

Zur Frage der Substrataktivierung in den von Isocitrat-Lyase, bzw. 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat- Synthetase katalysierten Reaktionen

Doctoral Thesis

Author(s):

Hubacek, Ivo

Publication date:

1991

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000644161>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH Nr. 9539

**Zur Frage der Substrataktivierung in den von Isocitrat-Lyase,
bzw. 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-Synthetase
katalysierten Reaktionen**

ABHANDLUNG

zur Erlangung des Titels eines
Doktors der Naturwissenschaften
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE
ZÜRICH

vorgelegt von
IVO HUBACEK
dipl. chem. ETH
geboren am 23. Juli 1958
von Ustí nad Labem / CSFR

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. D. Arigoni, Referent
Prof. Dr. W. Simon, Korreferent

Zürich 1991



ZUSAMMENFASSUNG

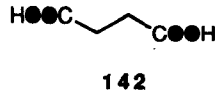
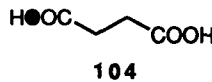
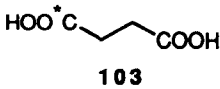
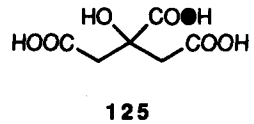
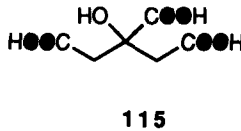
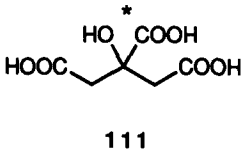
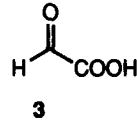
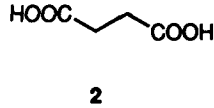
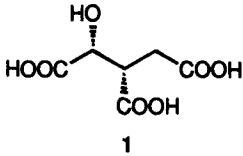
A) Isocitrat-Lyase ist ein Enzym, das im Glyoxylatcyclus die reversible Ueberführung von (2R,3S) Isocitronensäure (1) in Bernsteinsäure (2) und Glyoxylsäure (3) katalysiert. Um die nicht offensichtliche Substrataktivierung zu erklären, wurde ein Schema aufgestellt, das die Bildung eines enzymgebundenen Isocitrylamids als Aktivierungsschritt vor der Spaltungsreaktion annimmt. Zur Ueberprüfung dieses Postulats wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

1) Durch Synthese von spezifisch ^{13}C - und ^{18}O -monomarkierten Citronensäuren (111) und (125) und der ^{18}O -mehrfach indizierten Citronensäure (115) einerseits und der spezifisch ^{13}C - und ^{18}O -monomarkierten Bernsteinsäuren (103) und (104) andererseits erhielt man zusammen mit der bereits zur Verfügung stehenden ^{18}O -mehrfach indizierten Bernsteinsäure (142) die zur Durchführung der geplanten Untersuchungen geeigneten Spezies.

2) Nachdem man sich durch ein Kontrollexperiment davon überzeugt hat, dass bei der Ueberführung von Citronensäure in (2R,3S) Isocitronensäure die Sauerstoffe der tertiären Carboxylgruppe keinen Austausch mit dem Lösungsmittel oder mit anderen Substratmolekülen eingehen, wurden zwei Sätze von Experimenten durchgeführt: Im ersten wurden Gemische der Citronensäuren 111 und 125, bzw. 115 mit einer Proteinlösung bestehend aus Aconitase, Isocitrat Lyase und Lactat Dehydrogenase in einer irreversiblen Reaktionssequenz in Bernsteinsäure und Glykolsäure überführt. Im zweiten Satz erfolgte eine Equilibrierung von Gemischen aus den Bernsteinsäuren 103 und 104, bzw. 142 und Glyoxylsäure (3) mit der Isocitrat Lyase.

