

## PEROXIDASE ALS HEXAHYDROXYCYCLOHEXEN- OXIDASE\*

H. KINDL

Lehrkanzel für Biochemie der Universität, Vienna, Austria

(Received 16 September 1970)

**Zusammenfassung**—Pflanzliche Peroxidasen können mit der Enolform verschiedener Pentahydroxycyclohexanone, ähnlich wie mit Dihydroxyfumarsäure, als Cosubstrat eine Oxidasenfunktion ausüben. Es ließ sich zeigen, daß bei dieser Oxydation 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon in DL-3,5/4,6-Tetrahydroxycyclohexa-1,2-dion übergeführt wird. Mit derartigen Systemen Peroxidase-Endiol-O<sub>2</sub> konnten Oxygenase-Reaktionen, die Hydroxylierung von Ringkohlenstoffatomen aromatischer Verbindungen, und Oxidase-Reaktionen, wie die Dehydrierung von >CH—NH—Bindungen oder die Freisetzung von Äthylen aus  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -methylthiobuttersäure, nachgewiesen werden.

**Abstract**—Under aerobic conditions plant peroxidases can function as dihydroxyfumaric acid oxidases. Similarly, the enzyme is capable of reacting with molecular oxygen using the enolic form of various pentahydroxycyclohexanones as co-substrates. DL-3,5/4,6-Tetrahydroxycyclohexane-1,2-dione was demonstrated to be the product of this type of oxidation of 2,4,6/3,5-pentahydroxycyclohexanone. The system peroxidase-endiolo-O<sub>2</sub> was also found to catalyze the hydroxylation of ring C-atoms of aromatic compounds. In an oxidase type of reaction this system is capable of dehydrogenating >CH—NH bonds and producing ethylene from  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methylthiobutyric acid.

### EINLEITUNG

DIE WIRKUNG von pflanzlicher Peroxidase als Dihydroxyfumarsäureoxidase war bereits längere Zeit bekannt und hatte wesentlich zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus des Enzyms beigetragen.<sup>1</sup> 1959 berichteten Mason und Anan<sup>2</sup> über die Identifizierung der bei dieser Reaktion entstehenden Verbindung. Mit Hilfe des Systems Peroxidase-Dihydroxyfumarsäure-O<sub>2</sub> gelang Buhler und Mason<sup>3</sup> die Hydroxylierung von phenolischen Verbindungen, wobei die Orientierung der eingeführten Hydroxylgruppe charakteristisch für die Radikalreaktion war. Da Polyhydroxycyclohexanone im Gegensatz zur Dihydroxyfumarsäure natürlich vorkommende Verbindungen sind, könnte dem im folgenden beschriebenen System Peroxidase-Hexahydroxycyclohexen-O<sub>2</sub> physiologische Bedeutung zukommen. Hierzu wurden Peroxidasen aus *Amoracia lapatifolia*, *Sinapis alba*, *Brassica oleracea* und *Nasturtium officinale* verwendet.

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Produkt der durch Peroxidase katalysierten Oxydation von Dihydroxyfumarsäure ist Dihydroxyweinsäure;<sup>4</sup> bei dieser Oxidase-Reaktion fungiert O<sub>2</sub> als Elektronenakzeptor, das entstehende HO<sub>2</sub>·-Radikal oxydiert ein weiteres Molekül Dihydroxyfumarsäure. In

\* Part II in the series "Oxygenasen und Oxidasen in höheren Pflanzen".

<sup>1</sup> P. NICHOLLS, in *Oxygenases* (edited by O. HAYAISHI), p. 273, Academic Press, New York (1962).

<sup>2</sup> H. S. MASON und F. K. ANAN, *Proc. 4th Intern. Congr. Biochem. Vienna*, Vol. XIII, p. 194 (1959).

<sup>3</sup> D. R. BUHLER und H. S. MASON, *Arch. Biochem. Biophys.* **92**, 424 (1961).

