

227. Über Pterinchemie

17. Mitteilung [1]

Neuer Beitrag zum Studium eines von Tetrahydropterinen aktivierten Enzymmodelles der Hydroxylierung

von M. Viscontini, H. Leidner, G. Mattern und T. Okada

(12. VII. 66)

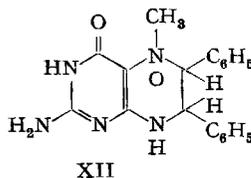
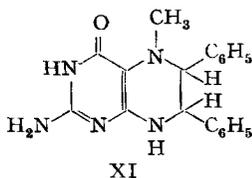
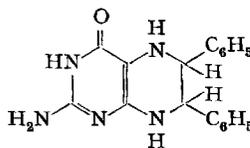
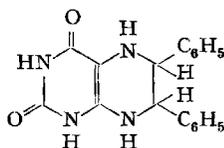
In der 15. Mitteilung [2] haben wir einen möglichen Reaktionsmechanismus der durch Tetrahydropterine (THP), Äthylendiamin-tetraessigsäure (EDTA) und Fe^{2+} bzw. Fe^{3+} katalysierten Hydroxylierung des Phenylalanins (Phe) in Tyrosin (Tyr) beschrieben. Dieser Mechanismus ist auf die Hypothese gestützt, dass komplexiertes Eisen(II) das N(5)-Proton des Tetrahydropterins I ersetzt und darauf eine Molekel O_2 aktiviert.

Weitere Untersuchungen unseres Laboratoriums zeigen, dass die Reaktion komplizierter ist als wir zunächst annahmen. In der Tat können wir jetzt unsere früheren Beobachtungen durch folgende Ergebnisse erweitern:

1. Bei der Oxydation von I in Gegenwart von Phenylalanin (VI) entstehen unter den Bedingungen, die wir in der 15. Mitteilung beschrieben haben, nicht nur *p*-Tyrosin (VII), sondern auch *o*- und *m*-Tyrosin, und zwar im Verhältnis *o*:*m*:*p* = 2:1:1, neben einer grossen Menge an gefärbten Produkten, die teilweise aus Phenylalanin-Umwandlungen stammen.

2. Lässt man bei diesen Experimenten die Phenylalanin-Konzentration – wie in [2] angegeben – konstant und ändert jene des Tetrahydropterins I, so stellt man fest, dass bei der 10–20 fachen Verdünnung von I die gebildeten Mengen von *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin ungefähr gleichbleiben: je kleiner die Konzentration von I, desto sichtbarer zeigt sich die katalytische Wirkung, die bei Zugabe von NaBH_4 beträchtlich erhöht wird. Bei diesen minimalen Mengen von Tetrahydropterin wirkt Fe^{2+} besser als Fe^{3+} , und EDTA lässt sich mit Vorteil durch Pyrophosphat ersetzen.

3. Wir haben 6,7-Diphenyl-5,6-dihydrolumazin, 6,7-Diphenyl-5,6-dihydropterin [3] und N(5)-Methyl-6,7-diphenyl-5,6-dihydropterin [3] mit NaBH_4 hydriert und die



entsprechenden Tetrahydroderivate IX, X und XI erhalten. Wie I werden IX und X an der Luft oxydiert. Als erste fassbare Substanzen lassen sich ebenfalls die entsprechenden 7,8-Dihydroderivate (DHP) nachweisen [4]. Führt man nun diese Oxydation in Gegenwart von Phenylalanin, EDTA und Fe^{2+} durch, so kann jedoch am Ende der Reaktion kein Tyrosin gefunden werden.

4. Alle Oxydationen der von uns bis jetzt studierten Tetrahydropterine zu den entsprechenden 7,8-Dihydropterinen verbrauchen ein Atom-Äq. Sauerstoff. Nach der Oxydation haben wir nie H_2O_2 in der Reaktionslösung nachweisen können (KJ-Stärkepapier).

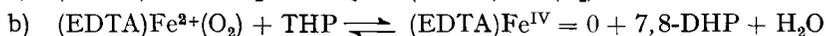
5. Oxydationen der 5,6-Dihydropterine zu Pterinen verbrauchen mehr als ein Atom-Äq. Sauerstoff, und nach der Oxydation ist H_2O_2 in der Reaktionslösung vorhanden. Diese Oxydationen verlaufen viel langsamer als jene der Tetrahydropterine zu den 7,8-Dihydropterinen und nach einem anderen Mechanismus, welcher wahrscheinlich mit dem von MAGER & BERENDS vorgeschlagenen zu vergleichen ist [5].

