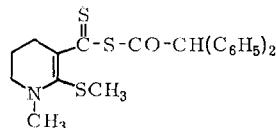


(16), X = O, Y = C(C₆H₅)₂
(17), X = C(C₆H₅)₂, Y = O



(18)

Umsetzung von (6a) mit Diphenylketen entsteht neben (16), Fp = 202–203 °C, das Isomer (17), Fp = 262–265 °C.

Die Verbindung (11) bildet sich auch beim Stehenlassen der Lösung von (18) (rote Nadeln, Zers. bei 88 °C), erhalten aus (6b) und Diphenylacetylchlorid, in Acetonitril. Damit ist ge-

zeigt, daß die Cycloadditionen an (6), (7) und (8) zweistufig verlaufen könnten; der Synchronprozeß ist jedoch nicht ausgeschlossen.

Eingegangen am 21. Februar 1967 [Z 454]

[*] Prof. Dr. R. Gompper und Dr. W. Elser
Institut für Organische Chemie der Universität
8 München 2, Karlstraße 23

[1] R. Gompper u. W. Elser, Tetrahedron Letters 1964, 1971.
[2] W. Elser, Dissertation, Technische Hochschule Stuttgart, 1965.

[3] Freigesetzt nach dem Verfahren von K. Dickoré u. R. Wegler, Angew. Chem. 78, 1023 (1966); Angew. Chem. internat. Edit. 5, 970 (1966).

VERSAMMLUNGSBERICHTE

Nucleophile enzymatische Reaktionen des Acetyl-CoA

Von H. Eggerer [*]

Da Acetyl-CoA kein Carbanion [**] bildet [1, 2], war es schwierig, den Mechanismus enzymatischer Carboxymethyllierungen von Oxosäuren mit Acetyl-CoA zu erkennen. Für zwei Enzyme konnte ein aldolartiger Mechanismus nachgewiesen werden. Für diesen sind formal drei Schritte erforderlich: 1) Enolisierung des Acetyl-CoA; 2) Addition des Enols an das Carbonyl zum β-Hydroxyacyl-CoA; 3) Hydrolyse dieses Intermediats.

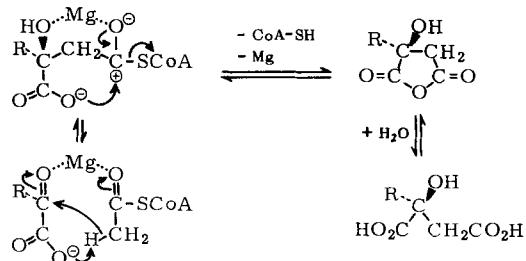
Citrat-Synthase katalysiert die Synthese des Citrats aus Acetyl-CoA und Oxalacetat. Schritt 2) und 3) konnten durch simultane Aldolspaltung und Hydrolyse mit Citryl-CoA, der isolierte Schritt 3) mit (S)-Malyl-CoA aufgezeigt werden. Schritt 1) lieferte den Schlüssel zum Verständnis der enzymatischen Katalyse: Schritt 1) erfordert das Carboxylat-Anion des Reaktionspartners Oxalacetat als basischen Cofaktor [2]. Der Nachweis gelang mit (S)-Malat, das statt Oxalacetat vom Enzym gebunden wird, sich aber nicht an das Enol addieren kann. (S)-Malat induziert daher die Enol-Bildung und bewirkt den Isotopenaustausch zwischen dem Methyl-Wasserstoff der Acetylgruppe und tritiumhaltigem Wasser [3]. In tritiumhaltigem Wasser in Abwesenheit von (S)-Malat synthetisiertes Citrat ist tritiumfrei; Acetyl-CoA bleibt nach teilweiser Reaktion mit Oxalacetat unmarkiert: Im langsamsten Schritt der Synthese entstandenes enolisches Acetyl-CoA reagiert sofort mit der Ketocarbonylgruppe zu (S)-Citryl-CoA. Da dessen „chemische“ Hydrolyse in neutraler wäßriger Lösung über 2-Hydroxy-2-carboxymethyl-succinanhydrid abläuft [4, 5], dürfte auch seine enzymatische Hydrolyse mit diesem Schritt eingeleitet werden.

