

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] DRP 46654, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 2, 111 (1891).
 [2] DRP 60855, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 198 (1896).
 [3] L. GATTERMANN, J. prakt. Chem. [2] 43, 246 (1891); vgl. auch G. O. SCHENK & G. A. SCHMIDT-THOMÉE, Liebigs Ann. Chem. 584, 202 (1953).
 [4] DRP 63693, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 201 (1896); vgl. auch z. B. DRP 62531, *ibid.* 3, 199 (1896); DRP 63692/3, *ibid.* 200; DRP 64418, *ibid.* 205; DRP 65182, *ibid.* 207; DRP 65375, *ibid.* 208; DRP 65453, *ibid.* 209; DRP 67061, *ibid.* 202; DRP 67063, *ibid.* 203; DRP 69013, *ibid.* 204; DRP 69388, *ibid.* 211; DRP 97674, *ibid.* 5, 261 (1901); DRP 155045, *ibid.* 8, 184 (1908); DRP 156960, *ibid.* 254; DRP 161026, *ibid.* 256.
 [5] Vgl. z. B. DRP 62018, Frdl. Fortschr. Teerfarbenfabr. 3, 212 (1896), mit 12 Zusatzpatenten.
 [6] R. E. SCHMIDT, Angew. Chem. 41, 41 (1928).
 [7] R. E. SCHMIDT, J. prakt. Chem. [2] 43, 239 (1891); L. GATTERMANN, *loc. cit.* [3].
 [8] J. LICHTENBERGER & R. LICHTENBERGER, Bull. Soc. chim. France [5] 15, 1002 (1948); J. LICHTENBERGER & R. KIRCHER, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 229, 1345 (1949); J. LICHTENBERGER & L. DÜRR, Bull. Soc. chim. France [5] 23, 664 (1956); J. LICHTENBERGER & J. HINKY, Bull. Soc. chim. France [5] 28, 1495 (1961).
 [9] T. IKEDA, Y. YAMAMOTO, K. TSUKIDA & S. KANATOMO, J. pharmaceut. Soc. Japan 76, 217 (1956).
 [10] R. T. O'CONNOR, P. VON DER HAAR, E. F. DU PRE, L. E. BROWN & CH. POMINSKI, J. Amer. chem. Soc. 76, 2368 (1954).
 [11] R. E. REAVILL, J. chem. Soc. 1964, 519.

12. Fixation spontanée de la biotine à une protéine dans le sérum humain

par M. Vallotton, U. Hess-Sander et F. Leuthardt

(30 XI 64)

Dès le début des recherches de notre Institut sur la fixation de la biotine aux protéines extraites du foie de poule, nous avons été frappés par l'importance d'une fixation spontanée s'effectuant encore à 4°, sans l'aide d'aucun cofacteur et en quelques secondes [1]. Par la suite nous avons toujours dû tenir compte de cette fixation lors des essais d'incubation, pour le calcul de la proportion d'incorporation enzymatique de ce coenzyme [2]. C'est la raison pour laquelle nous avons continué à nous intéresser – à côté de nos recherches principales – à cette fixation spontanée; cela nous a permis de découvrir qu'une fraction protéique déterminée du sérum humain possédait la propriété de fixer la biotine [3]. Ce sont les résultats obtenus avec le sérum humain que nous rapportons ici plus en détail.

Nous avons recouru à deux méthodes: 1° la dialyse d'équilibre, 2° la filtration sur gel de dextran (Sephadex).

1° Dialyse d'équilibre

Méthode: 1 ml de la solution de protéine est mise dans un sac de dialyse que l'on plonge dans un petit ERLÉNMEYER (12 ml) contenant une solution de NaCl isotonique à laquelle la biotine-¹⁴C a été ajoutée. Un agitateur magnétique assure une agitation constante. L'opération s'effectue à 4°. L'équilibre est atteint vers la 12^e heure, mais nous avons toujours attendu 24 à 36 h pour assurer à l'équilibre une marge suffisante. A la fin de la dialyse, des fractions aliquotes du con-

tenu du sac de dialyse et du liquide baignant celui-ci sont pipetées, et leurs radioactivités sont mesurées au compteur à scintillation (TRI-CARB, PACKARD) après correction à l'aide d'un étalon d'acide benzoïque radioactif.