6. Das N(5)-Methyltetrahydropterin XI ist, wie wir vermuteten [6], besonders in saurem Bereich, viel beständiger als die in N(5)-Stellung nicht substituierten Tetrahydropterine. Es reagiert jedoch mit einem Atom-Äq. Sauerstoff unter Bildung eines leicht isolierbaren Sauerstoff-Additionsproduktes. Die Reaktion ist von Fe^{3+} , noch besser von Fe^{2+} , EDTA und OH^- katalysiert. Elementaranalysen, UV-, NMR- und Massen-Spektren sprechen dafür, dass dieses Additionsprodukt die Struktur eines Tetrahydropterin-N-oxides XII besitzt.

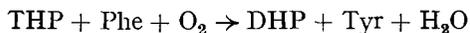
7. Wenn man angemessene Mengen von N(5)-Methyltetrahydropterin XI und Fe^{3+} in $\text{CH}_3\text{OH}-\text{H}_2\text{O}$ (1:1) löst, so bildet sich ein Komplex, der sehr unbeständig ist und sich sofort in einen beständigeren umwandelt. O_2 verlangsamt, EDTA hingegen beschleunigt diese Umwandlung. Die Unbeständigkeit dieses Komplexes und seine charakteristischen Banden mit ihren niedrigen Molarextinktionen [$\lambda_{\text{max}}(\epsilon \cdot 10^{-3})$: 335 (1,6); 366 (1,2); 470 (0,34) nm] sprechen für einen «Charge-transfer»-Komplex-Typus.

Auf Grund dieser Ergebnisse können wir unsere frühere Ansicht betreffend die Phenylalanin-Hydroxylierung folgendermassen revidieren:

1. Der von MASON [7] vorgeschlagene und von uns [2] für die Tetrahydropterin-Oxydation übernommene Mechanismus der als «gemischt» bezeichneten Oxydationen:



kann für die in dieser Mitteilung beschriebenen Reaktionen nicht gelten. Die unter a) und b) erwähnten Reaktionen würden danach ein Mol.-Äq. Sauerstoff für die Bildung von Dihydropterin benötigen, eine Annahme, die in Widerspruch mit unseren Messungen steht. Infolgedessen entspricht die Hydroxylierung des Phenylalanins sicher nicht der stöchiometrischen Gleichung:



und kann keine «gemischte» Oxydation im üblichen Sinne sein.

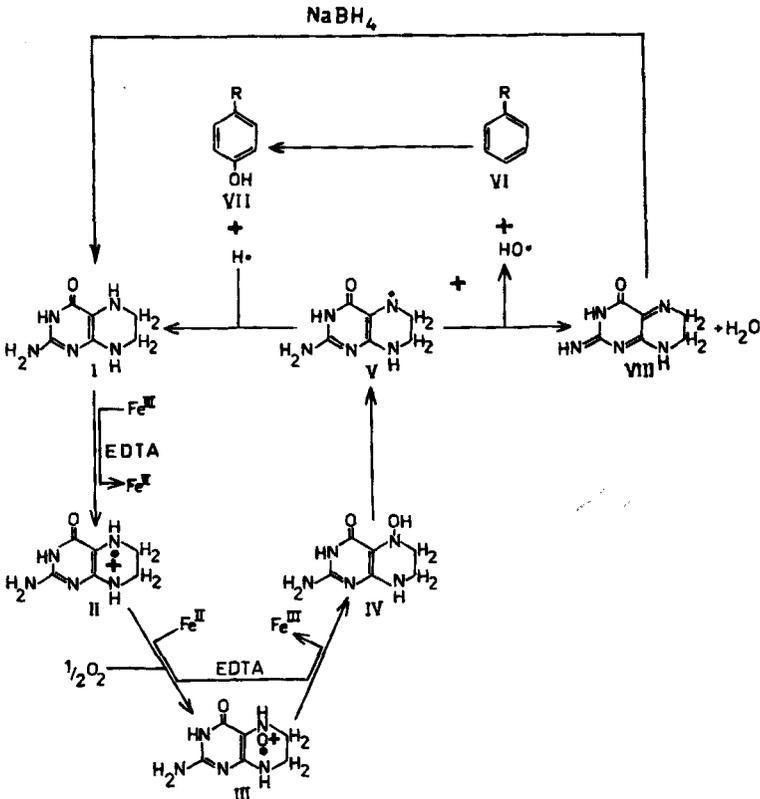
2. Wie wir zuerst annahmen [2], kann das komplexierte Eisen(II) nicht am N(5) des Tetrahydropterins I durch Substitution des Wasserstoffes kovalent gebunden

werden, da ein solcher Komplex ebensogut mit N(5)-Methyltetrahydropterin XI gebildet wird.

