

196. Über die Substratspezifität der Diamin-oxydase.

12. Mitteilung über Amin-oxydasen¹⁾

von E. Albert Zeller, James R. Fouts, John A. Carbon,
John C. Lazanas und Walter Voegtli.

(24. VII. 56.)

Die Erforschung der Struktur und Funktion der aktiven Zentren (reactive sites) von Fermenten dürfte als eines der wichtigsten und zugleich schwierigsten Probleme der Enzymologie und Biochemie überhaupt gelten. In unserm Laboratorium sind wir schon seit mehreren Jahren mit der Analyse der aktiven Zentren der Amin-oxydasen beschäftigt. Ein Teil dieses Programms bestand in der erneuten Prüfung des Spezifitätsbereiches der Diamin-oxydase (DO), deren Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit zusammengefasst worden sind²⁾. Diese Untersuchungen erwiesen sich als notwendig, da im wesentlichen nur bekannt war, dass dieses Ferment Histamin und eine Reihe von aliphatischen Diaminen angriff³⁾⁴⁾⁵⁾.

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

Experimentelles.

Alle in Tab. I ohne Herkunft angeführten Substanzen wurden in unserm Laboratorium synthetisiert, wobei die üblichen präparativen Methoden zur Anwendung gelangten. Hingegen wurden Reduktionen im Gegensatz zu ältern Angaben im allgemeinen in Tetrahydrofuran und mit LiAlH_4 ausgeführt. Als Beispiel möge die Umwandlung von Hexan-2,5-dion-dioxim zu XLVIII dienen. Ferner sei erwähnt, dass bei der Herstellung von XXXVI nach Wrede et al.⁶⁾ das in Benzol gelöste N,N'-Dimethyl-N,N'-dibenzolsulfonylcadaverin über eine Al_2O_3 -Säule vom Monomethylderivat abgetrennt wurde. Das letztere lieferte durch Hydrolyse VII, eine Verbindung, die vor längerer Zeit von R. Enger⁷⁾ auf andern Wege hergestellt worden war.

¹⁾ 11. Mitteilung: E. A. Zeller, J. Barsky & E. R. Berman, *J. biol. Chemistry* **214**, 267 (1955).

²⁾ Eine neue Klasse von Substraten, nämlich Monoamine, werden in einer nachfolgenden Publikation behandelt (vorläufige Mitteilung: J. R. Fouts, *Federation Proc.* **13**, 210 (1954)).

³⁾ E. A. Zeller, *Helv.* **21**, 880, 1645 (1938).

⁴⁾ Zusammenfassung der ältern Publikationen über DO bei E. A. Zeller, *Diamin-oxydase*, in *Advances in Enzymol.* **2**, 93 (1942).

⁵⁾ H. Blaschko & R. Dulhie, *Biochem. J.* **39**, 478 (1945).

⁶⁾ F. Wrede, H. Fanselow & E. Strack, *Z. physiol. Chem.* **163**, 219 (1927).

⁷⁾ Z. *physiol. Chem.* **189**, 239 (1930).

Tabelle I.
Liste der untersuchten Diamine.

Nr. ^{a)}	Verbindung	Herkunft b)	Pharma- kologische Aktivität ^{c)}
I	1,3-Diaminopropan, 2HCl		
II	1,4-Diaminobutan, 2HCl (Putrescin)		
III	1,5-Diaminopentan, 2HCl (Cadaverin)	<i>Roche</i>	
IV	N-Methylputrescin, 2HCl	<i>Amundsen</i>	
V	N,N-Dimethylputrescin, 2HCl		
VI	N,N,N-Trimethylputrescin, 2HBr		
VII	N-Methylcadaverin, 2HCl		
VIII	N,N,N-Trimethylcadaverin, 2HBr		
IX	2-Aminoäthyl-guanidin, H ₂ SO ₄		
X	3-Aminopropyl-guanidin, H ₂ SO ₄		
XI	4-Aminobutyl-guanidin, H ₂ SO ₄ (Agmatin)		
XII	5-Aminopentyl-guanidin, H ₂ SO ₄		
XIII	6-Aminoethyl-guanidin, H ₂ SO ₄		
XIV	2-(2'-Aminoäthyl)-imidazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0
XV	4(5)-(2'-Aminoäthyl)-imidazol, 2HCl (Histamin)	<i>Roche</i>	1,0
VXI	4-(2'-Aminoäthyl)-1-methylimidazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,006
XVII	5-(2'-Aminoäthyl)-1-methylimidazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0
XVIII	4(5)-(2'-Aminoäthyl)-2-methylimidazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,3
XIX	1-(2'-Aminoäthyl)-pyrazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	
XX	3-(2'-Aminoäthyl)-pyrazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	+
XXI	4-(2'-Aminoäthyl)-pyrazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	
XXII	4-(3'-Aminopropyl)-pyrazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	
XXIII	4-(2'-Aminoäthyl)-1,2,3-triazol, 2HCl	<i>Bristol</i>	
XXIV	4-(2'-Aminoäthyl)-1,5-diphenyl-1,2,3-triazol, 2HCl	<i>Bristol</i>	
XXV	3-(4'-Aminobutyl)-pyridin, 2HCl	<i>Eastern</i>	
XXVI	2-(2'-Aminoäthyl)-thiazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,3
XXVII	2,4(5)-Bis-(2'-aminoäthyl)-thiazol, 2HCl	<i>Lilly</i>	0
XXVIII	2-(2'-Aminoäthyl)-pyridin, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,05
XXIX	4-(2'-Aminoäthyl)-pyridin, 2HCl	<i>Alles</i>	0
XXX	2-(2'-Aminoäthyl)-pyrimidin, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,0009
XXXI	2-(2'-Aminoäthyl)-pyridazin, 2HCl	<i>Lilly</i>	0,002
XXXII	2-(2'-Aminoäthyl)-pyrazin, 2HCl	<i>Lilly</i>	0
XXXIII	2-(2'-Aminoäthyl)-chinolin, 2HCl	<i>Lilly</i>	0
XXXIV	N,N'-Dimethylputrescin, 2HCl		
XXXV	N,N,N',N'-Tetramethylputrescin, 2HCl		
XXXVI	N,N'-Dimethylcadaverin, 2HCl		
XXXVII	N,N,N',N'-Tetramethylcadaverin, 2HCl		
XXXVIII	2-(2'-Methylaminoäthyl)-pyridin, 2HCl	<i>Maltbie</i>	0,2