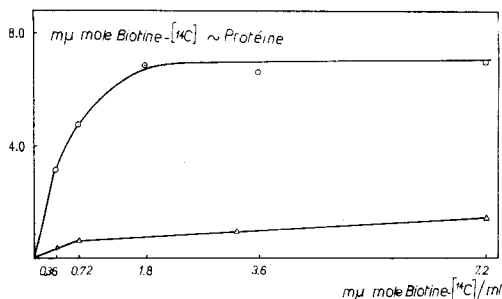


Fig. 1. Dialyse d'équilibrage entre la biotine-¹⁴C] et 1,0 ml de sérum humain -Δ-Δ- ou 1,0 ml d'avidine (600 γ/ml) -○-○-

Abscisse: concentration finale de la biotine-¹⁴C] libre.

Ordonnée: concentration finale de la biotine-¹⁴C] liée aux protéines. Biotine-¹⁴C] ~ Protéine signifie: biotine liée à une protéine.

Résultats. La fig. 1 indique la fixation de la biotine-¹⁴C], en fonction de sa concentration, aux protéines sériques comparée à sa fixation par une solution de 600 μg/ml d'avidine (NUTRITIONAL BIOCHEMICAL CORPORATION, env. 250 U/mg).

Si l'on compare le pourcentage de fixation calculé selon la formule suivante [4]:

$$\% \text{ fixation} = 100 \times \left(1 - \frac{\text{radioactivité par U. Vol. hors du sac}}{\text{radioactivité par U. Vol. dans le sac}} \right)$$

on obtient les droites de la fig. 2, d'où l'on tire la conclusion que même aux plus faibles concentrations de biotine celle-ci n'est pas fixée intégralement aux protéines sériques et que la quantité absolue de biotine fixée continue à s'élever avec sa concentration même aux concentrations élevées, la droite pour la fixation par les protéines sériques s'abaissant extrêmement peu.

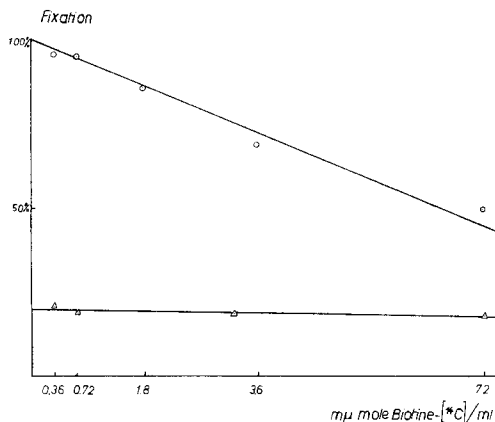


Fig. 2. Pourcentages de fixation resp. sur le sérum humain (-Δ-Δ-) et sur l'avidine (-○-○-) en fonction de la concentration finale de biotine-¹⁴C] libre, obtenus à partir des valeurs de la fig. 1 selon la formule indiquée dans le texte

Si on porte dans un graphique en abscisse la réciproque de la concentration de biotine libre et en ordonnée la réciproque de la concentration de la biotine liée aux protéines après équilibre, on obtient une droite; le point d'intersection de cette droite avec l'axe des ordonnées indique la concentration maximum que peut atteindre la fixation sérique de la biotine [4]. Nous obtenons ainsi une valeur de 4 nmoles/ml de sérum soit environ 1 μ g de biotine/ml (fig. 3).

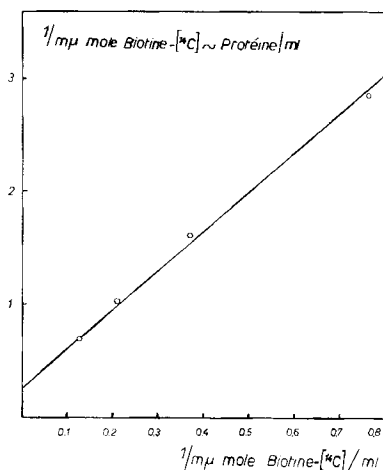


Fig. 3. Représentation graphique de la fixation de la biotine- ^{14}C aux protéines sériques, obtenue en reportant en ordonnée et abscisse la réciproque des valeurs de la fig. 1 pour le sérum

La linéarité indique l'homogénéité des groupes protéiques responsables de la fixation de la biotine, et l'intersection de la droite avec l'axe des ordonnées donne la réciproque de la concentration maximum de la biotine fixée dans le sérum. Celle-ci est de 4 nmole/ml.

