hydrazyny, zaobserwowano bowiem, że wytwarzanie *o*-chinonów przez ten enzym zostaje zahamowane w obecności tych związków [15]. Naturalny hydrazyd aminokwasu, agarytyna (5-[2-(4-hydroksymetylo)fenylo]hydrazyd kwasu L-glutaminowego), występujący pospolicie w wielu grzybach z rodzaju *Agaricus* (pieczarka), został także opisany jako inhibitor oksydazy polifenolowej [16] i procesu melanizacji [17]. W obydwu przypadkach obserwowany efekt inhibicji był najprawdopodobniej również pozorny, wynikający z redukcji dopachinonu przez pochodne hydrazyny, a nie z bezpośredniego wpływu tych związków na aktywność enzymu. W obydwu przypadkach błędy w interpretacji wyników znów zostały spowodowane niezajomością literatury, ponieważ redukcja dopachinonu przez pochodne hydrazyny została już opisana dwie dekady wcześniej [18]. Niestety, jak to kiedyś powiedział prof. Mirosław Soroka, „ważne czytanie literatury naukowej staje się rzadkością” (patrz przypadek tetrahydropterydyn powyżej). Uczeni wolą raczej pisać niż czytać, bo to się po prostu oplaca.

Rozpad fenylolohydrazdów aminokwasów po ich pośrednim utlenieniu przez tyrozynazę nasunął Autorom pomysł zastosowania podobnej reakcji do uwalniania związków przeciwnowotworowych z proleków przeciwko czerniakowi. Ponieważ tyrozynaza jest enzymem występującym tylko w melanocytach, jej zastosowanie do aktywacji takich związków było rozważane od dawna [19]. Zaproponowane przez Autorów proleki miały się składać z aktywatora (ugrupowania fenolowego lub katecholowego utlenianego przez tyrozynazę), efektora w postaci leku przeciwnowotworowego (np. iperytu azotowego lub 5-fluorouracylu) i łącznika hydrazynowego. Zanim przystąpili oni do konstrukcji takich związków, postanowili przeprowadzić reakcje na dostępnym komercyjnie związku modelowym, zawierającym ugrupowanie fenolowe lub katecholowe i hydrazynowe. Wybrali karbidopę, której działanie na laktoperoksydazę opisali wcześniej. W wyniku działania tyrozynazy na tę alkilową pochodną hydrazyny otrzymali mieszaninę produktów, będących wynikiem utlenienia, a następnie usunięcia ugrupowania hydrazynowego (kwas 3-(3,4-dihydroksyfenylo)-2-metylopropanowy), a także ataku nukleofilowego tego ugrupowania na wygenerowany enzymatycznie *o*-chinon (5,6-dihydroksy-3-metylocinolinę, produkt reakcji cyklizacji) [20]. Aby uniknąć reakcji cyklizacji, która konkurowałaby z uwolnieniem efektora z proleku, zdecydowali się przygotować tylko acylowane pochodne hydrazyny. Zsyntezowali pochodną iperytu azotowego – *N*-{4-[bis-(2-chloroetylo)amino]benzoilo}-*N'*-(4-hydroksybenzylo)hydrazynę, przeprowadzili reakcje utlenienia tego

związku przez tyrozinazę i zidentyfikowali produkty tej reakcji. Ku zaskoczeniu głównym produktem był 4-[bis-(2-chloroetylo)amino]benzo-5,6-dihydroksi-1H-indazol-1-ylu, powstały w wyniku ataku nukleofilowego zacylowanego atomu azotu łącznika hydrazynowego na wygenerowany enzymatycznie *o*-chinon. Przejściowo powstawała także *N*-{4-[bis-(2-chloroetylo)amino]benzoilo}-*N'*-(4-hydroksybenzylideno)hydrazyna – najprawdopodobniej w wyniku międzycząsteczkowej reakcji redoks pomiędzy *o*-chinonem i grupą hydrazynową cząsteczki substratu, a następnie tautometryzacji powstałego diazenu do hydrazonu (Rys. 5) [21]. Żaden z tych związków nie uwalniał jednak efektora przeciwnowotworowego (iperytu azotowego). Zachodzące reakcje okazały się więc zupełnie różne od tych, które Autorzy przewidywali i projekt, w zasadzie, zakończył się niepowodzeniem. Reakcji cyklizacji raczej nie byli w stanie przewidzieć – wszystkie dane literaturowe wskazywały, że nie powinno do niej dojść. Jednak wyniki sugerujące, że tautomeryzacja benzylodiazenu do hydrazonu może zachodzić, i to szybciej niż hydroliza, zostały wcześniej opisane [22]. Niestety Autorzy, dotarli do nich przypadkowo, gdy projekt był już w zasadzie zrealizowany, bo artykuł nie miał bezpośredniego związku z tematyką ich badań.