In beiden Versuchsserien wurde ein intermolekularer ^{18}O -Transfer beobachtet. Obwohl doppelt (^{18}O - und ^{13}C -) markierte Bernsteinsäurespezies in relativen Anteilen von 2.0 bis 5.5 % massenspektrometrisch nachgewiesen wurden, entsprachen die Mengen den aufgrund des Postulats erwarteten nicht und der postulierte Mechanismus musste ausgeschlossen werden. Zusammen mit der Beobachtung von Eggerer et al. [64], die festgestellt haben, dass während der untersuchten Reaktion kein messbarer Sauerstoffaustausch mit

dem Lösungsmittel stattfindet legen unsere Erkenntnisse die Vermutung nahe, dass die Lyase doch als kovalent gebundener Partner an der Sauerstoffübertragung beteiligt ist. Ein entsprechender Mechanismusvorschlag wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit diskutiert.

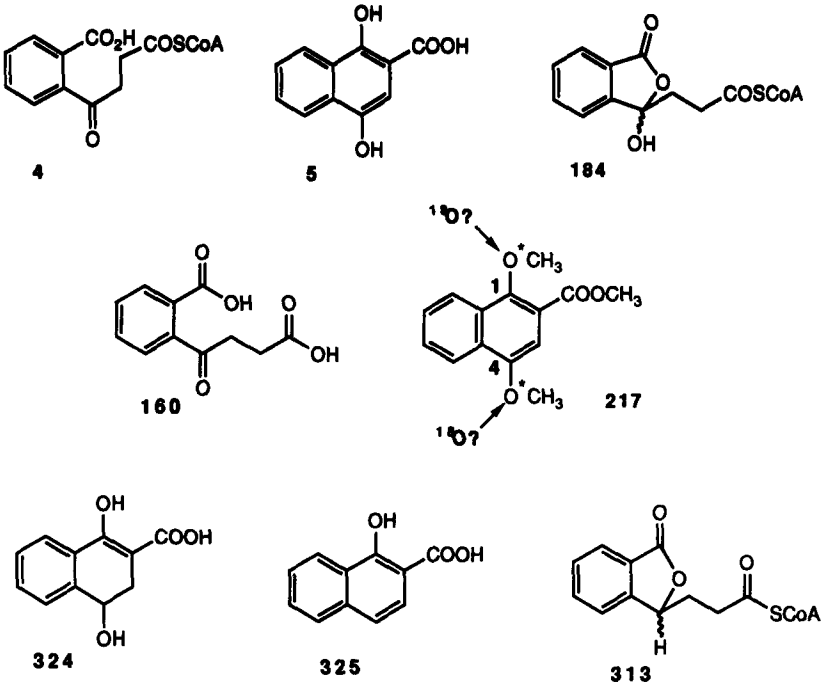


* C = ^{13}C ● = ^{18}O

B) Das Enzym 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat-Synthetase katalysiert mit der Ueberführung des mono-Coenzym A Derivats (4) der o-Succinoylbenzoesäure (160) in 1,4-Dihydroxy-2-naphthoesäure (5) eine Reaktion in der Biosynthese der K-Vitamine. Zur Ueberprüfung der möglichen Rolle des Lactols 184 als eigentliches Substrat der Kondensationsreaktion wurden folgende Arbeiten durchgeführt:

1) In einer achtstufigen Synthese wurde spezifisch in der aromatischen Carboxylgruppe ^{18}O -monomarkierte o-Succinoylbenzoesäure (160) hergestellt und mit einem zellfreien Extrakt aus *E. coli* umgesetzt. Das gebildete Produkt wurde in das Derivat 217 überführt. Die ^{13}C -NMR-spektroskopische Analyse zeigte einen 50 %igen Verlust

von ^{18}O und eine temperaturabhängige Verteilung der zweiten Hälfte des Isotopen zwischen den 1- und 4-ständigen Hydroxylgruppen des Produkts. Dabei betrug die ^{18}O -Menge in der 4-Position 3 - 9 %. Diese Befunde schlossen den ursprünglich in Betracht gezogenen Mechanismus aus.