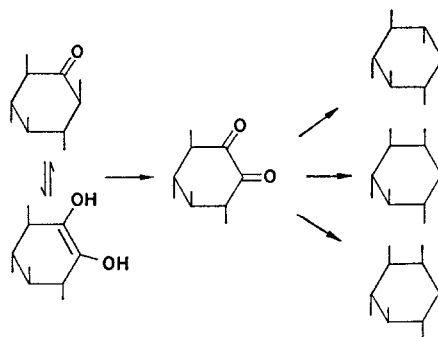
<sup>4</sup> E. F. HARTREE, *Biochem. J.* **107**, 581 (1968).

ähnlicher Weise sollte ein Hexahydroxycyclohexen als Endiol zu einer Diketo-Verbindung oxydiert werden. Da bei pH 7 die Cyclohexanon-Verbindung zu weniger als 5% in der Enolform vorliegt und bei pH 9,0 die Enolform nur etwas mehr als 10% der eingesetzten Menge repräsentiert, unterscheidet sich die pH-Abhängigkeit des Cyclohexanon-Systems ganz wesentlich von der des Dihydroxyfumarsäure-Systems. Wenn jeweils 30 mM Lösungen (+0,2 mM  $\text{MnCl}_2$ ) mit Peroxidase im Warburg-Apparat inkubiert wurden, ergab sich eine etwa 30mal höhere Anfangsgeschwindigkeit der  $\text{O}_2$ -Aufnahme im Falle der Dihydroxyfumarsäure gegenüber dem Pentahydroxycyclohexanon. Bezogen auf die tatsächlich vorliegende Konzentration an Endiol bedeutet dies nur eine etwas geringere Reaktionsgeschwindigkeit für die Hexahydroxycyclohexen-Oxidase. Bei pH 9,0 hingegen übertrifft die Reaktion mit Hexahydroxycyclohexen die des Dihydroxyfumarsäure-Systems um einen Faktor 2–3. Da die Konzentration an Hexahydroxycyclohexen infolge des vorgeschalteten Gleichgewichtes Ketol–Endiol annähernd gleich bleibt, findet man, im Gegensatz zur Oxydation der Dihydroxyfumarsäure, eine über lange Zeiten konstante Reaktionsgeschwindigkeit. Das System Peroxidase–Pentahydroxycyclohexanon– $\text{O}_2$  ist somit besonders im alkalischen Bereich ein guter Radikaldonator. Versuche mit 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon, DL-2,3,4,6/5-Pentahydroxycyclohexanon und D(2)-2,3,5/4,6-Pentahydroxycyclohexanon zeigen, daß keine wesentliche Abhängigkeit von der Konformation dieser Cyclohexanone besteht.

#### *Identifizierung des bei der Oxidase-Reaktion entstehenden Cyclohexadions*

Der Nachweis für die Entstehung einer Diketo-Verbindung im Verlauf der Oxidase-Reaktion und die Zuordnung der Konfiguration dieses Tetrahydroxycyclohexadions erfolgten indirekt aus der Struktur der durch anschließende Borhydridreduktion gebildeten Cyclohexanhexole. Die für diese Verbindungsklasse gut ausgearbeiteten chromatographischen Trennmethoden erlauben eine Identifizierung der entsprechenden Inosite; eine zusätzliche Charakterisierung der entstandenen radioaktiven Verbindungen wurde dadurch vorgenommen, daß—nach Verdünnen mit inaktivem authentischen Material hoher Reinheit—durch Umkristallisieren zur konstanten spezifischen Aktivität die Identität bewiesen wurde. Im vorliegenden Fall war die spezifische Aktivität der (1) und (2). Kristallisate sowie des aus der Mutterlauge durch Eindampfen gewonnenen Produktes innerhalb von 10% konstant. Schema 1 gibt eine Übersicht über die bei der Oxidase-Reaktion und der anschließenden chemischen Reduktion auftretenden Cyclohexanderivate. Dementsprechend sollte bei Gleichwertigkeit der äquatorialen bzw. axialen Positionen während der Borhydridreduktion myo-Inosit, scyllo-Inosit und DL-chiro-Inosit in einem Verhältnis von 2:1:1 gebildet werden. Das tatsächlich gefundene Verhältnis von 4,1:2,8:1 erklärt sich in erster Linie dadurch, daß die Umsetzungen des Monoketons zum Diketon nur zu etwa 75% vor sich gingen; dadurch wird mehr myo-Inosit und scyllo-Inosit bei der chemischen Reduktion gebildet. In zweiter Linie führt der bevorzugt axiale Angriff des Hydridions zu einem Übergewicht in der Bildung von Derivaten mit äquatorialen Hydroxylgruppen.

