

Biochimica. — *Sulla sintesi degli acidi ossalomalico ed idrossichetoglutarico.* Nota di LUCA RASTRELLI e MICHELA FESTA, presentata (*) dal Socio A. Ruffo.

ABSTRACT. — *Rate of the synthesis of oxalomalate and hydroxy-oxoglutarate.* The rate of the synthesis of the acids 4-hydroxy-2-ketoglutaric and 2-hydroxy-3-oxalosuccinic (oxalomalic), known to be involved in the regulation of the citric acid cycle, was investigated by analyzing at HPLC the equimolar solutions of their precursors glyoxylate plus pyruvate (A) and glyoxylate plus oxaloacetate (B) incubated under physiological conditions of temperature and pH. The main results confirmed both the reactions and showed that the rate of the synthesis of oxalomalate was 4 fold higher than that of hydroxy-ketoglutarate.

KEY WORDS: Oxalomalate and hydroxy-ketoglutarate; Aconitase inhibition; Citric acid cycle regulation.

RIASSUNTO. — È stato determinato l'andamento della sintesi degli acidi 4-idrossi-2-chetoglutarico ed ossalomalico (2-idrossi-3-ossalosuccinico) eseguendo una analisi HPLC di miscele equimolecolari dei loro precursori, acidi gliossilico e piruvico (A) ovvero gliossilico ed ossalacetico (B) incubati per tempi crescenti in condizioni fisiologiche di temperatura e di pH. I principali risultati hanno confermato la sintesi di entrambi i composti e dimostrato che la velocità della sintesi dell'ossalomalato supera di circa 4 volte quella dell'idrossichetoglutarato.

INTRODUZIONE

L'osservazione che la reazione di condensazione tra gli acidi gliossilico ed ossalacetico dia origine all'acido ossalomalico [1, 2], un nuovo acido tricarbossilico capace di inibire specificamente la aconitasi e la isocitrico deidrogenasi NADP^+ -dipendente, è stata messa in dubbio a suo tempo da alcune ricerche [3-7] che, ritenendo troppo lenta la velocità della sintesi, attribuiscono l'inibizione ad un effetto «concertante» esercitato sul sito attivo da entrambi i composti gliossilato ed ossaloacetato. Altri risultati [6-7] ritenevano addirittura responsabile dell'inibizione l'idrossichetoglutarato, sostenendo che l'ossalomalato, qualora formatosi, si decarbossilasse spontaneamente anche a pH neutro. Siccome in questi ultimi tempi è stata messa in evidenza [8] la possibilità di analizzare all'HPLC i prodotti che si formano durante la condensazione degli acidi gliossilico con l'ossalacetico, abbiamo ritenuto opportuno riprendere in esame la questione indagando con questa nuova tecnica sull'andamento e sulla velocità di sintesi di entrambi gli acidi 2-idrossi-3-ossalosuccinico (in breve ossalomalico) e 4-idrossi-2-chetoglutarico. L'andamento delle due sintesi è stato seguito a diversi intervalli di tempo incubando i rispettivi precursori a 38 °C in presenza di adeguate quantità di Mg^{2+} che funge da catalizzatore in condizioni fisiologiche di temperatura e pH analoghe a quelle indicate nella ricerca precedente [1, 2].

(*) Nella seduta del 18 giugno 1993.

