

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 13^e Communication: M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **48**, 816 (1965).
 [2] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **47**, 2087 (1964).
 [3] B. L. O'DELL, J. M. VANDENBELT, E. S. BLOOM & J. J. PFEIFFNER, *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 250 (1947).
 [4] I. J. KREMS & P. E. SPOERRI, *Chem. Reviews* **40**, 279 (1947).
 [5] E. B. BROWN & T. B. JOHNSON, *J. Amer. chem. Soc.* **45**, 2702 (1923); B. LYTGOE & L. S. RAYNER, *J. chem. Soc.* **1951**, 2323.
 [6] L. F. CAVALIERI & A. BENDICH, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2587 (1950); D. B. COSULICH *et al.*, *ibid.* **74**, 3252 (1952).
 [7] E. C. TAYLOR & W. R. SHERMAN, *J. Amer. chem. Soc.* **81**, 2464 (1959).
 [8] B. PULLMAN & A. PULLMAN, «Quantum Biochemistry», New York und London, Interscience Publishers 1963.
 [9] V. H. SMITH & B. E. CHRISTENSEN, *J. org. Chemistry* **20**, 829 (1955).
 [10] M. VISCONTINI & H. R. WEILENMANN, *Helv.* **41**, 2170 (1958).
 [11] J. A. BROCHMAN *et al.*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 4326 (1950).
 [12] A. POHLAND, E. H. FLYNN, R. G. JONES & W. SHIVE, *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 3247 (1951).
 [13] A. ALBERT, D. J. BROWON & G. CHEESEMAN, *J. chem. Soc.* **1952**, 4219.
 [14] C. K. CAIN, M. F. MALETTE & E. C. TAYLOR, *J. Amer. chem. Soc.* **68**, 1996 (1946).

102. De la chimie des ptérines

15^e communication [1]

Hydroxylation non-enzymatique de la phénylalanine en tyrosine à l'aide de ptérines tétrahydrogénées

par A. Bobst¹⁾ et M. Viscontini

(28 XII 65)

Dans nos dernières communications [1] [2] nous avons décrit une nouvelle méthode pour réduire les ptérines, stabiliser les tétrahydroptérines (THP) ainsi obtenues et étudier leur mécanisme d'oxydation en dihydroptérines par l'oxygène à pH physiologique. Nous avons constaté qu'après le transfert de deux électrons sur l'atome d'oxygène, la ptérine se retrouve sous forme de ptérine dihydrogénée (DHP) de structure para-quinoidique (III), fort instable et se transposant rapidement en ptérine 7,8-dihydrogénée.


Dans le présent travail nous étudions l'oxydation de tétrahydroptérines (I) en présence de phénylalanine, car nous savons que le coenzyme d'hydroxylation biologique de la phénylalanine est certainement une THP [3].

Pour ces recherches nous nous sommes adressés en premier lieu au système d'UDENFRIEND [4], qui a étudié les hydroxylations de divers substrats aromatiques en présence de vitamine C, de Fe^{II} et d'acide éthylènediamine-tétracétique (EDTA) en milieux aqueux.

Nous avons tout d'abord voulu vérifier si ce système était capable d'hydroxyler la phénylalanine en tyrosine. C'est effectivement le cas, comme nous avons pu le dé-

¹⁾ Adresse actuelle: Institut de Biologie Physico-chimique de l'Université de Paris, 13, Rue Pierre Curie, Paris V^e (Directeur: Prof. Dr. B. PULLMAN).

montrer à l'aide de la chromatographie sur couche mince. A côté de la tyrosine, nous avons mis en évidence des substances encore plus fortement hydroxylées dont l'une est très probablement de la dihydroxyphénylalanine. Nous avons ensuite remplacé la vitamine C par du chlorhydrate de tétrahydroptérine (I, R = H), puis par du sulfate d'acide

tétrahydrofolique (FH₄) (I, R = CH₂-NH--CO-NH-CH-COOH). Dans les deux cas nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec la vitamine C.