Der Kontrollversuch ohne Zusatz der Peroxidase ergab ebenfalls die Bildung minimaler Mengen von DL-chiro-Inosit (etwa 4% im Vergleich zur enzymatischen Reaktion); es ist aber bekannt, daß Schwermetalle die Oxydation von Endiolen katalysieren können. Andererseits tritt praktisch keine Änderung des Verhältnisses myo-Inosit–scyllo-Inosit–chiro-Inosit auf, wenn Manganionen weggelassen werden; nur der Gesamtumsatz war um einige Prozente geringer. Dies ist im Zusammenhang mit Experimenten von Hartree<sup>4</sup>



SCHEMA 1. EINE ÜBERSICHT ÜBER DIE BILDUNG EINES CYCLOHEXADIONS AUS 2,4,6/3,5-PENTA-HYDROXYCYCLOHEXANON UND DIE ZUSAMMENSTELLUNG DER BEI DER ANSCHLIESSENDE BORHYDRID-REDUKTION ENTSTEHENDEN INOSIT.

interessant, der im Falle der Wirkung von Peroxidase als Dihydroxyfumarsäure-Oxidase einen beträchtlichen Unterschied in den Reaktionsprodukten beobachtete, je nachdem die Reaktion durch die Peroxidase oder  $\text{Mn}^{2+}$  allein katalysiert wurde.

#### Hydroxylierung Aromatischer Verbindungen

Das System Peroxidase–Pentahydroxycyclohexanon– $\text{O}_2$  ist in einer ähnlichen Weise wie das System Peroxidase–Dihydroxyfumarsäure– $\text{O}_2$  in der Lage, aromatische Verbindungen zu hydroxylieren. Beide Systeme eignen sich sowohl bei pH 7 als auch pH 9,0 zur Hydroxylierung von Phenylessigsäure. Zu diesem Zweck verwendete man Phenylessigsäure-carboxyl- $^{14}\text{C}$  und identifizierte papierchromatographisch am Ende der Reaktion die entsprechenden Hydroxyphenylessigsäuren. Obwohl es sich hier um eine Radikalreaktion handelt, wurde ganz bevorzugt die *o*-Hydroxysäure gebildet; *m*- bzw. *p*-Hydroxyphenylessigsäure fanden sich in einer mindest um den Faktor 5 geringeren Konzentration. Mandelsäure hingegen wurde nur in einer an der Grenze der Nachweisbarkeit befindlichen Menge gebildet. Die Umsetzungen von Phenylessigsäure-carboxyl- $^{14}\text{C}$  in *o*-Hydroxyphenylessigsäure-carboxyl- $^{14}\text{C}$  ergibt bis zu 10% Ausbeute und kann somit zur Darstellung von selektiv markierten Hydroxyphenylessigsäuren herangezogen werden. In ähnlicher Weise erhält man bei Verwendung von Benzoesäure bzw. Phenylpropionsäure die entsprechenden *o*-hydroxylierten Verbindungen. Nach wiederholter Rechromatographie konnten auch Dihydroxyverbindungen in geringen Mengen nachgewiesen werden; unter diesen Dihydroxyverbindungen überwiegen die 2,3-Dihydroxy- und 3,4-Dihydroxyaryl-carbonsäuren. Peroxidasen aus *S. alba*, *B. oleracea* und *N. officinale* führten hinsichtlich des Hydroxylierungsmusters zu völlig analogen Ergebnissen.