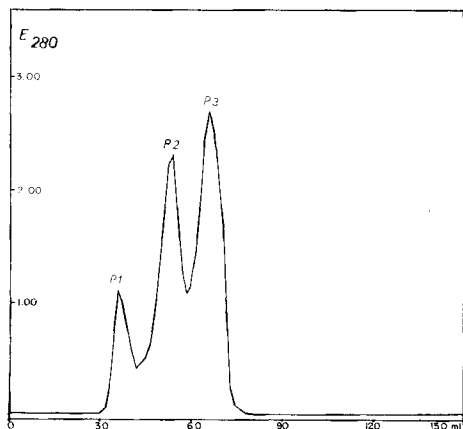


Fig. 4a. Séparation par filtration sur gel de 1,5 ml de sérum sur colonne de Séphadex G-200 ($60 \times 1,6$ ml) avec Tris-HCl 0,1 M + NaCl 0,2 M, pH 7,4

Fractions de 1,5 ml/h environ.

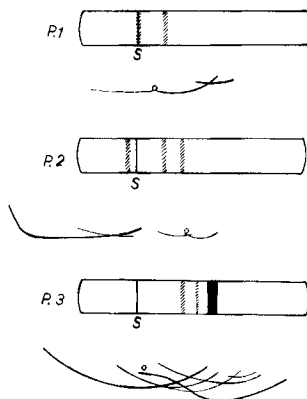


Fig. 4b. Résultats des électrophorèses sur amidon (tampon borate 0,025 M, pH 8,6 360 V, 2 h) et des immuno-électrophorèses des 3 pics obtenus par chromatographie sur Séphadex G-200 (fig. 4a). Voir texte.

2° Filtration sur gel de dextran

Méthode: Nous avons opéré sur des prises de 1,0 à 1,5 ml de sérum humain que nous avons séparées en trois fractions en les faisant passer au travers d'une colonne (env. $60 \times 1,6$ cm) de Sephadex G-200 (PHARMACIA, Uppsala) équilibrée et lavée avec du tampon Tris-HCl 0,1M + NaCl 0,2M pH 7,4 selon la technique légèrement modifiée de KILLANDER & FLODIN [5]. Les fractions ont été recueillies à raison de 1,5 ml/h en moyenne. Nous obtenons ainsi une excellente séparation parfaitement reproductible en trois pics distincts (fig. 4a) dont l'analyse par électrophorèse sur amidon et par immuno-électrophorèse¹⁾ (fig. 4b) donne des résultats tout à fait concordants avec ceux de FLODIN & KILLANDER [6], KILLANDER & FLODIN [5], GELOTTE [7] et FIREMAN et coll. [8]. Le premier pic contient principalement des γ -globulines de type 19S, des β 1- et des β 2-, peu de β 2A-, pas de β 1S-, enfin des α 2M-globulines. Le deuxième pic renferme surtout des γ -globulines de type 7S, des β 1S- et β 2A-, peu de β 2M, mais on n'y trouve ni β 1L- ni α 2M-globulines. Enfin le troisième pic contient toutes les albumines, la sidérophylle (transferrine), les α 1- et α 2-globulines.

En ajoutant à l'échantillon de sérum 20 à 30 γ de biotine-¹⁴C sous diverses conditions nous avons pu repérer la fraction protéique responsable de la fixation spontanée. La radioactivité de chaque fraction est mesurée avec un compteur de GEIGER-MÜLLER à courant gazeux; sur une fraction aliquote de 50 μ l déposé sur un tissu de cellulose extra mince et séchée sur ce tissu.

Résultats. Comme nous l'avons déjà publié [3] c'est une fraction migrant avec le troisième pic qui fixe la biotine lorsque sérum et biotine sont mélangés sans autre adjonction (fig. 5). Ce pic demeure unique et franc lors de la rechromatographie sur

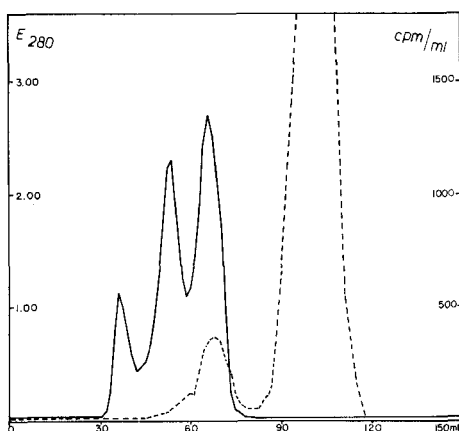


Fig. 5. Séparation par filtration sur gel de 1,5 ml de sérum humain additionné de 20 γ de biotine-¹⁴C)

Courbe en trait plein: concentration en protéine lue au photomètre BECKMAN à 280 nm.