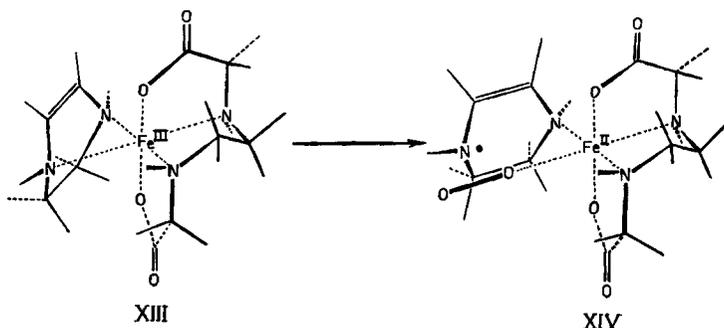
3. Die Phenylalanin-Hydroxylierung besteht wahrscheinlich nicht aus einem «Oxen»-Angriff (analog zu einem «Carben»-Angriff), sondern eher aus einer radikalischen Reaktion, die den allgemeinen FENTON'schen Hydroxylierungsregeln folgt (statistisch gleich begünstigte Angriffe in nucleophiler *o*- und *p*-Stellung des Benzolkerns, weniger begünstigter Angriff in elektrophiler *m*-Stellung) [8].

4. Wie die enzymatische folgt auch die chemische Hydroxylierung des Phenylalanins nach streng energetischen und sterischen Regeln. Durch Substitution des Tetrahydropterins kann die aktivierende Wirkung ganz unterdrückt werden, sei es auf Grund sterischer Hinderung, sei es auf Grund von Änderungen der elektronischen Verteilung in der Molekel.

Das folgende Schema, in welchem das Tetrahydropterin I als aktivierende Substanz und Fe^{3+} als Katalysator wirken, nimmt auf alle oben erwähnten Tatsachen, im besonderen auf die Komplexbildung zwischen N(5)-Methyltetrahydropterin XI und Fe^{3+} (Formeln XIII \rightarrow XIV) Bezug. Wir nehmen an, dass in diesem Komplex ein Elektron von XI zum Fe^{3+} unter Bildung eines positiven N(5)-Methyltetrahydropterin-Radikalkations und Fe^{2+} übergeht, dass diese Reaktion verallgemeinert werden kann und den ersten Schritt der Fe^{3+} -katalysierten Tetrahydropterin-Oxydationen darstellt:



Je nach den Bedingungen (Fe^{2+} oder Fe^{3+} als Katalysator) addiert der THP- Fe^{2+} - oder der THP-Radikal- Fe^{2+} -Komplex eine Molekel Sauerstoff (XIV) unter nachfolgender Bildung eines N-Oxides oder eines positiven N-Oxid-Radikal-Ions III.



Die anschliessenden Reaktionen könnten nach unseren Überlegungen folgendermassen ablaufen: vielleicht lagert sich das N-Oxid in ein sekundäres Hydroxylamin IV um, ohne Elektronübertragung, wenn Fe^{2+} zugegeben wird, mit anschliessender Oxydation von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , wenn Fe^{3+} verwendet wird.

Vielleicht spaltet sich auch dieses Hydroxylamin IV homolytisch in zwei Radikale: $\dot{\text{H}}\text{O}$ und $\text{THP}\dot{\text{V}}$. $\dot{\text{H}}\text{O}$ kann nun je nach den Reaktionsbedingungen entweder mit Phenylalanin (VI) oder mit dem Radikal V oder auch gleichzeitig mit beiden reagieren; mit Phenylalanin werden Tyrosin (VII) und $\dot{\text{H}}$, mit dem Radikal V Wasser und *p*-chinoides Dihydropterin VIII gebildet. $\dot{\text{H}}$ vereinigt sich mit V unter Rückbildung von I. Durch Zusatz von NaBH_4 in der Reaktionslösung wird das chinoides Dihydropterin VIII wieder zum Tetrahydropterin I reduziert.