MATERIALI E METODI

L'andamento delle sintesi è stato determinato ai tempi indicati più avanti e nella tab. II, registrando i tracciati di eluizione rilevati a 215 nm da un apparecchio Hewlett-Packard HP-1050 series, munito di UV-Variable Detector, HP-3396-A Integrator e di un Autosampler con programma di iniezione. I campioni venivano iniettati in una colonna cationica per la separazione degli acidi organici Aminex-HP-X-87H della Biorad Laboratories (Segrate 20090, Milano) equilibrata con una soluzione di H_2SO_4 0.007N che veniva fatta defluire con un flusso di 1 ml/minuto. Le miscele di reazione venivano preparate al momento dell'uso sciogliendo in opportuni volumi di H_2O contenente $MgCl_2$ 0.02 M (C. Erba, Milano) gliossilato di Na (Fluka, Bucks, Svizzera) 0.02 M; piruvato di Na (Sigma, St. Louis, USA) 0.02 M ed acido ossaloacetico (Sigma), nella stessa concentrazione previa neutralizzazione con NaOH a pH 7.4. L'inizio della reazione avviene quando si mescolano insieme nel rapporto di 1:1 la soluzione di gliossilato rispettivamente con quella di piruvato (A) ovvero di ossaloacetato (B) avendo cura di eseguire immediatamente i tracciati (tempo 0) prima di portare le prove in termostato a 38°C. Le letture successive erano eseguite dopo 15, 30, 60 min. e quindi dopo 2 o 3 ore a 38°C. Infine i due campioni A e B sono lasciati l'intera notte a t.a. di circa 20°C e le letture ripetute l'indomani dopo 20 ore. I risultati sono riportati in figg. 1-3 e in tabb. I, II. L'esperimento è stato ripetuto con analoghe modalità adoperando gli stessi reagenti ma in concentrazioni 10 volte maggiori. Le quantità percentuali dei composti sintetizzati in funzione del tempo di incubazione a 38°C alle 2 concentrazioni esaminate, è riportato in fig. 3. In esperimenti preliminari sono stati determinati i tempi di eluizione dei singoli reattivi e di una soluzione dell'acido ossalomalico del commercio (Sigma, St. Louis, USA) iniettando nella colonna 5 μ l delle soluzioni 0.02 M. Siccome il segnale a 215 nm del gliossilato è meno intenso degli altri, conviene iniettarne il doppio per avere un tracciato paragonabile a quello degli altri composti. I tempi di ritenzione in tal modo ricavati, espressi in minuti, sono riportati in tab. I.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In esperimenti preliminari abbiamo dapprima cercato di confermare i risultati ottenuti da Nimmo[8] facendo passare sulla colonna opportune quantità dei vari reattivi in paragone ad una soluzione di acido ossalomalico del commercio[9] allo scopo di determinare i valori di R_t dei reattivi prima dell'incubazione in paragone a quello dei

TABELLA I. - Tempi di ritenzione di 5 μ l di soluzioni 0.02 M (espressi in min.).

Reattivi	R_t
Acido ossalomalico	3.7 - 3.8
Acido idrossichetoglutarico	4.4 - 4.5
Acido ossaloacetico	4.0 - 4.7
Acido piruvico	5.60
Acido gliossilico (iniettato 10 μ l)	5.65

prodotti della reazione studiata. I risultati riportati nella tab. I hanno confermato che l'acido ossalomalico del commercio è caratterizzato dall'eluizione di 2 picchi successivi, il primo di R_t tra 3.7 e 3.8 ed un secondo di R_t tra 4.47 e 4.53 dovuto al suo prodotto di decarbossilazione, l'acido idrossichetoglutarico. Il modico spostamento tra i due valori indicati dipende dalle condizioni sperimentali dell'analisi, quali la variazione della temperatura e lo stato della colonna in seguito ai lavaggi con l'eluente.

Viene anche confermato che gli acidi piruvico e gliossilico presentano R_t molto simili per cui ci si attende (v. anche fig. 1) che mescolati insieme co-eluiscono in un picco unico. Inoltre vanno segnalati i duplici picchi che contraddistinguono il profilo di eluizione dell'acido ossaloacetico quando, a causa di modica variazione del pH, si ritrovano in soluzione entrambe le forme, quella chetonica in equilibrio con l'enolica [2]. Infine va notato che l'acido gliossilico dà un segnale meno evidente degli altri composti a 215 nm, per cui, allo scopo di ottenere profili comparabili, la quantità iniettata sulla colonna è stata raddoppiata.