Depuis fort longtemps on se demande si le fer (II) ou le fer (III) est nécessaire pour l'hydroxylation enzymatique de la phénylalanine et d'autres métabolites. Certains auteurs [5] prétendent que l'hydroxylation est fonction de la concentration en Fe^{II}, d'autres [6] le contestent. Nous avons étudié ce point précis à l'aide du système que nous employons, et nous pouvons affirmer avec certitude que, dans ce cas, le fer est absolument nécessaire.

Si, dans le système réactif, on omet l'adjonction de Fe^{II} ou Fe^{III}, on n'observe plus qu'une très faible formation de tyrosine. Il en est d'ailleurs de même dans le système à la vitamine C, comme l'avait fort bien observé UDENFRIEND [4]. Si, de plus, on ajoute à notre système un inhibiteur complexant très fortement le fer, tel que l'ion CN⁻, on ne trouve plus trace de tyrosine à la fin de la réaction. Nous en déduisons que les auteurs contestant l'action du fer devaient en avoir à l'état de traces dans leurs systèmes enzymatiques ou bien que, lorsqu'ils ajoutaient du fer, ils négligeaient de le maintenir en solution sous forme de complexe actif avec l'EDTA. Nous avons observé que sans EDTA dans notre système, la formation de tyrosine est très faible, même avec un excès de Fe^{II}.

Dans le tableau ci-dessous nous avons représenté l'ensemble des expériences effectuées, avec les résultats correspondants.

Hydroxylation de la phénylalanine en tyrosine avec la vitamine C ou les tétrahydroptéridines comme agents réducteurs et Fe^{II} complexé comme catalyseur

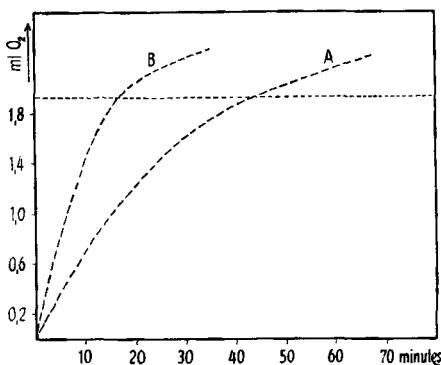
(+ = présence de substance, - = absence de substance, ± = douteux).

Pour les conditions d'expérience, voir la partie expérimentale

Phe	Vit. C	THP (I, R = H)	FH ₄	Fe ^{II}	Fe ^{III}	EDTA	CN ⁻	Tyr. formée
+	+	-	-	+	-	+	-	+
+	+	-	-	-	-	+	-	±
+	-	+	-	+	-	+	-	+
+	-	+	-	-	+	+	-	+
+	-	+	-	+	-	-	-	±
+	-	+	-	-	-	+	-	±
+	-	+	-	+	-	-	+	-
+	-	+	-	-	-	-	-	-
+	-	-	-	+	-	+	-	-
+	-	-	+	+	-	+	-	+

Ceci acquis, nous avons cherché à savoir si l'oxydation des tétrahydroptéridines par O₂ était, elle aussi, catalysée par Fe^{II}. A cet effet nous avons mesuré les vitesses d'oxydation dans une solution-tampon aux phosphates de potassium renfermant de l'EDTA, mais sans fer, puis nous avons répété l'expérience en ajoutant du fer à la solution.

La figure montre clairement que dans ces dernières conditions la réaction d'oxydation de la THP (I, R = H) en dihydroptérine est grandement facilitée. Par contre, si on supprime l'EDTA, on n'observe plus aucune différence dans la cinétique, qu'il y ait ou non du fer en solution. Il est probable que le fer doive être complexé pour agir comme catalyseur, sans quoi il forme à pH 6,9 un hydroxyde inactif.