Tabelle I (Fortsetzung).

Nr. ^{a)}	Verbindung	Herkunft b)	Pharmakologische Aktivität ^{c)}
XXXIX	3-(4'-Methylaminobutyl)-pyridin, 2HCl	<i>Tobacco</i>	+
XL	4(5)-(2'-Isopropylaminoäthyl)-imidazol, 2HCl	<i>Bristol</i>	
XLI	4(5)-(2'-Acetylaminoäthyl)-imidazol, 2HCl	<i>Tabor</i>	
XLII	1,1'-Äthylendiguanidin, H ₂ SO ₄		
XLIII	1,1'-Trimethylendiguanidin, H ₂ SO ₄		
XLIV	1,1'-Pentamethylendiguanidin, H ₂ SO ₄		
XLV	1,1'-Hexamethylendiguanidin, H ₂ SO ₄		
XLVI	4(5)-(2'-Guanidinoäthyl)-imidazol, H ₂ SO ₄		
XLVII	1,3-Diaminobutan, 2HCl	<i>Herbst</i>	
XLVIII	2,5-Diaminohexan, 2HCl		
XLIX	1,3-Diamino-2-propanol, 2HCl		
L	4(5)-Aminomethyl-imidazol, 2HCl		
LI	4(5)-Aminomethyl-2-mercaptoimidazol, HCl	<i>Roche</i>	
LII	3-Aminomethyl-pyridin, Monotartrat	<i>Roche</i>	
LIII	2-Propanol-1,3-diguanidin, H ₂ SO ₄		
LIV	Streptidin, H ₂ SO ₄	<i>Merck</i>	
LV	Streptamin, H ₂ SO ₄	<i>Merck</i>	
LVI	Streptomycin, 3HCl	<i>Merck</i>	
LVII	4(5)-(2'-Amino-3'-bromopropyl)-imidazol, 2HBr	<i>Roche</i>	
LVIII	3-(1'-Aminoäthyl)-pyridin	<i>Tobacco</i>	0,2
LVIX	2-(2'-Methylaminopropyl)-pyridin, 2HCl	<i>Maltbie</i>	
LX	Pyridoxamin, 2HCl und Phosphate	<i>Roche u.</i> <i>Merck</i>	
LXI	Threo-2-amino-1-(p-aminophenyl)-1,3-propandiol	<i>Parke-</i> <i>Davis</i>	
LXII	Dinatrium-p, p'-sulfonyldianilin-N, N'-diglucosid- disulfonat	<i>Parke-</i> <i>Davis</i>	

^{a)} Sichere Substrate der DO werden mit fetten römischen Ziffern bezeichnet.

^{b)} Wir danken den folgenden Herren und Institutionen für die Überlassung von Präparaten: Prof. G. A. Alles, University of California (Los Angeles); Prof. L. H. Amundsen, University of Connecticut (Storrs); Dr. E. J. Herbst, University of Maryland (Baltimore); *Lilly Research Laboratories* (Indianapolis); Dr. A. R. Menotti (*Bristol Laboratories*, Syracuse); *Merck and Company* (Rahway); *Parke, Davis and Company* (Detroit); Dr. C. H. Rayburn (*The American Tobacco Company*, Richmond); Dr. R. Silberschmidt (*F. Hoffmann-La Roche & Co.*, Basel); Dr. H. Tabor, National Institutes of Health (Bethesda); Dr. L. A. Walter (*Maltbie Laboratories*, Newark), und Dr. C. F. Woodward (*Eastern Regional Research Laboratory*, Wyndmoor).

^{c)} Die Daten dieser Kolonne stammen hauptsächlich aus der folgenden Publikation: H. M. Lee & R. G. Jones, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **95**, 71 (1949); die pharmakologische Wirkung ist im Verhältnis zur Histaminaktivität (= 1,0) angegeben.

Ogleich nur zwei der angeführten Substanzen, XI und LIII, in der Literatur unauffindbar waren, so fehlten doch in vielen Fällen die üblichen physikalischen Konstanten. Aus diesem Grunde wurde für alle Verbindungen *Kjeldahl-N* und Amino-N bestimmt. Wie nötig dies war, zeigte das Beispiel der Synthese von symmetrischem Dimethylputrescin (XXXIV). Wenn die Synthese dieser Substanz nach der *Keil*'schen Angabe⁸⁾ aus Putrescin (II) und Formaldehyd versucht wurde, so entstand ausnahmslos das asymmetrische Dimethylputrescin (V), eine Verbindung, die papierchromatographisch sich als völlig einheitlich erwies. Nach *van Slyke* wurden 1,03 Mol Amino-N gemessen, und das Chloroplatinat schmolz bei 210⁰ (unkorr.), während für das Chloroplatinat von XXXIV, das nach *Wrede et al.*⁹⁾ in eindeutiger Weise erhalten wurde, 230⁰ (unkorr.) gefunden wurde.

