

32. Über die Wirkung von optisch aktiven Hydraziden auf die Diamin-oxydase.

14. Mitteilung über Amin-oxydasen¹⁾²⁾

von E. Albert Zeller, Lorry A. Blanksma und John A. Carbon.

(26. XII. 56.)

In den zwei vorangehenden Mitteilungen dieser Reihe¹⁾³⁾ wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, aus der Substratspezifität gewisse Schlüsse auf die aktiven Zentren (reactive sites) von Amin-oxydasen ziehen zu können. Doch besitzt dieses Verfahren den Nachteil, dass eine Substanz zwei grundverschiedene Voraussetzungen erfüllen muss, um als Substrat eines Enzyms dienen zu können: sie muss sowohl die Bildung eines Ferment-Substrat-Komplexes ermöglichen, als auch der durch das Enzym determinierten chemischen Umwandlung fähig sein. Gelegentlich ist es ausgeschlossen, diese beiden Einflüsse voneinander zu trennen. In diesen Fällen ist es einfacher mit Hemmstoffen zu arbeiten, die mit den aktiven Zentren reagieren, ohne dabei einen Abbau zu erfahren. Hydrazine, die als isostere Amine aufgefasst werden können⁴⁾, erwiesen sich als geeignete Verbindungen für derartige Analysen.

Säurehydrazide wie Semicarbazid⁵⁾ und Aminoguanidin⁶⁾ sind sehr wirksame Hemmstoffe der Diamin-oxydase (DO). Ausgehend von natürlich vorkommenden oder sonst leicht zugänglichen optisch aktiven Säuren können weitere Inhibitoren dargestellt werden. Mit diesen optisch aktiven Verbindungen wurden gewissermassen die aktiven Zentren abgetastet und auf ihre Konfiguration hin geprüft.

Wir danken den *National Institutes of Health (United States Public Health Service)*, den *Lilly Research Laboratories* (Indianapolis) und der *Multiple Sclerosis Foundation of America* (Prof. Dr. Lewis J. Pollock, Chicago) für die Unterstützung dieser Arbeit.

Experimentelles.

Die Hydrochloride der Aminosäurehydrazine wurden über die Äthylester aus käuflichen Aminosäuren (*F. Hoffmann-La Roche*, Basel) dargestellt und ihr Stickstoffgehalt mit einer Mikro-Dumas-Apparatur bestimmt. Einige analytische Daten sind in Tab. I zusammengestellt.

¹⁾ 13. Mitteilung: *J. R. Fouts, L. A. Blanksma, J. A. Carbon & E. A. Zeller*, *J. biol. Chemistry* **225** (1957) (im Druck).

²⁾ Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse wurde früher mitgeteilt: *E. A. Zeller, J. A. Carbon, J. C. Lazanas & G. E. Olsen*, Abstracts, Division of Biological Chemistry, American Chemical Society, 128. Versammlung, Minneapolis, p. 34C (1955).

³⁾ *E. A. Zeller, J. R. Fouts, J. A. Carbon, J. C. Lazanas & W. Voegli*, *Helv.* **39**, 1632 (1956).

⁴⁾ *E. A. Zeller*, The fate of histamine in the body with particular reference to the enzymology of histamine oxidation, in *Ciba Symposium on Histamine*, London 1955, p. 339.

⁵⁾ *E. A. Zeller*, *Helv.* **21**, 880, 1645 (1938).

⁶⁾ *W. Schuler*, *Experientia* **8**, 230 (1952).

Tabelle I.

Hydrazid	Stickstoffgehalt %		$[\alpha]_D^{25**})$	Smp. (unkorr.)
	Gef.	Ber.		
L-Alanyl-*) . . .	29,92	30,10	+ 22,0 ⁰	184—185 ⁰
D-Alanyl-				183—185 ⁰
L-Leucyl-	19,42	19,27	+ 29,5 ⁰	
D-Leucyl-	19,19			250—252 ⁰
L-Phenylalanyl- .	23,19	23,45	+ 64,5 ⁰	86—87 ⁰
D-Phenylalanyl- .	23,70			88,5—89,5 ⁰
*) Der Chlorgehalt dieser Verbindung war 25,22% (ber.: 25,40%).				
**) Für die Alanin- und Phenylalaninhydrazide wurden 1-proz. Lösungen, für das Leucinhydrazid eine 2-proz. Lösung der Hydrochloride in destilliertem Wasser verwendet.				