Courbe de vitesse d'oxydation de la tétrahydroptérine (I, R = H) en présence d'air

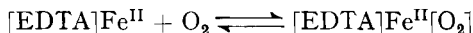
Pour les conditions de réaction voir la partie expérimentale

Courbe A: sans Fe^{II}; Courbe B: avec 3,5 μmoles Fe^{II}

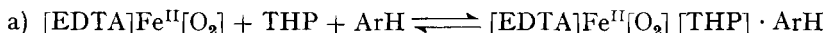
La ligne horizontale à 1,93 ml O₂ correspond à l'absorption de 1/2 mol. O₂, ce qui donne la dihydroptérine, oxydée elle-même plus lentement en ptérine

Nous croyons actuellement que l'hypothèse d'UDENFRIEND, de GUROFF, d'ELLENBOGEN et de leurs collaborateurs [5] est exacte, selon laquelle le fer joue un rôle essentiel dans le système enzymatique d'hydroxylation avec une THP comme coenzyme.

UDENFRIEND [4] et plus récemment HAMILTON [7], qui ont étudié les réactions d'hydroxylation non-enzymatique en présence de vitamine C ou de triamino-2,4,5-hydroxy-6-pyrimidine, ont proposé un mécanisme de réaction qu'on peut sans aucun doute étendre aux THP. Il doit se former tout d'abord un produit d'addition réversible entre le complexe Fe^{II} et l'oxygène, ainsi que le suggère l'étude cinétique d'INGRAHAM [8]:

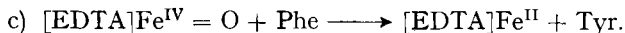
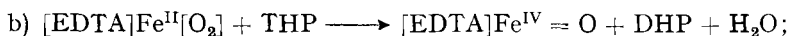


A ce moment la THP (I) peut réagir de deux manières: ou bien la réaction a lieu par l'intermédiaire d'un complexe quaternaire:



qui donne ensuite H₂O + HOAr + DHP;

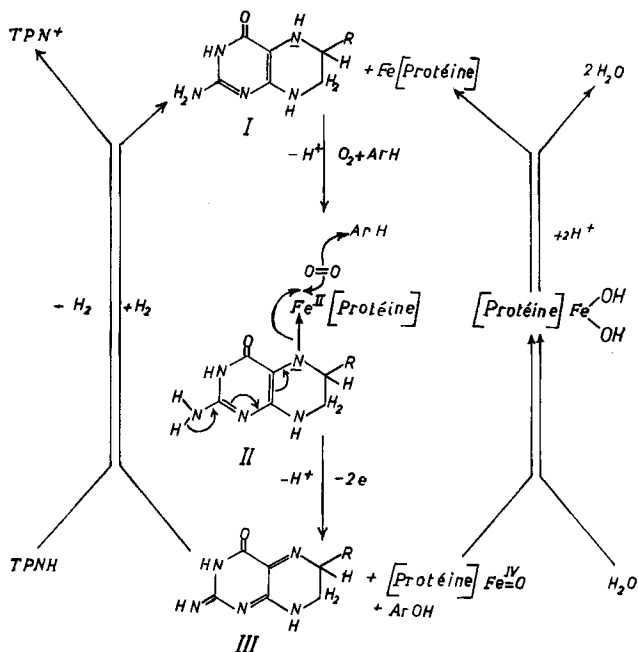
ou bien elle se développe en deux étapes comme l'a supposé pour la première fois MASON [9] dans le cas des oxydases de fonction mixte:



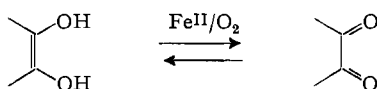
Le mécanisme a) a été rejeté par FALLAB [10] pour des raisons statistiques; nous pensons que le deuxième mécanisme est valable pour les expériences décrites dans ce

mémoire, et cela dans l'ordre b) puis c), sinon on devrait observer une hydroxylation en absence de THP, ce qui n'est pas le cas.