Nella fig. 1 vengono riportati i grafici relativi all'esperimento sulla sintesi dell'idrossichetoglutarico paragonando i tracciati A ottenuti prima (a sinistra) e dopo (a destra) 15 min.

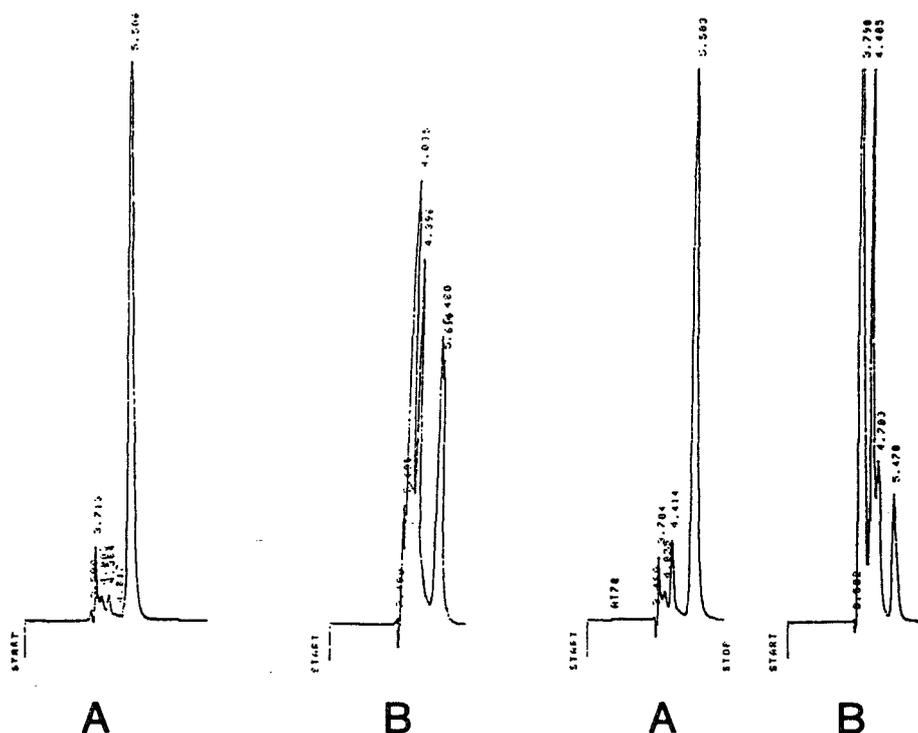


Fig. 1. - Grafici corrispondenti alla eluizione di una miscela equimolecolare di acido gliossilico + piruvico (A) e gliossilico + ossaloacetico (B), ciascuno in concentrazione 0.02 M prima, a sinistra, e dopo 15 min. a 38°C. Si noti a destra nel grafico A la comparsa di un picco di R_t 4.41 caratteristico dell'acido idrossichetoglutarico, ed in B la comparsa del picco di R_t 3.79 caratteristico dell'acido ossalomalico.

di incubazione a 38 °C con quelli relativi alla sintesi dell'ossalomalico *B*, prima e dopo 15 min. di incubazione. Appare chiaramente che il grafico *A* subisce una modica trasformazione caratterizzata dalla comparsa di un nuovo picco di R_f 4.4 che indica la comparsa dell'ac. idrossichetoglutarico, mentre i corrispondenti profili dei grafici *B* subiscono subito una variazione molto più evidente dovuta alla comparsa di un nuovo picco di R_f 3.7 di notevole estensione comprovante la maggiore velocità di sintesi dell'acido ossalomalico rispetto all'acido idrossichetoglutarico. Le relative variazioni quantitative ricavate dal calcolo dell'area sottostante i singoli picchi sono riportate nella tab. II. A tale proposito conviene notare che gli acidi gliossilico e piruvico co-eluiscono nel corso dell'analisi relativa alla sintesi dell'acido idrossichetoglutarico. Pertanto, nella tabella sono state indicate in colonne differenti le aree sottostanti il picco coeluito del piruvato e del gliossilato relativo alla sintesi dell'acido idrossichetoglutarico (*A*) da quelle sottostanti il solo gliossilato che interessa la sintesi dell'acido ossalomalico (*B*) e che presenta valori molto bassi, come già detto, in quanto il suo contenuto nella prova essendo equimolecolare all'ossalacetato è poco rilevabile. In tal modo per entrambe le sintesi è possibile calcolare un grossolano bilancio tra reattivi scomparsi e prodotti formati.