* C = ^{13}C

2) Durch eine fünfstufige Synthese nach Inouye [119] wurde eine in der aromatischen Carboxylgruppe spezifisch ^{13}C -indizierte o-Succinoylbenzoesäure hergestellt (160). Sie erlaubte die in der Arbeit diskutierte Möglichkeit einer Carboxylatwanderung zu überprüfen, welche die gefundene ^{18}O -Verteilung rationalisiert hätte. Aufgrund unseres Resultats musste dieser Reaktionsweg ausgeschlossen werden.

3) Durch Herstellung des Coenzym A Derivates **313** wurde ein modifiziertes Substrat erhalten, mit der die Substratspezifität der Synthetase untersucht werden konnte: Die Inkubation von **313** mit dem Enzym führte nicht zur Bildung eines der erwarteten Produkte **324**, oder **325**, deren Methylester als Vergleichspräparate nach Broom [125] synthetisiert wurden. Auch die Untersuchung der inhibtiven Wirkung von **313** brachte keine positiven Resultate.

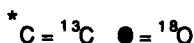
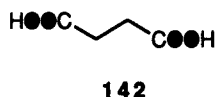
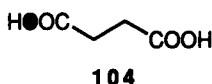
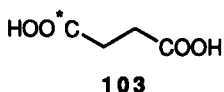
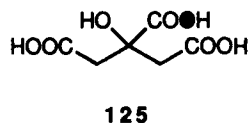
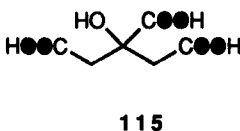
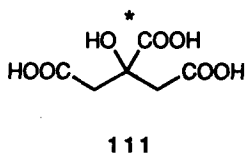
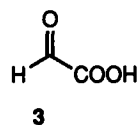
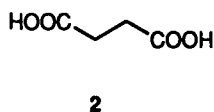
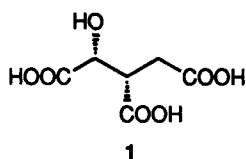
4) Aufgrund der Resultate in den Punkten 3) - 5) wurde ein hypothetischer Reaktionsmechanismus entworfen und diskutiert, der den experimentellen Befunden Rechnung trägt.

SUMMARY

A) Isocitrate-lyase is an enzyme of the glyoxylic acid cycle which catalyses the reversible conversion of (2R,3S) isocitric acid (1) into succinic (2) and glyoxylic acid (3). For its catalytic activity the lyase does not require any cofactors. To explain the unevident mode of substrate activation a reaction scheme was proposed that includes the formation of an enzyme bonded isocitrylamid as the activating step before breaking of the C-C bond occurs. In connection with studies of the proposed mechanism the following work was carried out:

1) By synthesis of the specifically ^{13}O - and ^{18}C -monolabeled citric acids (111) and (125) and the multiply ^{18}O -labeled citric acid (115) on one hand and of the specifically ^{13}C - and ^{18}O -monolabeled succinic acids (103) and (104) on the other hand we obtained, together with the already existing multiply ^{18}O -labeled succinic acid (142) substrate and product species for the planned mechanistic investigations.