Die Isolysergsäurehydrazide und die Isonicotinylderivate⁷⁾ wurden uns zur Verfügung gestellt⁸⁾.

Herstellung, Auswertung und Einheiten des benützten DO-Präparates wurden früher beschrieben³⁾. Dasselbe gilt für die Monoamin-oxydase (MO), die in Form von gewaschenen Mitochondrien (Rinderleber) zur Anwendung gelangte⁹⁾. Das Hydrazid wurde ungefähr 15 Min. vor dem Substrat zur Fermentlösung (DO oder MO) zugesetzt. Dies geschah, weil es sich gezeigt hatte, dass die Substrate Amin-oxydasen schützen, und weil es mehrere Min. dauert, bis die volle Wirkung der Hydrazide erscheint⁹⁾.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde die Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme herangezogen. Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, führen die Verfolgung der Hemmung der totalen Sauerstoffaufnahme und die der Ammoniakbildung praktisch zu den gleichen Resultaten. Die Bestimmung des pI, des negativen Logarithmus derjenigen Inhibitorkonzentration, die eine 50-proz. Hemmung verursacht, wurde graphisch durchgeführt, wobei die Inhibitorkonzentrationen als dekadische Logarithmen aufgetragen wurden. Die auf diese Weise definierte Funktion ist über einen weiten Bereich angenähert linear.

Tabelle II.

DO-Hemmung durch N-Isonicotinyl-N'- β -alanylhydrazin.

Dauer der Versuche: 2 Std.

Die Zahlen bedeuten Hemmung (in Proz.) durch die angegebene Hydrazidkonzentration.

Inhibitorkonz. millimolar . . .	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,01	0,02	0,03
Anfangsgeschw. O ₂ -Aufnahme . .	23	32	47	36	56	62	86	95
Totale O ₂ -Aufnahme	15	15	43	38	47	54	77	100
NH ₃ -Bildung . . .	6	18	29	18	49	52	80	80

⁷⁾ A. Winterstein, B. Hegedüs, B. Fust, E. Böhni & A. Studer, *Helv.* **39**, 229 (1956).

⁸⁾ Wir danken den Herren Prof. A. Stoll (Sandoz AG., Basel) und Dr. E. L. Severinghaus (Hoffmann-La Roche, Nutley, N. J.) für die Überlassung der Präparate.

⁹⁾ E. A. Zeller, J. Barsky & E. R. Berman, *J. biol. Chemistry* **214**, 267 (1955).

Ergebnisse.

Die Ergebnisse für die verschiedenen optischen Isomeren sind in Tab. III zusammengefasst.

Tabelle III.
pI-Werte für DO- und Säurehydrazide.

Nr.	Hydrazide	L-Form	D-Form	DL-Form
1	Alanyl-	6,4	5,2	
2	Leucyl-	6,8	⟨⟨ 6,0	
3	Phenylalanyl-	6,1	5,1	
4	Isolysergsäure	4,4	5,0	
5	N-Isonicotinyl-N'-alanyl-	4,0	3,5	4,8
6	acetylalanyl-	4,4	2,6	5,0
7	acetylmethionyl-	3,3	2,4	2,0
8	acetylleucyl-	2,7	⟨ 2,0	4,6

Die Verbindungen der Gruppe 1 bis 4 wurden in 0,001-m. Lösung auf die MO einwirken gelassen, ohne dass eine deutliche Hemmung eintrat ($pI \ll 3$). Das gleiche Verhalten wurde für die Gruppe 5 bis 8 festgestellt, die in 0,01-m. Lösung geprüft wurde ($pI < 2$). Maximale Hemmung fand sich für Substanz 7c (17%). Verbindungen vom Typ $RCONHNH_2$ und $RCONHNHCOR'$ sind offenbar ohne wesentlichen Einfluss auf die MO, was frühere Erfahrungen vollauf bestätigt⁴⁾¹⁰⁾.