Courbe en tirets: radioactivité en cpm/ml.

la même colonne. Un autoradiogramme de l'électrophérogramme obtenu avec cette fraction montre que la radioactivité est liée à la bande des albumines (zone noire non hachurée de la fig. 4b). Malheureusement cette radioactivité est trop faible pour être mise en évidence par autoradiographie sur l'immuno-électrophérogramme¹⁾ dans des délais normaux. Cette fraction radioactive n'est pas précipitable par l'immun-sérum anti-albumine. D'autre part une chromatographie sur Sephadex G-200 d'une solution

¹⁾ Nous tenons à remercier vivement le Prof. W. HITZIG et Mlle DIENER pour l'exécution et l'interprétation des immuno-électrophorèses (Immunchemisches Laboratorium des Kinderspitals Zürich).

à 5% d'albumine humaine lyophilisée, additionnée de biotine-[^{14}C] n'a révélé pour cette albumine aucun pouvoir de fixation de biotine.

Nous nous sommes demandés si cette fixation serait due à la présence, dans le sérum, d'une protéine de même nature que l'avidine. L'avidine elle-même, conformément à son poids moléculaire de 66 000 – 69 000, migre avec le troisième pic lorsqu'elle est chromatographiée sur Sephadex 200 en présence de sérum humain (fig. 6) mais, en revanche, elle migre avec les γ -globulines lors de l'électrophorèse sur papier ou sur amidon. La protéine sérique fixant la biotine et l'avidine sont donc deux protéines

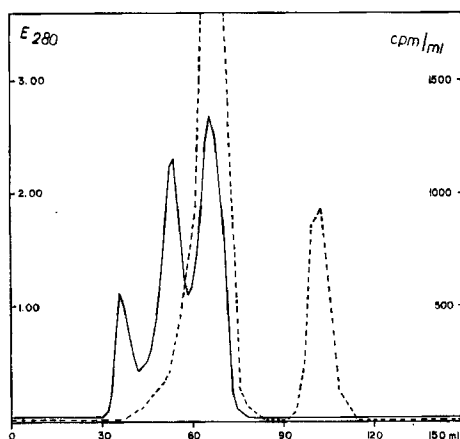


Fig. 6. Séparation par filtration sur gel de 1,5 ml de sérum humain additionné de 1,0 mg d'avidine et de 20 μ g de biotine-[^{14}C]

Même légende que dans les figures précédentes.

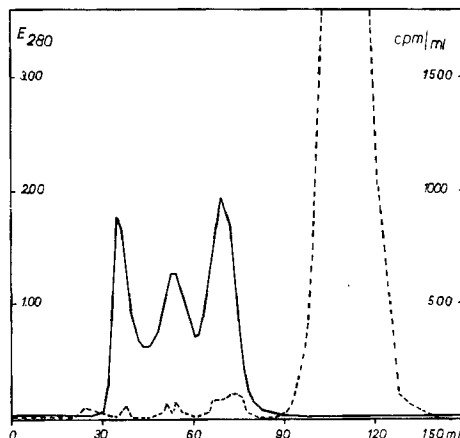


Fig. 7. Séparation par filtration sur gel de 1,5 ml de sérum humain préalablement oxydé par le N-bromsuccinimide

L'oxydation des restes de tryptophane modifie fortement l'aspect de la courbe des protéines lue au photomètre à 280 nm, l'absorption n'étant pratiquement due plus qu'aux seuls restes de tyrosine 200 fois moins touchée par l'oxydation. La biotine n'est pratiquement plus fixée.

distinctes tout en ayant à peu près le même poids moléculaire et la même faculté de fixer la biotine.

Selon les travaux de GREEN [9] la fixation de la biotine sur l'avidine s'effectue par l'intermédiaire de restes de tryptophane. La démonstration en a été faite par spectrophotométrie différentielle avant et après adjonction de biotine et par titrage spectrophotométrique de l'avidine par la biotine avant et après oxydation spécifique des restes de tryptophane de l'avidine par le N-bromosuccinimide. Le degré de fixation de la biotine aux protéines sériques est trop faible pour permettre l'utilisation des méthodes spectrophotométriques. En revanche la séparation des protéines sériques soumises à l'oxydation spécifiques des restes de tryptophane par le N-bromosuccini-