Rys. 5. Reakcje zachodzące podczas utleniania potencjalnego proleku przeciwko czerniakowi, *N*-{4-[bis-(2-chloroetylo)amino]benzoilo}-*N'*-(4-hydroksybenzylideno)hydrazyny, przez tyrozinazę [21]

Literatura naukowa rozrasta się do rozmiarów, które czasami trudno ogarnąć. Uczni, zarówno autorzy publikacji, jak i recenzenci i redaktorzy czasopism, mają coraz mniej czasu. Badania są więc prowadzone i opisywane w coraz większym pośpiechu. Jeśli nic się nie zmieni w systemach oceny pracowników naukowych, błędy będą coraz bardziej powszechne, a nauka coraz mniej wiarygodna.

Literatura

- Sanchez-Ferrer, A., Rodriguez-Lopez, J. N., Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F.: *Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism*. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, **1247**, 1–11.
- Lejczak, B., Kafarski, P., Makowiecka, E.: *Phosphonic analogues of tyrosine and 3,4-dihydroxyphenylalanine (dopa) influence mushroom tyrosinase activity*. *Biochem. J.* 1987, **242**, 81–88.
- Gasowska, B., Wojtasek, H., Hurek, J., Drag, M., Nowak, K., Kafarski, P.: *Redox reaction between amino-(3,4-dihydroxyphenyl)methyl phosphonic acid and dopaquinone is responsible for the apparent inhibitory effect on tyrosinase*. *Eur. J. Biochem.* 2002, **269**, 4098–104.
- Reszka, K. J., Britigan, B. E.: *Doxorubicin inhibits oxidation of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS) by a lactoperoxidase/H₂O₂ system by reacting with ABTS-derived radical*. *Arch. Biochem. Biophys.* 2007, **466**, 164–71.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, **26**, 1231–7.
- Bartosz, G.: *Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine*. *Free Radic. Res.* 2010, **44**, 711–20.
- Wood, J. M., Chavan, B., Hafeez, I., Schallreuter, K. U.: *Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines and H₂O₂*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, **325**, 1412–7.
- Jung, J. H., Choi, S. W., Han, S.: *Indirect oxidation of 6-tetrahydrobiopterin by tyrosinase*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, **314**, 937–42.
- Wojtasek, H.: *Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines—what is real? A comment on the work published by Wood et al. on December 24, 2004*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, **329**, 801–3.
- Wood, J. M., Chavan, B., Hafeez, I., Schallreuter, K. U.: *Regulation of tyrosinase by tetrahydropteridines—what is real? A critical reanalysis of H. Wojtasek's view*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, **331**, 891–3.
- Pomerantz, S. H.: *The tyrosine hydroxylase activity of mammalian tyrosinase*. *J. Biol. Chem.* 1966, **241**, 161–8.
- Müller, G. H., Waldmann, H.: *The phenyl hydrazide as an enzyme-labile protecting group – oxidative cleavage with mushroom tyrosinase*. *Tetrahedron Lett.* 1999, **40**, 3549–4552.
- Volkert, M., Koul, S., Müller, G. H., Lehnig, M., Waldmann, H.: *Phenylhydrazide as an enzyme-labile protecting group in peptide synthesis*. *J. Org. Chem.* 2002, **67**, 6902–10.
- Gasowska, B., Frackowiak, B., Wojtasek, H.: *Indirect oxidation of amino acid phenylhydrazides by mushroom tyrosinase*. *Biochim. Biophys. Acta* 2006, **1760**, 1373–9.
- Wang, J., Chen, L.: *Hydrazine detection using a tyrosinase-based inhibition biosensor*. *Anal. Chem.* 1995, **67**, 3824–3827.
- Espin, J. C., Jolivet, S., Wichers, H. J.: *Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by agaritine*. *J. Agric. Food Chem.* 1998, **46**, 2976–2980.
- Espin, J. C., Jolivet, S., Overeem, A., Wichers, H. J.: *Agaritine from Agaricus bisporus is capable of preventing melanin formation*. *Phytochemistry* 1999, **50**, 555–563.
- Patel, R. P., Okun, M. R.: *Hydroxylation of tyrosine by plant peroxidase and mushroom tyrosinase, with and without hydrazine, to retard the oxidation of dopa*. *Physiol. Chem. Phys.* 1977, **9**, 85–9.
- Riley, P. A.: *Melanogenesis and melanoma*. *Pigment Cell Res.* 2003, **16**, 548–52.
- Gasowska-Bajger, B., Frackowiak-Wojtasek, B., Koj, S., Cichon, T., Smolarczyk, R., Szala, S., Wojtasek, H.: *Oxidation of carbidopa by tyrosinase and its effect on murine melanoma*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2009, **19**, 3507–10.
- Frackowiak-Wojtasek, B., Gasowska-Bajger, B., Mazurek, M., Raniszewska, A., Logghe, M., Smolarczyk, R., Cichon, T., Szala, S., Wojtasek, H.: *Synthesis and analysis of activity of a potential anti-melanoma prodrug with a hydrazine linker*. *Eur. J. Med. Chem.* 2014, **71**, 98–104.
- Kucukguzel, S. G., Kucukguzel, I., Ulgen, M.: *Metabolic and chemical studies on N-(4-chlorobenzyl)-N'-benzoylhydrazine*. *Il Farmaco* 2000, **55**, 624–30.