La fig. 2 riporta i grafici rispettivamente dopo 3 ore e 20 ore di incubazione. Si vede come la sintesi di ossalomalato proceda molto più rapidamente di quella dell'idrossichetoglutarico, mentre in proporzione diminuiscono fino a praticamente scomparire i

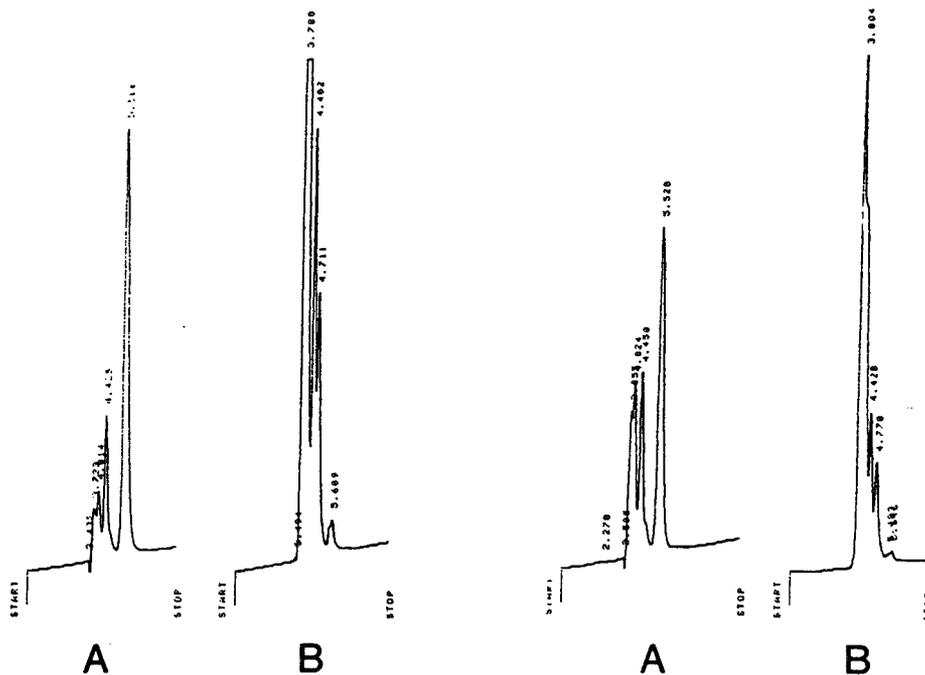


Fig. 2. - Come la precedente ma dopo 3 ore di incubazione (a sinistra) e dopo 20 ore (a destra).

TABELLA II. — *Variazioni quantitative espresse dalla percentuale delle aree sottostanti i singoli picchi.*

Tempo	Campione	OMA	HKG	OAA	GLY + PYR	GLY (*)
0	A	—	—	—	87	—
	B	—	—	74	—	15
15 min	A	—	10	—	64	—
	B	41	—	44	—	9
60 min	A	—	15	—	65	—
	B	57	—	34	—	6
2 ore	A	—	14	—	63	—
	B	63	—	29	—	2
3 ore	A	—	19	—	58	—
	B	80	—	21	—	2
20 ore (**)	A	—	21	—	42	—
	B	92	—	4	—	0.3

(*) I valori del gliossilato da solo sono bassi per la minore intensità del segnale a 215 nm (v. testo).