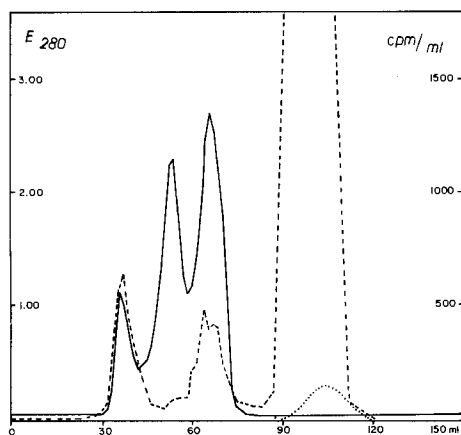


Fig. 8. Séparation par filtration sur gel de 1,5 ml de sérum humain préalablement dénaturé à l'urée (0,5 ml de sol. sat.) et additionné de 20 γ de biotine- ^{14}C

Même légende que pour la fig. 5.; = urée.

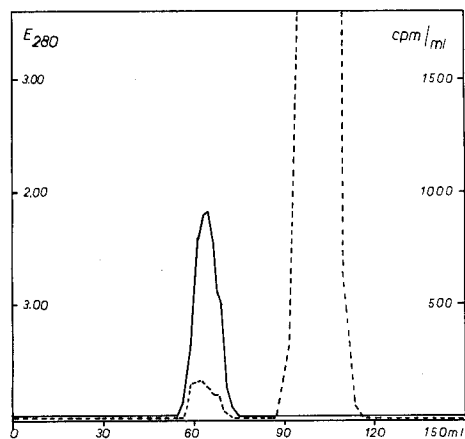


Fig. 9. Rechromatographie par filtration sur gel du pic 3 de la fig. 4a préalablement dénaturé à l'urée et additionné de 5 γ de biotine- ^{14}C

midé en solution d'urée 8,0M selon RAMACHANRANE [10] et FUNATSU et coll. [11] nous a montré qu'après cette oxydation, la fixation de la biotine était pratiquement abolie (fig. 7). Le titrage du tryptophane selon SPIES & CHAMBERS [12] a donné des valeurs 4 fois plus petites après oxydation.

Dans nos précédentes communications [1] [3] nous signalions que la dénaturation à l'urée des protéines sériques doublait à peu près le pouvoir de fixation de biotine. La séparation des protéines sériques de 1 ml de sérum, dénaturées par l'action de 0,5 ml d'une solution saturée d'urée pendant plus d'une heure, a révélé que l'augmentation du pouvoir de fixation était due au fait qu'une fraction protéique du 1er pic (inactive avant la dénaturation) fixait la biotine après dénaturation. La fixation aux protéines du 3^e pic, tout comme l'aspect général de la courbe de chromatographie des protéines restent pratiquement inchangés (fig. 8). Pour nous assurer qu'il ne s'est pas agi d'une aggrégation, produite sous l'effet de l'urée [13], de protéines à faibles poids moléculaire, nous avons rechromatographié les protéines du 3^e pic de la fig. 4a après les avoir dénaturées à l'urée et mélangées avec de la biotine-¹⁴C. La fig. 9 montre qu'elles réapparaissent bien sous forme d'un seul pic après le même volume de rétention qu'avant la dénaturation.

Finalement nous avons étudié l'influence de la modification de certains groupements de la molécule de biotine, sur la fixation spontanée de celle-ci aux protéines sériques. L'expérience montre que l'ester méthylique de la biotine-¹⁴C n'est pas fixé par les protéines sériques et que la desthiobiotine non radioactive n'inhibe pas la fixation de la biotine radioactive et n'est donc pas non plus fixée.

Conclusions. – On sait que diverses protéines ont la propriété de fixer spontanément et irréversiblement la biotine [1] [3] par une liaison très forte qui résiste au traitement à l'acide trichloracétique 20%. Nous avons pu montrer qu'une fraction protéique du sérum humain possédait également cette faculté. Vu la stabilité de cette fixation nous ne pensons pas qu'il s'agisse là d'une fonction de transport, comme les protéines du sérum l'exercent vis-à-vis de tant d'autres substances [14] – à moins qu'un système enzymatique n'assure la libération de la biotine. La fraction protéique responsable de cette fixation migre à travers une colonne de Sephadex G-200 et à l'électrophorèse sur amidon ou sur papier, avec les albumines dont elle paraît toutefois se distinguer, car elle n'est pas précipitable par l'immuno-sérum anti-albumine. La fraction protéique en question est également distincte de l'avidine puisque celle-ci migre à l'électrophorèse avec les γ -globulines. Toutefois, comme dans le cas de l'avidine, l'oxydation des restes de tryptophane supprime toute capacité de fixation. Des essais de comparaison des produits d'hydrolyse enzymatique des complexes avidine-biotine-¹⁴C et sérum-biotine-¹⁴C n'ont pas fourni des résultats concluants; les chromatogrammes bidimensionnels (sur papier) des peptides étaient bons, mais dans le cas du sérum la radioactivité était trop faible pour pouvoir être repérée dans des délais convenables. Le problème de la nature exacte de cette substance de type avidine et de sa parenté avec d'autres protéines du même genre comme la streptavidine produite par certains microorganismes [15] reste donc entier.