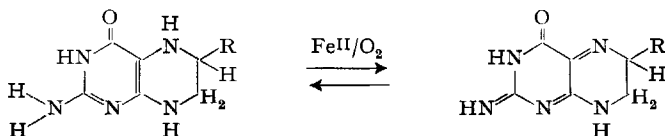
Cependant, dans le système enzymatique un complexe quaternaire nous semble possible; la réaction pourrait se dérouler de la façon suivante:



la formation d'une dihydroptérine de structure para-quinoidique III ayant été mise en évidence dans de récents travaux [2] [11]. Dans le système d'UDENFRIEND avec la vitamine C il s'agit d'un équilibre entre un énediol ou son vinylogue et sa forme α -dicétonique correspondante en présence de Fe^{II} et d'oxygène:



Dans le cas des THP (I) l'équilibre est tout à fait de même nature:



Partie expérimentale

Hydroxylation de la phénylalanine en tyrosine. La réaction est conduite à l'air libre à 37° dans un appareil à agitation pendant 3 h environ. Les quantités suivantes de réactifs sont contenues dans 4 ml d'une solution-tampon aux phosphates de potassium 0,1M à pH 6,9: EDTA: 20

μ moles; Fe^{II} ou Fe^{III}: 2,5 μ moles; Phe: 6 μ moles; CN⁻: 30 μ moles; donneurs d'hydrogène [vitamine C, THP (I, R = H) ou acide tétrahydrofolique FH₄]: 40 μ moles.

La tyrosine formée est mise en évidence par chromatographie sur couche mince (gel de silice G selon STAHL), à l'aide des solvants suivants: a) *n*-propanol, ammoniacal à 34% (70:30); b) phénol, eau (75 g: 25 ml) + 75 mg KCN; c) H₂O; d) collidine saturée d'eau. Révélation par la ninhydrine.

Oxydation du dichlorhydrate de tétrahydroptéridine (I, R = H). La vitesse d'oxydation est mesurée dans un appareil à microhydrogénation en présence d'air atmosphérique (25,5°, 726 Torr) dans les conditions suivantes: a) 160 μ moles THP (I), 20 μ moles EDTA, dans 2,5 ml de tampon 0,1M aux phosphates de potassium pH 6,9 et 2,7 ml de KOH 0,1N (Fig., courbe A); b) 160 μ moles THP (I), 20 μ moles EDTA, 3,5 μ moles (NH₄)₂Fe(SO₄), 6 H₂O, dans 2,5 ml de tampon 0,1M aux phosphates de potassium pH 6,9 et 2,7 ml de KOH 0,1N (Fig., courbe B).

SUMMARY

The non-enzymatic hydroxylation of phenylalanine to tyrosine has been effected by atmospheric oxygen in aqueous solution in the presence of 5,6,7,8-tetrahydropterines, Fe^{II} or Fe^{III}, and EDTA, in a phosphate buffer at pH 6,9. A possible reaction mechanism is discussed.

Zurich, Institut de Chimie Organique
de l'Université

BIBLIOGRAPHIE

- [1] 14. Mitteilung: A. BOBST & M. VISCONTINI, *Helv.* 49, 875 (1966).
 - [2] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* 47, 2087 (1964); 48, 816 (1965).
 - [3] S. KAUFMAN, *Biochim. biophysica Acta* 27, 428 (1958); S. KAUFMAN & B. LEVENBERG, *J. biol. Chemistry* 234, 2683 (1959).
 - [4] S. UDENFRIEND, C. T. CLARK, J. AXELROD & B. B. BROCHIE, *J. biol. Chemistry* 208, 731 (1954).
 - [5] G. GUROFF & T. ITO, *J. biol. Chemistry* 240, 1175 (1965); T. NAGATSU, B. LEVITT & S. UDENFRIEND, *ibid.* 239, 2910 (1964); L. ELLENBOGEN, R. J. TAYLOR JR. & G. B. BRUNDAGE, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 19, 708 (1965).
 - [6] S. KAUFMAN & A. B. BRENNEMAN, *Chem. Abstr.* 67, 14968 (1964).
 - [7] G. A. HAMILTON & R. J. WORKMAN, *J. Amer. chem. Soc.* 86, 3390 (1964); G. A. HAMILTON, *ibid.* 86, 3391 (1964).
 - [8] L. I. INGRAHAM, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 666 (1957).
 - [9] H. S. MASON, *Advances Enzymol.* 19, 79 (1957).
 - [10] S. FALLAB, *Z. naturwiss.-med. Grundlagenforsch.* 7, 333 (1963).
 - [11] S. KAUFMAN, *J. biol. Chemistry* 239, 332 (1964).
-