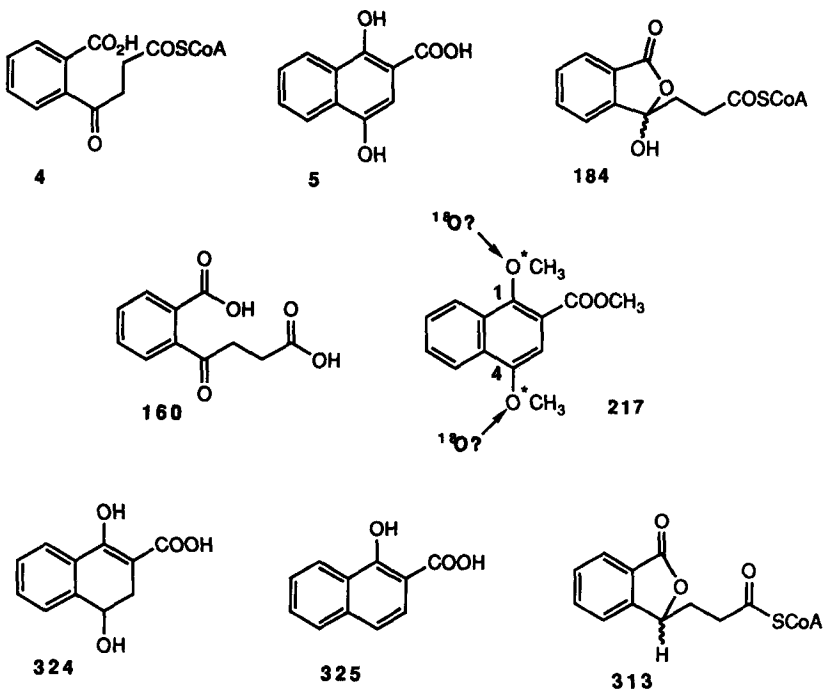
2) Incubation of a mixture of the citric acids (111) and (125) with aconitase showed that during the conversion of citric into isocitric acid neither loss of ^{18}O nor an intermolecular oxygen exchange between the tertiary carboxylic groups occur. With this knowledge the following work was carried out: First, mixtures of the citric acid species 111 and 125 or 111 and 115 were incubated with a solution containing aconitase, isocitrate lyase and lactate dehydrogenase. Addition of the dehydrogenase ensured that the resulting glyoxylic acid is reduced to glycolic acid thus making the reaction sequence irreversible. In the second set mixtures of the products succinic acid 103 and 104 or 103 and 142 and glyoxylic acid (3) were equilibrated with isocitrate lyase. Mass spectroscopy of the labeled succinic acid revealed in both sets of experiments an internal ^{18}O transfer amounting to 2.0 to 5.5 %. These results are incompatible with those predicted from the postulated mechanism, which in consequence turned out to be incorrect. Together with the results of Eggerer et al. [64] which show that no detectable oxygen exchange with the solvent occurs during the catalytic reaction, our observations may be explained in terms of covalent enzyme participation in the ^{18}O exchange. An appropriate mechanistic postulate is discussed in the text.



B) The enzyme 1,4-dihydroxy-2-naphthoat synthetase catalyses the conversion of the mono-coenzyme A derivative (4) of o-succinoylbenzoic acid (160) into 1,4-dihydroxy-2-naphthoic acid as a step in vitamine K biosynthesis. In connection with the investigation of the possible role of the lactol 184 as an activated intermediate the following work was carried out:

1) A sample of specifically ^{18}O -monolabeled o-succinoylbenzoic acid (160) was prepared in an eight step synthesis and incubated at four different temperatures with a cell free extract from E coli containig both the o-succinoylbenzoic acid-coenzyme A-ligase and the 1,4-dihydroxy-2-naphthoat-synthetase. The resulting product 215 was analysed by ^{13}C -NMR as the derivative 217. The analysis showed that 50 % of the ^{18}O label is lost in the reaction and the residual label is distributed between the hydroxyl groups at C-1 and C-4 in a ratio which is dependent on the temperature of the incubation. While proving that during formation of 215 oxygen is migrating into position 4, the quantitative data is not compatible with the simple version of the proposed mechanism.

2) A sample of specifically ^{13}C -labeled *o*-succinoylbenzoic acid (160) was prepared in five steps according to Inouye [119] and used as a substrate of the enzymatic reaction. Analysis of the resulting product by ^{13}C -NMR failed to reveal a migration of the thioester group in the course of the reaction.



* $\text{C} = ^{13}\text{C}$

3) In separate incubation experiment it was shown that compound 313 is neither a substrate nor an inhibitor of the synthase.

4) The results of this work are integrated in a reaction scheme which is discussed at the end of the present report.