DO wurde aus Schweineiere hergestellt⁹⁾; Fraktionierung durch Wärme, Aceton und (NH₄)₂SO₄ führte zu einer teilweisen Reinigung des Enzyms¹⁰⁾. Die Menge der jeweils verwendeten DO wurde in DO-Einheiten ausgedrückt. Die Einheit bezieht sich auf die unter Standardbedingungen (siehe unten) bestimmte Anfangsgeschwindigkeit und ist durch die Zahl der pro Std. verbrauchten Mikromol Sauerstoff definiert.

Wenn ein neues Diamin durch unsere Enzympräparate angegriffen wurde, dann versuchten wir mit Hilfe von Konkurrenz- und Hemmungsversuchen sicherzustellen, ob der Abbau tatsächlich durch DO oder durch ein von dieser verschiedenes Ferment erfolgte (siehe Ergebnisse). Wenn keine eindeutige oxydative Desaminierung eintrat, so wurden je nach der Wichtigkeit des Falles zwei Wege eingeschlagen: Entweder begnügten wir uns festzustellen, dass eine gegebene Substanz unvergleichlich viel langsamer als ein verwandtes Substrat der DO abgebaut wurde, oder wir inkubierten die fragliche Verbindung mit aktiven DO-Präparaten während 10 und mehr Std. und über einen weiten Konzentrationsbereich des Substrats. Auf diese Weise können auch solche Diamine als Substrate der DO erkannt werden, die eine geringe Affinität für das Enzym aufweisen, oder deren Ferment-Substrat-Komplex, einmal gebildet, ungewöhnlich langsam zerfällt. Besondere Aufmerksamkeit wurde in diesen Fällen den substrat- und enzymfreien Kontrollen geschenkt. Diese Kontrollen wurden für alle als Substrate in Frage kommenden Substanzen angesetzt, und die Ablesungen wurden von den Hauptwerten subtrahiert.

Wir massen die DO-Aktivität unter den üblichen Bedingungen: m/15 Phosphatpuffer pH 7,2, Sauerstoffatmosphäre, 38⁰. Ein Zusatz eines Tropfens n-Octanol verhinderte störendes Bakterienwachstum. Die Messung des Sauerstoffverbrauchs (*Warburg-Apparat*) und der Bildung von flüchtigen Aminen (*Conway-units*) geschah mit Hilfe der früher beschriebenen Verfahren¹¹⁾.

Mehrere Diamine und ihre Abbauprodukte wurden aufsteigend an *Whatman-Papier* Nr. 1 chromatographiert, das in eine 4:1:5-Mischung von Butanol, Essigsäure und Wasser eintauchte. Die Amine wurden durch Ninhydrinbesprühung lokalisiert¹²⁾.

Ergebnisse.

1. N-substituierte Diamine. *Substitution einer Aminogruppe*. Mit der Einführung einer oder zwei Methylgruppen in eine der beiden Aminogruppen eines Diamins wurde die enzymatische Abbaugeschwindigkeit auf die Hälfte oder weniger derjenigen der nicht substituierten Diamine reduziert (Tab. II). Bei den Trimethylammoniumderivaten hingegen war die Situation recht verschieden: VIII (0,005 –

⁸⁾ *W. Keil*, Z. physiol. Chem. **196**, 81 (1931).

⁹⁾ *E. W. McHenry & G. Gavin*, Biochem. J. **26**, 1365 (1932); *E. A. Zeller*³⁾.

¹⁰⁾ Die Einzelheiten der DO-Reinigung werden in einer folgenden Publikation mitgeteilt.

¹¹⁾ Zusammenfassung bei *E. A. Zeller*, Oxidation of amines, in *J. B. Sumner & K. Myrbäck*, The Enzymes, Acad. Press, New York 1951, Band II/1, 536.

¹²⁾ *H. B. Bull, J. W. Hahn & V. H. Baptiste*, J. Amer. chem. Soc. **71**, 550 (1949).

0,04-m.) wurde deutlich, aber nur langsam angegriffen, und VI noch weniger, wenn überhaupt. Da *Barlow et al.*¹³⁾ keine oxydative Desaminierung von VIII durch DO beobachteten, muss angenommen werden, dass die Autoren diese Verbindung nicht lange genug mit ihrem Schweinenierenpräparat inkubiert hatten. Der wirksame Hemmstoff für DO, Thiocarbohydrazid¹⁴⁾, reduzierte den Abbau der methylierten Diamine beträchtlich (Tab. II).

Tabelle II.

Enzymatischer Abbau von N-methylierten Diaminen.

Die Reaktionsgefäße enthielten: 5 Einheiten von partiell gereinigter DO in einem Gesamtvolumen von 2 ml.; 0,01-m. Substrate, mit Ausnahme von Trimethylaminen (0,04-m.); 10⁻⁴-m. Thiocarbohydrazid. Dauer der Versuche: 20 Std.

Substrate	Anfängliche Oxydationsgeschwindigkeit in %	Totale O ₂ -Aufnahme in Mikromol	$\frac{O}{N}$ *)	Hemmung durch Thiocarbohydrazid (O ₂) in %
Cadaverin (III)	100	13,4	2,0	89
N-Methylcadaverin (VII)	14**)	2,4	0,7	100
N,N,N-Trimethylcadaverin (VIII)	7	2,3	1,4	100
Putrescin (II)	100	6,8	0,6	68
N-Methylputrescin (IV)	49	3,6	0,5	62
N,N-Dimethylputrescin (V)	50	3,6	0,5	55
N,N,N-Trimethylputrescin (VI)	0	0	—	—

*) 10⁻⁶ Äquivalente Sauerstoff und 10⁻⁶ Mol Ammoniak, gemessen am Ende der Versuchsperiode.
 **) Die Anfangsgeschwindigkeit für 0,02-m. Lösung war 53%.