Malat-Synthase katalysiert die Synthese des Malats aus Acetyl-CoA und Glyoxylat und benötigt dafür Mg²⁺-Ionen als Cofaktoren [6]. Das Enzym enolisiert Acetyl-CoA (Schritt 1), und zwar abhängig von den Mg²⁺-Ionen [7], deren

Wirkung als Säurekatalyse aufgefaßt wird: Die Thioester-Carbonylgruppe wird bei Bindung an die Lewis-Säure polarisiert, der Methyl-Wasserstoff wird acid.

Da die Enolisierung langsam erfolgt, schien es wahrscheinlich, daß mit jedem Enzym je ein Teilmechanismus – basische und saure Katalyse – nachgewiesen wurde, die in beiden Enzymen kooperativ arbeiten. Das chemische Modell dafür ist der bifunktionelle Katalysator von Swain und Brown [8]. Übereinstimmend damit induzieren α-Ketosäuren die Enolisierung des Acetyl-CoA mit Malat-Synthase, und zwar um so wirksamer, je kurzkettiger und damit glyoxylat-ähnlicher sie sind. Pyruvat hemmt die Synthese des Malats kompetitiv ($K_i = 10^{-3}$ M) und hat messbare Affinität zum Enzym ($K_M = 10^{-3}$ M). Geschwindigkeit der Enolisierung im „bifunktionellen enzymatischen System“ und Synthesegeschwindigkeit des Malats sind praktisch gleich. Carboxylat-Anion und Lewis-Säure arbeiten kooperativ: Die enzymatische Enolisierung hört auf, wenn das Mg²⁺-Ion oder wenn das Pyruvat entfernt wird. Da enolisches Acetyl-CoA im langsamsten Schritt der Synthese entsteht (Nachweis wie bei Citrat-Synthase angegeben), reagiert es sofort mit der Carbonylgruppe des Glyoxylats zu (S)-Malyl-CoA. Als Substrat eingesetztes (S)-Malyl-CoA wird von Malat-Synthase hydrolysiert (Schritt 3).

Der folgende Reaktionsverlauf stimmt mit den experimentellen Befunden überein:



Citrat-Synthase; R = CH₂CO₂H

Malat-Synthase; R = H

Die Reaktanten werden vom Enzym so gebunden, daß sie in zwangsläufiger Reaktion intramolekular in die Produkte umgewandelt werden.

In den verwandten Enzymkatalysen und bei Citrat-Synthase kann das Mg²⁺-Ion von einer konstitutiv im Protein enthaltenen Lewis-Säure ersetzt, und der Rest R der α-Ketosäure sterisch entgegengesetzt angeordnet sein.

[Colloquium im Chemischen Institut der Universität Marburg, am 18. November 1966] [VB 46]

[8] C. G. Swain u. F. J. Brown, J. Amer. chem. Soc. 74, 2538 (1952).

[*] Dr. H. Eggerer
Institut für Biochemie der Universität München
8 München 2, Karlstraße 23

[**] Im Text wird zwischen Acetyl-CoA-Carbanion und -Enol nicht unterschieden.

[1] A. Markus u. B. Vennesland, J. biol. Chemistry 233, 726 (1958).

[2] J. Bové, O. R. Martin, L. L. Ingraham u. P. K. Stumpf, J. biol. Chemistry 234, 999 (1958).

[3] H. Eggerer, Biochem. Z. 343, 111 (1965).

[4] W. Buckel u. H. Eggerer, Herbsttagung d. Ges. f. physiol. Chemie, Marburg 1966. Referate, S. 18.

[5] H. Eggerer, Liebigs Ann. Chem. 666, 192 (1963).

[6] G. H. Dixon, H. L. Kornberg u. P. Lund, Biochim. biophysica Acta 41, 217 (1960).

[7] H. Eggerer u. A. Klette, Europ. J. Biochem., im Druck.