Auf Grund dieses Schemas lassen sich nun die katalytischen Wirkungen von Fe^{2+} bzw. Fe^{3+} , EDTA, NaBH_4 und Tetrahydropterin I verstehen. Auch die unterschiedlichen Reaktionsfähigkeiten der einzelnen Tetrahydropterine können hiermit erklärt werden. Falls Tetrahydropterin I (oder Tetrahydrofolsäure) verwendet wird, dann reagiert $\dot{\text{H}}\text{O}$ hauptsächlich mit Phenylalanin und nur teilweise mit den Tetrahydropterin-Radikalen V. Falls man hingegen die Tetrahydropterine IX bzw. X verwendet, werden die entsprechenden Tetrahydropterin-Radikale so reaktionsfähig, dass sie sofort mit den vorhandenen HO-Radikalen unter Übergang in *p*-chinoides Dihydropterine Wasser bilden. Somit unterbleibt die Hydroxylierung von Phenylalanin; mit N(5)-Methyltetrahydropterin XI hört die Reaktion schon nach der Bildung des N-Oxids XII auf, da eine O-Umlagerung bei tertiären N-Oxiden unter diesen Bedingungen kaum zu erwarten ist.

Es ist klar, dass sich alle oben erwähnten Reaktionen im Rahmen eines mit XIII \rightarrow XIV ähnlichen Komplexes vollziehen können. Ersetzt man in dieser Formulierung das EDTA bzw. Pyrophosphat durch eine Proteinmolekel und NaBH_4 durch NADPH, so stehen wir vor einer enzymatischen Reaktion, wo Asymmetrie und Stereochemie nun einen Einfluss auf den spezifischen Verlauf der Reaktion ausüben können.

Es ist uns jedoch bekannt, dass die vorliegende Hydroxylierungstheorie eine Reihe von Fragen und Problemen aufwirft, die vorläufig noch offen bleiben, die wir

aber in Angriff genommen haben. Ausführlichere experimentelle Beschreibungen werden demnächst in dieser Zeitschrift publiziert.

Wir danken Herrn PD. Dr. W. VON PHILIPSBORN für die Aufnahme der NMR.-Spektren, Herrn Dr. M. HESSE für die Aufnahme der Massenspektren und Herrn H. FROHOFER, Leiter unserer Mikroanalytischen Abteilung, für die Elementaranalysen. Ferner danken wir dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG, der STIFTUNG FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG AN DER UNIVERSITÄT ZÜRICH und der GEIGY-JUBILÄUMSSPENDE für die Unterstützung dieser Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Anhand neuer experimenteller Ergebnisse wird für den Mechanismus der von Tetrahydropterin und Fe^{2+} bzw. Fe^{3+} katalysierten Hydroxylierung des Phenylalanins zum *o*-, *m*- und *p*-Tyrosin eine neue Hypothese formuliert, wobei zwei wichtige Punkte hervorgehoben werden: 1. Diese Hydroxylierung ist keine «gemischte» Oxydation, wie wir sie selbst früher postulierten; 2. N-Oxide sowie Tetrahydropterin- und HO-Radikale treten vermutlich als Zwischenprodukte der chemischen bzw. enzymatischen Hydroxylierung auf.

Organisch-Chemisches Institut
der Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 16. Mitteilung: M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **49**, 1815 (1966).
- [2] A. BOBST & M. VISCONTINI, *Helv.* **49**, 884 (1966).
- [3] M. VISCONTINI & S. HUWYLER, *Helv.* **48**, 764 (1965).
- [4] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **48**, 816 (1965).
- [5] H. I. X. MAGER & W. BERENDS, *Rec. Trav. chim. Pays-Bas* **84**, 1329 (1965); *Biochim. biophys. Acta* **118**, 440 (1966).
- [6] M. VISCONTINI & A. BOBST, *Helv.* **47**, 2087 (1964).
- [7] H. S. MASON, *Advances Enzymol.* **19**, 79 (1957).
- [8] P. KOVACIC & M. E. KURZ, *Tetrahedron Letters* **1966**, 2689.
- [9] R. KREHER & H. PAWELCZYK, *Tetrahedron Letters* **1966**, 2591.

228. Zum Mechanismus der Autoxydation von Vanadium(IV)-Komplexen

von Th. Kaden

(25. VI. 66)

Nachdem die Untersuchung der Autoxydation von Fe^{II} - und Co^{II} -Chelaten (s. [1] bzw. [2]) gezeigt hat, dass π -Donorliganden den Elektronenübergang vom Metall-Ion in die antibindenden π^* -Zustände der Sauerstoffmolekel zu beschleunigen vermögen, tauchte die Frage auf, ob solchen Reaktionen ein Elektronentransfer oder ein H-Transfer zugrunde liegt, denn man kann ja Elektronentransfer-Reaktionen wie (1) auch als H-Transfer-Reaktionen (2) formulieren. Einige Hinweise auf letztere