Nach der Desaminierung von IV in Gegenwart von DO wurden die flüchtigen Amine papierchromatographisch analysiert, ohne dass sich ein Hinweis auf die Bildung von Methylamin fand. Daraus muss gefolgert werden, dass nicht die substituierte, sondern die freie Aminogruppe abgespalten wurde.

Bei der Prüfung einer homologen Reihe von Aminoguanidinen (IX–XIII) wurde gefunden, dass in 0,001–0,002-m. Lösungen die C₃-Verbindung die optimale Kettenlänge aufweist (Tab. III). Agmatin (XI), das schon früher als Substrat der DO erkannt worden ist¹⁵⁾, wurde zu Vergleichszwecken der Liste beigelegt. Die Schlussfolgerung, dass der Abbau der Aminoguanidine durch die DO erfolgte, wurde durch die Ergebnisse der Versuche mit Thiocarbohydrazid bestätigt.

¹³⁾ R. B. Barlow, H. Blaschko, J. M. Himms & U. Trendelenburg, Brit. J. Pharmacol. **10**, 116 (1955).

¹⁴⁾ J. R. Fouts, J. Barsky & E. A. Zeller, Abstracts, Division of Biological Chemistry, American Chemical Society, 126. Versammlung, New York, p. 45C (1954); Monoaminooxydase wird durch dieses wie auch durch andere Acylhydrazine nicht blockiert.

¹⁵⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938); **24**, 539 (1941).

Tabelle III.

Enzymatischer Abbau von Aminoguanidinen.

Die Reaktionsgefäße enthielten: 4 Einheiten von partiell gereinigter DO in einem Gesamtvolumen von 2 ml., 0,001-m. Substrate, mit Ausnahme von 0,01-m. Cadaverin (diese niedrige Substratkonzentration wurde angewandt, weil bei höheren Konzentrationen die Reaktionsgeschwindigkeit abnahm); 5×10^{-5} -m. Thiocarbohydrazid. Inkubationsdauer: 4 Std.

Substrat	Q*)	Totale O ₂ -Aufnahme in Mikromol	$\frac{O}{N}$	Hemmung durch Thiocarbohydrazid (O ₂) in %
2-Aminoäthyl-g. (IX)	0,3	0,7	0,7	80
3-Aminopropyl-g. (X)	0,9	3,2	1,8	60
4-Aminobutyl-g. (XI)	0,6	1,9	1,0	89
5-Aminopentyl-g. (XII)	0,5	1,4	1,0	
6-Aminohexyl-g. (XIII)	0,4	1,3	0,8	
Cadaverin (III)	4,0	14,8	2,1	83

*) Anfängliche Oxydationsgeschwindigkeit, ausgedrückt in 10^{-6} Mol Sauerstoff pro Std.

Wenn eines der beiden Stickstoffatome eines Diamins einem heterocyclischen System angehört, dann zählen wir diese Base zu den in diesem Abschnitt behandelten Diaminen. Vorerst wurde bei diesen der Einfluss der Stellung der Seitenkette zum Imidazolring auf die enzymatische Oxydation untersucht. Abbau trat ein, wenn sich die Seitenkette in 4(5)-Stellung (Histamin, XV)¹⁶⁾, nicht aber wenn sie sich in 2-Stellung (XIV) befand. Da in manchen Imidazolverbindungen, z. B. in XV und XVIII, die 4- und 5-Stellungen äquivalent sind, so kann bei diesen natürlich eine Bevorzugung der einen oder andern Position nicht ermittelt werden. Mit der Einführung einer N-Methylgruppe dagegen werden Stellungen 4 (XVI) und 5 (XVII) verschieden. Die Substanzen XV–XVIII wurden von der DO mit ungefähr der gleichen Geschwindigkeit angegriffen, und ihre enzymatische Oxydation wurde durch Thiocarbohydrazid blockiert (Tab. IV). Das Verhalten von XVII gegenüber der DO wurde im Konzentrationsbereich 0,001–0,02-m. studiert. In ähnlicher Weise wie früher für XV beschrieben¹⁷⁾, nahm mit dem Überschreiten der optimalen Konzentration (0,004-m.) die Reaktionsgeschwindigkeit ab. Dieses Phänomen steht wahrscheinlich mit der Beobachtung im Zusammenhang, dass die Oxydationsgeschwindigkeit bei gleichzeitiger Anwesenheit von 0,04-m. XV und XVII kleiner ist ($Q_{XV+XVII}=1,7$) als die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Substrate oxydiert werden ($Q_{XV}=3,0$;

¹⁶⁾ Zusammenfassungen bei E. A. Zeller, On the classification and nomenclature of amine oxidases, in Ciba Symposium on Histamine, London 1955, p. 258, und ¹⁷⁾ ¹¹⁾.

¹⁷⁾ E. A. Zeller, B. Schär & S. Stachlin, Helv. **22**, 837 (1939).