Dr Beata GAŚOWSKA-BAJGER jest absolwentką Instytutu Chemii Uniwersytetu Opolskiego, tutaj też uzyskała stopień doktora pod kierunkiem dr hab. Huberta Wojtaseka. Zainteresowania naukowe: mechanizmy działania oksydoreduktaz, poszukiwania inhibitorów tych enzymów i ich zastosowanie w aktywacji proleków przeciwnowotworowych. Jest autorką 8. publikacji w czasopismach krajowych i międzynarodowych.

e-mail: Beata.Gasowska@uni.opole.pl, tel.: +48 77 452 7120

* Dr hab. Hubert WOJTASEK jest absolwentem Instytutu Chemii Wyższej Szkoły Pedagogicznej w Opolu (obecnie Uniwersytetu Opolskiego). Doktorat uzyskał na Wydziale Chemii Uniwersytetu Stanowego Stanu Nowy Jork w Stony Brook w USA pod kierunkiem prof. Glenna D. Prestwicha. Był stypendystą japońskiej Agencji Nauki i Technologii (STA) w Narodowym Instytucie Nauk Agrobiologicznych w Tsukubie w laboratorium dr Waltera S. Leala oraz Japońskiego Towarzystwa Promocji Nauki (JSPS) na Wydziale Medycznym Uniwersytetu w Mie w laboratorium prof. Yasuo Chinzei. Zainteresowania naukowe: mechanizmy działania enzymów związanych z procesami melanizacji i sklerotyzacji, molekularne podstawy rozwoju owadów, mechanizmy percepcji węchowej. Jest autorem jednej monografii, jednego patentu międzynarodowego i 28. publikacji w czasopismach międzynarodowych.

e-mail: Hubert.Wojtasek@uni.opole.pl, tel.: +48 77 452 7122
fax: +48 77 452 7101