In allen Fällen besteht ein signifikanter Unterschied in der Wirkung von optisch aktiven Antipoden auf die DO. In allen 7 Paaren ist das L-Aminosäurehydrazid wirksamer als die D-Form. Der Unterschied im pI ist durchschnittlich eine Einheit, was bedeutet, dass ungefähr die zehnfache Menge des D-Aminosäure-Derivats notwendig ist um die gleiche Hemmung wie mit dem Antipoden zu erzielen. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass das aktive Zentrum der DO, mit dem die Hydrazide reagieren, selber optisch aktiv ist und wahrscheinlich aus L-Aminosäuren aufgebaut ist. Offenbar liegt in der DO ein System vor, mit dem Paare von optisch aktiven α -Aminosäuren, sofern sie einer Umwandlung in Hydrazide fähig sind, der L- bzw. der D-Form zugeordnet werden können.

Die D-Aminosäurehydrazide 5 bis 8 (Tab. III) sind nicht nur schwächere DO-Inhibitoren, sondern sie sind auch erheblich weniger toxisch als die entsprechenden L-Derivate⁷⁾. Zwischen diesen beiden Tatsachen besteht vielleicht ein Zusammenhang, der darin bestünde, dass die Toxizität der Hydrazide durch die hemmende Wirkung dieser Stoffe auf die DO mitbedingt wäre. Derartige Beziehungen scheinen geeignet zu sein, der Enzymologie in Zukunft eine praktische Rolle in der Entwicklung neuer Heilmittel zuzuweisen.

¹⁰⁾ E. A. Zeller, J. Barsky, J. R. Fouts & J. C. Lazanas, *Biochem. J.* **60**, V (1955).

SUMMARY.

The hydrazides of both optical isomers of amino acids and isolysergic acid were tested for effects on amine oxidases. There was little action on monoamine oxidase (MO). However, some of the amino acid hydrazides, such as L-leucylhydrazide, turned out to be very effective inhibitors of diamine oxidase (DO). In every instance there was a significant difference between the action of the two antipodes. In seven pairs of antipodal amino acid derivatives, the L-form was much more effective than the D-form. Some conclusions about the optical configuration of the reactive site of DO have been drawn. The possible relationship between the low efficiency of the D-amino acid isomers as inhibitors and their low toxicity, as reported in the literature, has been discussed.

Department of Biochemistry, Northwestern
University Medical School, Chicago, Ill.

33. Zur Kenntnis des 1-Phenyl-2-methyl-1,2-dihydro-isochinolins

von P. R. Brook und P. Karrer.

(29. XII. 56.)

Eine als 1,2-Dihydro-2-methyl-1-phenyl-isochinolin bezeichnete Verbindung wurde zuerst von *Freund & Bode*¹⁾ durch Einwirkung von Phenylmagnesiumbromid auf Isochinolin-jodmethylat und später von *Schmid & Karrer*²⁾ durch Reduktion von 1-Phenyl-isochinolin-jodmethylat mit Lithiumaluminiumhydrid hergestellt. Da das nach letzterer Methode gewonnene Präparat durch Säuren verhältnismässig rasch irreversibel verändert wird und bei der Herstellung des 1,2-Dihydro-2-methyl-1-phenyl-isochinolins nach *Freund & Bode* bei der Aufarbeitung Säure verwendet wurde, war es notwendig, festzustellen, ob das letztere Präparat mit dem durch LiAlH_4 -Reduktion erhaltenen trotzdem identisch ist. Wir haben daher die Substanz nach beiden genannten Verfahren nochmals hergestellt und die Präparate verglichen. Sie erwiesen sich sowohl nach Smp., Misch-Smp. und Spektrum, sowie ihren übrigen Eigenschaften identisch.

Ein Versuch, dieselbe Verbindung durch Reduktion von 1-Phenylisochinolin-jodmethylat mit Natriumdithionit zu gewinnen, ergab nur Spuren eines Dihydroderivates. Die Reduktion des quartären Salzes gelingt also hier mit LiAlH_4 besser als mit Natriumdithionit.

¹⁾ Ber. deutsch. chem. Ges. **42**, 1746 (1909)

²⁾ Helv. **32**, 960 (1949).