$Q_{XVII} = 3,1$ ¹⁸⁾. Da *Alles et al.*¹⁹⁾ in einem weiteren methylierten Histamin, 4(5)-(2'-Aminoäthyl)-5(4)-methylimidazol, ein Substrat der DO erkannten, so kann zusammenfassend gefolgert werden, dass gute DO-Substrate erhalten werden, wenn die Äthylamin-Seitenkette in 4- oder 5-Stellung sich befindet, und dass Methylgruppen in 1-, 2- oder 4(5)-Stellung ohne Verlust der Substrateigenschaft eingefügt werden können.

Tabelle IV.

Enzymatischer Abbau von Methylhistaminen.

Die Reaktionsgefäße enthalten: 1 Einheit von partiell gereinigter DO in einem Gesamtvolumen von 2 ml.; 0,003-m. Substrate; 5×10^{-5} -m. Thiocarbohydrazid.

Inkubationsdauer: 8 Std.

Substrat	Q	Total O ₂ - Aufnahme in Mikromol	$\frac{O}{N}$	Hemmung durch Thiocarbo- hydrazid (O ₂) in %
Histamin (XV)	0,4	6,3	1,1	75
1-Methyl-4-(2'-aminoäthyl)- imidazol (XVI)	0,3	3,8	2,0	90
1-Methyl-5-(2'-aminoäthyl)- imidazol (XVII)	0,4	2,0	2,2	65
2-Methylhistamin (XVIII) . .	0,3	1,8	1,3	100

Wie aus Tab. V hervorgeht, eignen sich Pyrazol- und Triazol-derivate gut als Substrate der DO (XXI–XXIII). Wenn dagegen die Seitenkette von der 4-Stellung (XXI) nach 1 (XIX) oder nach 3 (XX) verschoben wird, dann geht die Substrateigenschaft ganz oder teilweise verloren (Tab. V). Dasselbe gilt für die Einführung von Benzolringen (XXIV) und für den Ersatz des Imidazolringes durch weitere fünf- und sechsgliedrige Heterocyclen (XXVI–XXXIII). 2-(2'-Aminoäthyl)-pyridin (XXVIII) und 4-(2'-Aminoäthyl)-pyridin (XXIX) wurden erfolglos unter den verschiedensten Bedingungen geprüft, während 2-(4'-Aminobutyl)-pyridin (XXV) durch DO angegriffen wurde; doch betrug die Abbaugeschwindigkeit weniger als ein Zehntel derjenigen des Cadaverins (III). Durch 0,001-m. Semicarbazid und *Girard'sches* Reagens T wurde die oxydative Desaminierung von XXV um mehr als 90 Prozent gehemmt. Die geringe Abbaugeschwindigkeit von XXV wurde offenbar nicht durch eine niedrige Affinität dieser Substanz für die DO bedingt, da die Oxydation verschiedener klassischer Substrate durch XXV beträchtlich vermindert wurde. So blockierte 0,001-m. XXV den Abbau von 0,01-m. Cadaverin um mehr

¹⁸⁾ Ähnliche Befunde wurden für die Ophio-L-aminosäure-oxydase erhoben: *E. A. Zeller & A. Maritz*, *Helv.* **27**, 1888 (1934), Tabelle 10.

¹⁹⁾ *G. A. Alles, B. B. Wisegarver & M. A. Shull*, *J. Pharmacol. exp. Therap.* **77**, 54 (1943).

als die Hälfte. Die Amine XV und XXV wurden langsamer angegriffen, wenn sie gleichzeitig im enzymatischen System vorhanden waren, als wenn sie einzeln der DO zugesetzt wurden (siehe oben erwähntes Beispiel für XV und XVII). Nach diesen Ergebnissen kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass es gute Substrate der DO gibt, die den einen oder andern Ring der Verbindungen XXVI–XXXIII aufweisen; die Verknüpfung der Seitenkette mit dem Ring müsste dann aber verschieden von der der Verbindungen XXVI–XXXIII sein.

Tabelle V.

Enzymatischer Abbau von Imidazol-, Pyrazol- und Triazolderivaten.

Die Reaktionsgefäße enthielten: 1,5 Einheiten einer partiell gereinigten DO in einem Gesamtvolumen von 2 ml.; 0,01-m. Substrate; 5×10^{-5} -m. Thiocarbohydrazid.

Inkubationsdauer: 20 Std. (Versuche 1–3) und 6,5 Std. (Versuche 4 und 5).

Substrat	Q	Totale O ₂ - Aufnahme in Mikromol	$\frac{O}{N}$	Hemmung durch Thio- carbohydrazid (O ₂) in %
Histamin (XV)	0,5	12,7	2,2	62
3-(2'-Aminoäthyl)-pyrazol (XX)	0,1	0,8	— *)	25
4-(2'-Aminoäthyl)-pyrazol (XXI)	0,3	7,0	3,6	57
4-(3'-Aminopropyl)-pyrazol (XXII)	0,3	0,9	1,6	67
4-(2'-Aminoäthyl)-1,2,3-triazol (XXIII)	0,7	3,4	1,4	90
*) Keine Bildung von flüchtigen Aminen.				

Für einige Substanzen der Serie XXVI–XXXIII wurde nach einer mehrere Stunden dauernden Inkubationsperiode gelegentlich ein positiver Sauerstoffverbrauch beobachtet, aber nur dann, wenn rohe Enzympräparate benützt wurden. Wahrscheinlich ist ein von der DO verschiedenes Agens für diese Erscheinung verantwortlich zu machen. *Werle et al.*²⁰⁾ erwähnen eine geringfügige Oxydation von XXVIII durch Erbsenkeimlingsextrakte, während *Arunlakshana et al.*²¹⁾, in Übereinstimmung mit unsern Erfahrungen, keinen Abbau von XX und XXVIII mit Schweinenieren-DO herbeizuführen vermochten.