(**) Nell'intervallo tra le 3 e le 20 ore l'incubazione è continuata a t.a. circa 20°C.

Abbreviazioni usate: OMA = ac. ossalomalico; HKG = idrossichetoglutarico; OAA = ossaloacetico; GLY = gliossilico; PYR = piruvico.

picchi dei composti aggiunti all'inizio (fig. 2B). Al contrario procede lentamente e quindi si arresta la sintesi dell'acido idrossichetoglutarico (fig. 2A).

Dal confronto dei dati riportati nelle figg. 1-3 e nella tab. II appare evidente come sia quantitativamente maggiore la sintesi dell'acido ossalomalico rispetto a quella dell'idrossichetoglutarico confermando il meccanismo di reazione illustrato nei lavori precedenti [1, 2]. Esaminando i valori delle singole aree sottostanti i picchi è anche possibile ricavare un approssimativo rapporto tra la quantità dei reattivi che mano a mano diminuiscono durante l'incubazione ed i prodotti che corrispondentemente aumentano. Una soddisfacente rappresentazione grafica dell'andamento delle due sintesi nel tempo è infine riportata nella fig. 3. Appare dal punto di vista quantitativo trascurabile la differenza tra le diverse concentrazioni iniziali dei rispettivi reagenti.

A noi sembra, dunque, che l'insieme dei risultati ottenuti dall'analisi cromatografica ampiamente confermi i risultati precedenti che hanno descritto le condizioni sperimentali più adatte per dimostrare il meccanismo di condensazione tra il gruppo aldeidico dell'acido gliossilico ed i gruppi acidi C-H degli acidi ossaloacetico e piruvico. In tal modo si forma un nuovo legame fra C-C in analogia con la ben nota reazione di formilazione di Tollens adoperata da Fourneau *et al.* [10] per la preparazione degli amino-alcoli. Inoltre i dati esposti hanno messo in evidenza che la velocità della sintesi dell'acido ossalomalico è nettamente superiore a quella dell'idrossichetoglutarico, probabilmente perché la condensazione dell'aldeide con il C-metilico del piruvato è più lenta di quella con il gruppo metilenico dell'acido ossaloacetico notoriamente più dissociabile del metilico.

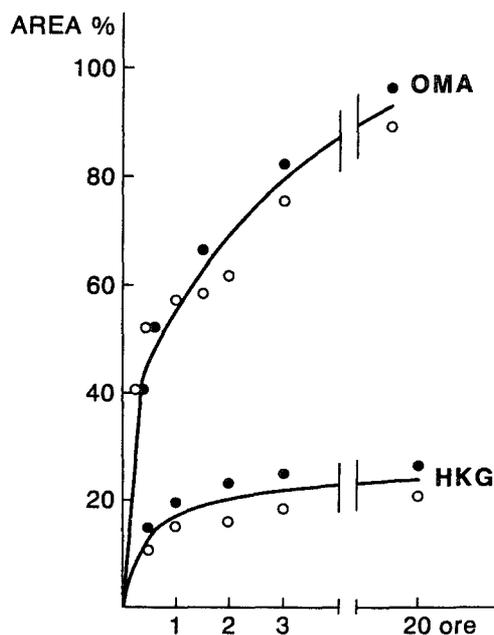


Fig. 3. - Andamento della sintesi degli acidi ossalomalico ed idrossichetoglutarico (concentrazione dei reattivi ●—●, 0.2 M; ○—○, 0.02 M).