Nos remerciements vont à la Maison HOFFMANN-LA ROCHE & CIE., S.A., Bâle, pour la biotine radioactive fournie généreusement, et aux laboratoires de la Croix-Rouge de Berne et Zurich pour le sérum humain et l'albumine humaine lyophilisée remis gracieusement.

SUMMARY

Biotin has been found to be bound spontaneously and irreversibly by a protein fraction from human serum. The nature and characteristics of this fraction are studied with the help of dialyse-equilibration and gel-filtration on Sephadex G-200.

Biochemisches Institut der Universität Zürich

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. GILGEN & F. LEUTHARDT, *Helv.* **45**, 1833 (1962).
- [2] M. VALLOTTON, G. A. BOREL, R. SCHURTER & F. LEUTHARDT, *Helv.*, im Druck.
- [3] M. VALLOTTON & F. LEUTHARDT, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **21**, C 67 (1963).
- [4] W. R. SLAUNWHITE & A. A. SANDBERG, *J. clin. Invest.* **38**, 384 (1959).
- [5] J. KILLANDER & P. FLODIN, *Vox Sang.* **7**, 113 (1962).
- [6] P. FLODIN & J. KILLANDER, *Biochim. biophys. Acta* **63**, 403 (1962).
- [7] B. GELOTTE, P. FLODIN & J. KILLANDER, *Arch. Biochemistry Biophysics*, Suppl. **7**, 319 (1962).
- [8] PH. FIREMAN, W. E. VANNIER & H. C. GOODMAN, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **115**, 845 (1964).
- [9] N. M. GREEN, *Biochem. J.* **89**, 599 (1963).
- [10] L. K. RAMACHANDRAN & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 4028 (1959).
- [11] M. FUNATSU, N. M. GREEN & B. WITKOP, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 1846 (1964).
- [12] J. R. SPIESS & D. C. CHAMBERS, *Analyt. Chemistry* **21**, 1249 (1949); C. PORTNER & O. HÖGL, *Analyt. Chim. Acta* **8**, 29 (1953).
- [13] W. KANZEMANN & R. G. DOUGLAS JR., *Arch. Biochemistry Biophysics* **65**, 106 (1956).
- [14] H. BENNHOLD, *Triangle (Sandoz)* **6**, 98 (1963).
- [15] F. TAUSIG & F. J. WOLF, *Res. Comm.* **14**, 205 (1964); **14**, 210 (1964).

13. Organische Phosphorverbindungen XVII

Darstellung von Alkylen-bis-phosphonsäurechloriden und Alkylen-bis-thiophosphonsäurechloriden und deren Reaktion mit GRIGNARD-Verbindungen [1]

von Ludwig Maier

(4. XII. 64)

Bei der Umsetzung von $\text{CH}_3\text{P}(\text{S})\text{Br}_2$, $\text{CH}_3\text{P}(\text{S})\text{Cl}_2$ und $\text{C}_6\text{H}_5\text{P}(\text{S})\text{Cl}_2$ mit GRIGNARD-Verbindungen wurden in einer anomalen Reaktion Biphosphin-disulfide gebildet anstelle der erwarteten tertiären Phosphinsulfide [2]. In Fortführung dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob $\text{CH}_3\text{P}(\text{S})\text{Br}_2$ mit Di-GRIGNARD-Verbindungen, und Alkylen-bis-thiophosphonsäuredichloride mit GRIGNARD-Verbindungen ebenfalls anomal unter Knüpfung einer P-P-Bindung reagieren, oder aber ob hier in normaler Reaktion cyclische tertiäre Phosphinsulfide und Diphosphindisulfide gebildet werden.

Im folgenden wird nun über die Synthese von Alkylen-bis-phosphonsäuredichloriden und -thiophosphonsäuredichloriden sowie über die Umsetzung von Bis-thiophosphonsäurechloriden mit GRIGNARD-Verbindungen und von $\text{CH}_3\text{P}(\text{S})\text{Br}_2$ mit Di-GRIGNARD-Verbindungen berichtet.