Substitution beider Aminogruppen: N,N'-Dimethylputrescin (XXXIV), N,N'-Dimethylcadaverin (XXXVI) und die entsprechenden symmetrischen Tetramethylderivate XXXV und XXXVII scheinen nicht von der DO angegriffen zu werden, selbst innerhalb eines weiten Konzentrationsbereichs (z. B. für XXXIV: 0,0007–0,025-m.), und selbst wenn sie viele Stunden mit aktiven DO-Präparaten inku-

²⁰⁾ *E. Werle & D. Palm*, *Biochem. Z.* **323**, 255, 424 (1952/1953).

²¹⁾ *O. Arunlakshana, J. L. Mongar & H. O. Schild*, *J. Physiol.* **123**, 32 (1954).

biert werden. Wenn diese methylierten Diamine dem System DO/Cada-verin (III) in äquimolekularen Mengen zugesetzt werden, tritt keine Hemmung der Oxydation von III ein, ein Zeichen für die geringe Affinität dieser Substanzen für die DO. Im Gegensatz zu den nicht methylierten Muttersubstanzen II und III diffundieren die Verbindungen XXXIV–XXXVI in die zentrale Abteilung der *Conway's*chen Gefässe; es ist daher nicht möglich, mit dieser Methode die abgespaltenen flüchtigen Amine zu erfassen. Ausserdem verursachen die gleichen Diamine schon bei sehr geringen Konzentrationen einen Niederschlag mit *Nessler's*cher Lösung, so dass auch die Anwendung dieses Reagens ausser Betracht fällt. Schliesslich unterwarfen wir die Enzym-lösungen, nachdem sie im *Warburg's*chen Apparat inkubiert worden waren, in den *Conway*-units der Diffusion. Die Papierchromatographie der diffundierten Substanzen liess nur die unveränderten methylierten Diamine erkennen.

In einer vorläufigen Mitteilung²²⁾ wurde behauptet, dass die DO die Oxydation von symmetrischem Dimethylputrescin (XXXIV) zu katalysieren vermöge, was im Widerspruch mit den vorliegenden Ergebnissen steht. Die in der frühern Publikation geprüfte Verbindung war aber nicht das symmetrische XXXIV, sondern die unsymmetrische Substanz V. Die Verwechslung war durch das unvorhergesehene Ergebnis der damals benutzten synthetischen Methode bedingt (siehe Experimentelles).

Im Hinblick auf die oben erwähnten Resultate war es keine Überraschung festzustellen, dass die N-methylierten Pyridinderivate XXXVIII und XXXIX, N-Isopropylhistamin (XL) und die Acyldiamine XLI–XLVI in Gegenwart von DO nicht verändert wurden. Als Beispiel seien die Diguanidine XLII–XLV erwähnt, die 15 Std. mit 2 DO-Einheiten inkubiert wurden, ohne dass Sauerstoff aufgenommen oder flüchtige Amine gebildet wurden. Für 1,1'-Tetramethylen-diguanidin (Arcaïn) und Decamethylen-diguanidin (Synthalin) wurden schon früher negative Resultate mitgeteilt²³⁾. *Werle* et al.²⁰⁾ beobachteten einen geringfügigen Abbau von 4(5)-(2-Methylaminoäthyl)-imidazol durch Extrakte von Erbsenkeimlingen.

2. α -Methyldiamine. Die Einführung einer Methylgruppe in die α -Stellung eines aliphatischen Diamines zerstört dessen Substrateigenschaft für die DO nicht. 1,3-Diaminobutan (XLVII) ist ein besseres Substrat als 1,3-Diaminopropan (I) und beinahe so gut als 1,4-Diaminobutan (II) (Tab. VI). Wenn dagegen die zweite α -Methylen-gruppe mit einer Methylgruppe substituiert wird, dann geht die Substrateigenschaft verloren. DO veranlasste nicht die geringste oxydative Desaminierung von 0,001–0,007-m. 2,5-Diaminohexan (XLVIII),

²²⁾ *E. A. Zeller*, Verhandl. Ver. Schweiz. Physiol. 17, 23 (1940).

²³⁾ *E. A. Zeller*, Helv. 21, 880 (1938).

sogar wenn die Inkubationsperiode von 140 auf 1700 Min. ausgedehnt wurde. Da der Abbau von II selbst bei niedrigen Substratkonzentrationen durch XLVIII nicht beeinflusst wird, so muss XLVIII eine sehr geringe Affinität für die DO besitzen. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen steht die Beobachtung von *Alles et al.*¹⁹⁾, dass α -Methylhistamin nicht ein Substrat der DO zu sein scheint.

Tabelle VI.

Enzymatischer Abbau von C₃- und C₄-Diaminen.

Die Reaktionsgefäße enthielten: 3 Einheiten einer partiell gereinigten DO in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml.; 0,01-m. Substrate. Die Reaktion wurde nach 2 Std. durch Einkippen von Trichloressigsäure aus einem zweiten Seitenarm gestoppt.

Substrat	Q	Totale O ₂ -Aufnahme in Mikromol	$\frac{O}{N}$
1,3-Diaminopropan (I)	2,1	1,3	1,0
1,3-Diamino-2-propanol (XLIX)	0,5	0,5	1,0
1,4-Diaminobutan (II)	2,9	3,2	0,8
1,3-Diaminobutan (XLVII)	2,6	3,0	1,0

3. Weitere α -substituierte Diamine. Die Gegenwart einer Hydroxylgruppe in α -Stellung eines aliphatischen Diamines (XLIX) reduziert dessen Oxydationsgeschwindigkeit in Gegenwart von DO (Tab. VI). In Suspensionen von Smegmabazillen dagegen ist das Verhältnis zwischen den Verbindungen I und XLIX gerade umgekehrt²⁴⁾.