Questa ultima osservazione a noi sembra comprovare dal punto di vista chimico quanto sostenuto dal punto di vista biologico [1, 2] e cioè che l'acido ossalomalico e non l'idrossichetoglutarico sia il prodotto fisiologico che si forma spontaneamente nelle cellule quando si rende necessaria la regolazione del ciclo citrico tramite l'inibizione reversibile dell'aconitasi. Siccome in tempi più recenti [11] è stato messo in evidenza che la sospensione temporanea dell'apporto energetico in tal modo realizzata produce variazioni del metabolismo lipidico e protidico di alcune culture cellulari (3T3L1), tali da arrestarne la crescita ed influenzare l'inizio della differenziazione, l'ottenuta conferma del rapido meccanismo con cui avviene la sintesi dell'acido ossalomalico a noi sembra un dato che induce a perseverare in questa direzione. L'obiettivo sarà quello di individuare quali correlazioni sussistano tra i meccanismi fisiologici che regolano l'apporto energetico nelle cellule e quelli altrettanto complessi che governano l'espressione del genoma e le sue conseguenze più evidenti quali la suddivisione e la differenziazione cellulare.

Lavoro eseguito con un contributo del CNR, Roma.

BIBLIOGRAFIA

- [1] A. RUFFO - E. TESTA - A. ADINOLFI - G. PELIZZA, *Control of the Citric Acid cycle by Glyoxylate. A new inhibitor of aconitase formed by the condensation of glyoxylate with oxaloacetate*. *Biochem. J.*, 85, 1962, 588-593.

- [2] A. RUFFO - E. TESTA - A. ADINOLFI - G. PELIZZA - R. MORATTI, *Mechanism of inhibition by oxalomalate and hydroxy-oxoglutarate*. *Biochem. J.*, 103, 1967, 19-23.
- [3] J. J. MARR - M. WEBER, *Feedback inhibition of an allosteric triphosphopyridine nucleotide-specific isocitrate dehydrogenase*. *J. Biol. Chem.*, 244, 1969, 5709-5712; *Arch. Biochem. Biophys.*, 158, 1973, 782-791.
- [4] O. C. INGEBRETSEN, *Mechanism of the inhibition of glyoxylate plus oxaloacetate and oxalomalate on the NADP-specific isocitrate dehydrogenase*. *Biochim. Biophys. Acta*, 452, 1976, 302-309.
- [5] J. A. JLLINGWORTH - K. F. TIPTON, *Reduction of oxaloacetate by pig liver isocitrate dehydrogenase*. *FEBS Letters*, 7, 1970, 157-160.
- [6] M. A. JOHNSON - H. C. REEVES, *Concerted inhibition of NADP⁺-specific isocitrate dehydrogenase by oxaloacetate and glyoxylate. I. Oxalomalate formation and stability, and nature of the enzyme inhibition*. *Biochim. Biophys. Acta*, 483, 1977, 24-34.
- [7] B. PAYES - G. G. LATIES, *The inhibition of several tricarboxylic acid cycle enzymes by g-hydroxy-a-ketoglutarate*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10, 1963, 460-466.
- [8] H. G. NIMMO, *Kinetic mechanism of E. Coli isocitrate-dehydrogenase and its inhibition by glyoxylate and oxaloacetate*. *Biochem. J.*, 234, 1986, 317-323.
- [9] M. FESTA - A. ANGIOLILLO, *Interferenza del siero sulla determinazione enzimatica del gliossilato in alcuni terreni di cultura*. *Rend. Fis. Acc. Lincei*, s. 9, v. 3, 1992, 75-80.
- [10] M. E. FOURNEAU - G. BENOIT - R. FIRMENICH, *Dérivés des amino-alcools à fonction alcoolique primaire*. *Bull. Soc. Chi. Franc.*, 47, 1930, 858-895.
- [11] A. RUFFO, *Regolazione del ciclo citrico in alcune culture cellulari*. *Atti Acc. Lincei Rend. fis.*, s. 8, 82, 1988, 805-818.

Dipartimento di Chimica delle Sostanze Naturali
e Dipartimento di Farmacologia Sperimentale
Università degli Studi di Napoli «Federico II»
Via D. Montesano, 49 - 80131 NAPOLI