In unserem Laboratorium wurde im Zuge der Untersuchungen über die Biosynthese von Hydroxyphenylessigsäuren in höheren Pflanzen nachgewiesen, daß es mit dem System Peroxidase–Dihydroxyfumarsäure– $\text{O}_2$  bei der Hydroxylierung von Phenylessigsäure nicht zu einer durch die Hydroxylierung induzierten Wanderung der Seitenkette kommt;<sup>5</sup> auch Daly und Jerina<sup>6</sup> konnten kürzlich zeigen, daß bei anderen aromatischen Verbindungen die Hydroxylierung mit dem Peroxidase-System ohne NIH-Shift verläuft. Unter Verwendung von Phenylessigsäure-4- $^3\text{H}$  und einer von mir bereits beschriebenen Methode,<sup>5</sup> die Position

<sup>5</sup> H. KINDL, *European J. Biochem.* **7**, 430 (1969).

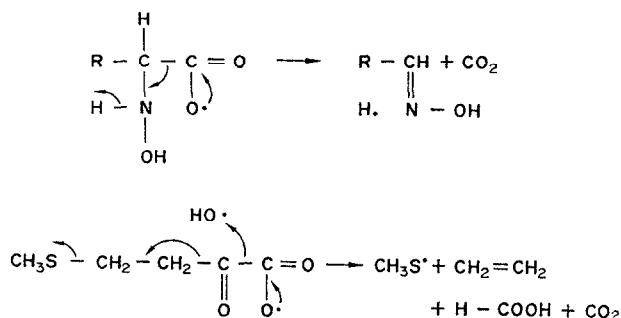
<sup>6</sup> J. W. DALY and D. M. JERINA, *Biochem. Biophys. Acta* **208**, 340 (1970).

des Tritiums in der gebildeten *o*-Hydroxyphenylelessigsäure zu bestimmen, wurde der Nachweis erbracht, daß auch das System Peroxidase-Hexahydroxycyclohexen- $O_2$  keine Wanderung der Seitenkette während der Hydroxylierung bewirkt. Dies kann als deutliches Zeichen dafür gewertet werden, daß es sich um Radikalreaktionen handelt, welche sich vom Prinzip her von der Oxygenase-Reaktion unterscheiden.

*Weitere Oxidase-Reaktionen mit dem System Peroxidase-Hexahydroxycyclohexen- $O_2$*

Die Verwendung des durch die Oxidase-Reaktion mit dem Endiol freigesetzten  $HO_2\cdot$ -Radikals als  $H\cdot$ -Akzeptor ist an zwei Beispielen von radikalischen Oxydationen demonstriert worden: Die oxydative Decarboxylierung von *N*-Hydroxyaminosäuren zu den Aldoximen sowie die Überführung von  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -methylbuttersäure in Äthylen. Die Bildung von Aldoximen aus den *N*-Hydroxyaminosäuren (siehe Schema 2) war bereits früher von Kindl und Underhill<sup>7</sup> mit Hilfe einer FMN-abhängigen Oxidase nachgewiesen worden; die Hauptaktivität einer über Sephadex G-100 aufgetrennten Enzympräparation fand sich aber in einer Fraktion, welcher ein Molekulargewicht von etwa 40,000 entsprach.<sup>7</sup> Es konnte zweifelsfrei gezeigt werden, daß unter diesen *in vitro*-Bedingungen die Peroxidase in überwiegenderem Maße für die Aldoximbildung verantwortlich ist. Das System Peroxidase-Hexahydroxycyclohexen- $O_2$  kann, wie manometrisch nachgewiesen wurde, die oxydative Decarboxylierung von *N*-Hydroxyaminosäuren in die Oxime der nächst niederen Aldehyde in schwach alkalischer Lösung in quantitativer Form bewirken.