In allen bisher geprüften Fällen bildet das Vorhandensein von wenigstens einem β -Wasserstoffatom die notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für den Abbau eines Diamins durch die DO. Das zu Histamin (XV) homologe Amin L und dessen SH-Derivat LI werden selbst in langdauernden Versuchen nicht angegriffen. Ein vergleichbares Paar von Diaminen wird von XXV (siehe oben) und LII gebildet. DO ist ohne Einfluss auf das letztere.

4. Mehrfach substituierte Diamine. Die Diamine LIII–LXII enthalten eine oder mehrere Gruppen, die nach dem oben Gesagten einen Abbau dieser Stoffe durch die DO verhindern sollten. Es war deshalb nicht verwunderlich, dass keine dieser Stoffe sich als ein Substrat der DO erwies. In einer vorläufigen Publikation dagegen wurde über die enzymatische Oxydation von Promin (LXII) berichtet²⁵⁾. Dieser Irrtum war durch die ungewöhnlich hohe Autoxydation dieser Substanz bedingt. *Werle et al.*²⁰⁾ beobachteten eine geringfügige Oxydation von 2-(2'-Methylaminopropyl)-pyridin durch Extrakte von Erbsenkeimlingen.

²⁴⁾ *E. A. Zeller, C. A. Owen Jr. & A. G. Karlson, J. biol. Chemistry* **188**, 623 (1951).

²⁵⁾ *E. A. Zeller, G. A. Fleisher & D. C. Utz, Federation Proc.* **9**, 251 (1950).

Diskussion.

An der auffallenden Wirksamkeit der Enzyme ist wohl die ganze Fermentmolekel beteiligt. Doch muss zugestanden werden, dass die Konfiguration desjenigen Fermentanteils, der unmittelbar mit dem Substrat reagiert, von besonderer Bedeutung für den Enzymvorgang sein muss. Offensichtlich ist es vorderhand nicht möglich, die Struktur dieser aktiven Zentren mit den klassischen Methoden der organischen Analyse anzugehen. An ihre Stelle treten Untersuchungen über die Spezifitätsbereiche von Substraten und Inhibitoren, kinetische Analyse des Reaktionsmechanismus, spektroskopische Messungen, Ausführung von Modellversuchen usw. In der vorliegenden Arbeit werden unsere Ergebnisse über die Substrat-Spezifität dargestellt, soweit sie im Hinblick auf das erwähnte allgemeine Problem von Interesse sind.

Es ist schon lange bekannt, dass unter dem Einfluss der DO nur eine Aminogruppe eines einfachen aliphatischen Diamines von diesem in Form einer flüchtigen Base abgetrennt wird²³). Diese Tatsache allein genügt schon, um auf die Verschiedenheit der Rolle, den die beiden Aminogruppen im System Diamin/DO spielen, hinzuweisen. Zur Erleichterung der nachfolgenden Diskussion sei der Buchstabe A für die enzymatisch abspaltbare Aminogruppe, B für die stabile (d. h. die in Gegenwart der DO nicht freiwerdende) basische Gruppe und C für das nicht basische Teilstück der Substrate (z. B. die aliphatische Kette von I–III) eingeführt. Die entsprechenden Komponenten des aktiven Fermentzentrums, mit denen A, B und C reagieren, sollen mit a, b und c bezeichnet werden.

Im Hinblick auf die Versuche mit N,N'- und α,α' -substituierten Diaminen muss geschlossen werden, dass nur terminale, unsubstituierte Aminogruppen als A auftreten können. Folglich müssen alle basischen Gruppen, die diese Bedingung nicht erfüllen, der Kategorie B zugeordnet werden. Diese besteht somit aus Aminogruppen in α - und β -Stellung (Tabellen II und VI), Mono- und Dimethylamino-Gruppe (Tab. II), Guanidingruppe (Tab. III), Imidazol- (Tab. IV), Pyrazol- und Triazolring (Tab. V). Die Trimethylammoniumgruppe (Tab. II), der Pyridinring und andere sechsgliedrige Heterocyklen scheinen sich schlechter für diese Funktion zu eignen. Wenn alle diese Umstände in Betracht gezogen werden und wenn beachtet wird, dass der Imidazol- und Pyrazolring stärker nukleophil ist, als es die Ringe des Pyridins, Pyrimidins, Pyrazins und Pyridazins sind²⁶), so wird es offenbar, dass Gruppe B nicht in ihrer Eigenschaft als positiv geladene Gruppe reagiert, wie das früher angenommen worden ist¹¹), sondern vielleicht als nukleophiles System.

Die Konfiguration der Gruppe a vermag zwischen nahe verwandten Heterocyklen und zwischen Diaminen mit identischem Ring und gleicher Seitenkette, aber verschiedener Lokalisierung der letztern, scharf zu differenzieren. In dieser Hinsicht erweist sich a, und

²⁶) H. M. Lee & R. G. Jones, J. Pharmacol. exp. Therap. **95**, 71 (1949).

damit auch das ganze aktive Zentrum, als wählerischer als die Histaminrezeptoren, wie aus einem Vergleich der histaminartigen Wirkung heterocyclischer Amine (Kolonne 4, Tab. I) mit deren Eignung, als Substrate der DO zu dienen (Kolonne 1), hervorgeht. Diese Schlussfolgerung ist unvereinbar mit Stern's interessanter Hypothese²⁷⁾, nach der DO und Histaminrezeptor identisch sein sollen.

Die Geschwindigkeit, mit der Diamine in Gegenwart von DO oxydativ desaminiert werden, ist eine Funktion der Kettenlänge²⁸⁾⁵⁾. Wenn die aliphatische Kette eines Diamines 5 Kohlenstoffatome überschreitet, dann nimmt die enzymatische Abbaugeschwindigkeit ab⁵⁾. Solche Optima der Kettenlänge existieren auch für Pyrazol- und Guanidinderivate (Tab. III und V). Wenn wir die einfachen Diamine mit den Aminoguanidinen vergleichen, so sehen wir, dass die effektive Kettenlänge nicht nur durch die Zahl der CH₂-Einheiten, sondern auch durch die C(NH)- und NH-Gruppen des Guanidinrestes gegeben ist.

Wenn die Kette verlängert wird, ohne dass der Abstand der basischen Gruppe verändert wird, dann nimmt die Substratqualität zu (Tab. VI). An diesem Beispiel wird es zum ersten Mal klar, dass die Gruppe C eine doppelte Funktion besitzt, nämlich durch die Definierung des Abstandes zwischen den Gruppen A und B und durch die Wirkung der (*van der Waals'schen*) Kräfte, die die Glieder von C auf c ausüben.

Die Struktur von A ist ebenfalls durch zwei grundverschiedene Bedingungen definiert: Erstens wird A wohl eine wesentliche Rolle in der Bildung des Ferment-Substrat-Komplexes spielen, und zweitens müssen A und die benachbarten Teile von C so beschaffen sein, dass eine enzymatische Umwandlung des Substrats möglich ist. Es ist vermutet worden, dass die Notwendigkeit der Gegenwart von α - und β -Wasserstoffatomen auf die letztere Ursache zurückzuführen ist²⁹⁾. Doch ist eine Abgrenzung der beiden Einflüsse auf Grund der Substratspezifität allein nicht möglich. Hingegen könnte eine bessere Einsicht in diese Verhältnisse gewonnen werden, wenn Substanzen benutzt würden, die mit dem aktiven Zentrum reagieren, ohne dabei einen Abbau zu erfahren. In manchen Hydrazinderivaten, die als isostere Amine aufgefasst werden können, scheinen solche Substanzen vorzuliegen³⁰⁾.

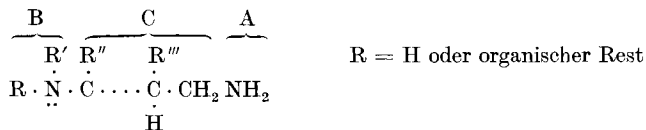
²⁷⁾ P. Stern, Liječnički Vjesnik **9/10**, 1 (1946).

²⁸⁾ E. A. Zeller, Helv. **21**, 1645 (1938).

²⁹⁾ Siehe erwähnte Monographien ⁴⁾¹¹⁾¹⁶⁾.

³⁰⁾ Die Resultate von Versuchen, die mit einer grossen Zahl von Hydrazinderivaten ausgeführt wurden, werden später ausführlich mitgeteilt (vorläufige Mitteilungen: E. A. Zeller, J. Barsky, J. R. Fouts & J. C. Lazanas, Biochem. J. **60**, V (1955); Ciba Symposium, l. c.¹⁶⁾, p. 339.

Zusammenfassend lässt sich somit die allgemeine Struktur eines DO-Substrats in der folgenden, vorläufigen Form darstellen:



Ob A als Amino- oder Ammoniumrest vorliegt, ist nicht entschieden. Es bestehen Gründe für die Annahme, dass das Elektronenpaar in B mit demjenigen Enzymteil reagiert, der von den Carbonylreagentien blockiert wird³¹). Die Abwesenheit eines freien Elektronenpaares in B beim Trimethylcadaverin (VIII) scheint gegen die obige Formulierung zu verstossen. Doch verhält sich VIII gegenüber der DO wie eines der Monoamine, die als Substrate mit geringer Affinität für die DO dienen können³²).

Da bekannt ist, dass DO verschiedener Herkunft nicht identisch sind, sondern eine Gruppe von homologen Enzymen darstellen³³), beschränkten wir uns in der vorliegenden Publikation auf die Mitteilung von Ergebnissen, die ausschliesslich mit Schweinenierenpräparaten gewonnen wurden³⁴).

SUMMARY.

1. Out of 62 diamines, tested as potential substrates of mammalian diamine oxidase (DO), 22 are acted upon by this enzyme. Fifteen compounds are reported for the first time to be substrates of DO in general and 17 for the enzyme obtained from hog kidney cortex.

2. In heterocyclic amines, the shift of the aminoalkyl side chain from one position of the ring to another abolishes the substrate property toward DO.

3. *N,N'*- and α, α' -substituted diamines are not substrates of DO.

4. There is no parallelism between the specificity patterns of DO and histamine receptors.

5. A tentative formula for the general substrate of DO is proposed, and the role of the various parts of diamines in the interaction with the reactive site of DO is discussed.

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

³¹) *E. A. Zeller*, The fate of histamine in the body with particular reference on the enzymology of histamine oxidation, in Ciba Foundation Symposium on Histamine, London 1955, p. 339.

³²) Siehe ²).

³³) Siehe ⁴) und besonders ¹¹) und in Ciba Symposium, l. c. ¹⁶), p. 258.

³⁴) Resultate, die mit DO-Präparaten von andern Organen und Tierarten, von Bakterien usw. erhalten wurden, werden später publiziert.