Ein Vergleich der für diese oxydative Decarboxylierung aufgestellten Reaktionsfolge mit dem von zahlreichen Autoren postulierten Mechanismus der Bildung von Äthylen aus  $\alpha$ -Keto- $\gamma$ -methylthiobuttersäure<sup>8</sup> läßt vermuten, daß das Peroxidase-System auch bei der Äthylenbildung eine Rolle spielen könnte. *In vitro* kann jedenfalls, mit der von anderen Autoren<sup>9</sup> entwickelten Methodik, eindeutig die Äthylenbildung mit dem System Peroxidase-Hexahydroxycyclohexen- $O_2$  verfolgt werden. Da verschiedene Pentahydroxycyclohexanone natürlich vorkommende Verbindungen sind, könnte auch diesem Äthylenbildungsprozeß eine physiologische Bedeutung zukommen, wenngleich die Frage des hiezu nötigen pH-Wertes in Hinblick auf verschiedene Organellen bzw. Kompartimentierungen offen bleibt.



SCHEMA 2. RADIKALISCHE OXYDATION VON *N*-HYDROXYAMINOSÄUREN BZW.  $\alpha$ -KETO- $\gamma$ -METHYLTHIOBUTTERSÄURE.

<sup>7</sup> H. KINDL and E. W. UNDERHILL, *Phytochem.* **7**, 745 (1968).

<sup>8</sup> S. F. YANG and A. H. BAUR, *Qual. Plant. Mater. Veg.* **XIX**, 1-3, 201 (1969).

<sup>9</sup> S. F. YANG, *Arch. Biochem. Biophys.* **122**, 481 (1967).

Zuletzt sollen noch kurz einige negative Resultate berichtet werden, welche im Zusammenhang mit der Oxydationswirkung des Cyclohexanon Systems stehen. Frühere Arbeiten von Akazawa und Conn<sup>10</sup> einerseits, sowie von Gamborg *et al.*<sup>11</sup> andererseits setzten sich mit der Rolle von Cofaktoren bei der Oxydation von reduzierten Diphosphopyridinnucleotiden mittels Peroxydase auseinander. Dabei erwiesen sich Resorcin bzw. *p*-Cumarsäure als die effektivsten Cosubstrate. Es konnte diese Reaktion zwar mit einer Reihe verschiedener pflanzlicher Peroxidasen ebenfalls nachgewiesen werden, Versuche aber, in dem System *p*-Cumarsäure und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Hexahydroxycyclohexen und O<sub>2</sub> zu ersetzen, verliefen negativ.

## EXPERIMENTELLER TEIL

### Gewinnung der Peroxidasen

Die Peroxidase aus *Amoracia lapatifolia* wurde weitgehend nach bekannten Vorschriften gewonnen.<sup>12</sup> Nach Extraktion und CHCl<sub>3</sub>-Behandlung konnte durch fraktionierte Ammonsulfatfällung und Chromatographie auf Sephadex G-100 eine Enzympräparation mit einem Reinheitsgrad (E<sub>405</sub>/E<sub>280</sub>) von 3,0 hergestellt werden.

Weitere Peroxidasen erhielt man aus Blättern von *Sinapis alba*, *Brassica oleracea* und *Nasturtium officinale*. Das Pflanzenmaterial wurde dabei mit 0,1 M Tris-HCl-Buffer, pH 7,5, extrahiert; nach partieller Säuredenaturierung (pH 5,0) und Ammonsulfatfällung wurden die Enzyme über Sephadex G-100 und DEAE-Sephadex A-50 weiter angereichert. Die einzelnen Peroxidasen verhielten sich bei der Trennung auf der DEAE-Sephadexsäule verschieden. Die Aktivität der Peroxidasen wurde mit Hilfe des Guajacol-Tests<sup>12</sup> bei 470 nm im Eppendorf-Photometer festgestellt.

### Oxydation der Pentahydroxycyclohexanone

Das hierzu verwendete 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon-u-<sup>14</sup>C wurde durch katalytische Luftoxydation aus myo-Inosit-u-<sup>14</sup>C (durch Photoassimilation in <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>-Atmosphäre hergestellt)<sup>13</sup> erhalten. Vor der weiteren Verwendung kristallisierte man das Keton nach Verdünnung mit reinstem inaktiven Material 4mal aus H<sub>2</sub>O um.

80 μMole 2,4,6/3,5-Pentahydroxycyclohexanon-u-<sup>14</sup>C (67,5 μC/Mol), 2 μMole MnCl<sub>2</sub> und 2 mg Peroxidase (Reinheitsgrad 3,0) wurden in 5 ml 0,05 M Tris-HCl-Buffer pH 8,5, gelöst und 40 Min in O<sub>2</sub>-Atmosphäre geschüttelt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 60 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt, nach 1 Stunde mit verdünnter HCl auf pH 1 eingestellt und kurz erhitzt. Nach sorgfältiger Entionisierung mit Hilfe von feinkörnigen Kationen- und Anionenaustauscherharzen konnte die verbliebene HBO<sub>2</sub> durch mehrmaliges Abdampfen, jeweils nach MeOH-Zusatz, entfernt werden. Die Reaktionsprodukte wurden durch präparative Papierchromatographie getrennt.<sup>14</sup> Die Identität der durch dieses Verfahren erhaltenen radioaktiven Cyclite wurde durch wiederholte Rechromatographie mit authentischen Verbindungen sichergestellt. Kontrollversuche, welche mit Mn<sup>++</sup> aber ohne Peroxidase durchgeführt wurden, unterwarf man einer analogen Aufarbeitung.

### Hydroxylierung mit Hilfe des Systems Peroxidase-Endiol-O<sub>2</sub>

5 μMole Phenylelessigsäure-carboxyl-<sup>14</sup>C (300 μC/mMol) wurden mit 20 μMole Endiol, 1 μMole MnCl<sub>2</sub>, 1,0 ml Buffer und 2 mg Peroxidase in einer O<sub>2</sub>-Atmosphäre unter Schütteln inkubiert. Nach 1 Stunde wurde mit wenigen Tropfen konz. HCl angesäuert und erschöpfend mit Et<sub>2</sub>O extrahiert. Die ätherische Lösung wurde eingengt und die Mischung der Phenylelessigsäuren durch wiederholte Papierchromatographie aufgetrennt.<sup>5</sup> Die Versuche mit Phenylelessigsäure-4-<sup>3</sup>H wurden analog durchgeführt und die Lokalisierung des <sup>3</sup>H erfolgte wie bereits beschrieben wurde.<sup>5</sup>

**Oxidase Reaktionen.** Die oxydative Decarboxylierung von *N*-Hydroxyaminosäuren wurde entweder im Warburg-Apparat manometrisch verfolgt oder mit Hilfe von radioaktiven Vorstufen und chromatographischen Methoden wie bereits beschrieben bestimmt.<sup>7,15</sup> Die Entwicklung von Äthylen aus α-Keto-γ-methylthiobutteräure durch das Peroxidase-System konnte gaschromatographisch (3% Silikonkautschuk SE-30 auf Varaport)<sup>9</sup> gemessen werden.

<sup>10</sup> T. AKAZAWA und E. E. CONN, *J. Biol. Chem.* **232**, 403 (1958).

<sup>11</sup> O. L. GAMBORG, L. R. WETTER und A. C. NEISH, *Can. J. Biochem. Physiol.* **39**, 1113 (1961).

<sup>12</sup> A. C. MAEHLY, in *Methods in Enzymology* (edited by S. P. COLOWICK und N. O. KAPLAN), Vol II, p. 801, Academic Press, New York (1955).

<sup>13</sup> H. KINDL, J. BIEDL-NEUBACHER und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Biochem. Z.* **341**, 157 (1965).

<sup>14</sup> H. KINDL und O. HOFFMANN-OSTENHOF, *Phytochem.* **5**, 1091 (1966).

<sup>15</sup> H. KINDL und E. W. UNDERHILL, *5th FEBS-meeting, Praha*, Abstr. p. 95 (1968).