

201. Über die Wirkung von symmetrischen 1,2-Dialkylhydrazinen auf Carbonylverbindungen und Amin-oxydasen

16. Mitteilung über Amin-oxydasen¹⁾²⁾

von **John A. Carbon, Willy P. Burkard**
und **E. Albert Zeller**

(11. VIII. 58)

Alle bisher geprüften Carbonylreagentien blockieren das Enzym Diamin-oxydase (DO)³⁻¹⁰⁾: aus dieser Erfahrungstatsache wurde auf die Anwesenheit einer Carbonylgruppe im aktiven Zentrum der DO geschlossen³⁾⁵⁾⁸⁾. In Anlehnung an die mathematischen Funktionszeichen sei diese Carbonylgruppe durch das Symbol DO(CO) dargestellt. Das Enzym DO wird aber nicht nur durch die klassischen Carbonylreagentien, sondern auch durch 1,2-disubstituierte Hydrazinderivate wie beispielsweise 1,2-Dimethylhydrazin gehemmt¹¹⁾. Verbindungen dieser Art können natürlich keine Hydrazone mit DO(CO) bilden; dagegen besteht die Möglichkeit, dass das nukleophile dialkylierte Hydrazin mit einer oder mehreren elektrophilen Gruppen des aktiven Fermentzentrums reagiert. Da wenig über derartige Wechselwirkungen bekannt war, studierten wir an Modellen den Einfluss von 1,2-Dialkylhydrazinen auf verschiedene Carbonylderivate und verglichen die Ergebnisse mit den entsprechenden enzymologischen Versuchen.

Wir danken den *National Institutes of Health* (United States Public Health Service, Grant E-1413 (C 5)), der *Multiple Sclerosis Foundation of America* (Prof. D. LEWIS J. POLLOCK, Responsible Investigator), und der Firma *HOFFMANN-LA ROCHE*, Basel, für die Unterstützung dieser Arbeit.

¹⁾ 15. Mitteilung: E. A. ZELLER, J. BARSKY, E. R. BERMAN, M. S. CHERKAS & J. R. FOUTS, *J. Pharmacol. exp. Therap.* (im Druck).

²⁾ Ein Teil der vorliegenden Ergebnisse wurde früher mitgeteilt: J. A. CARBON & E. A. ZELLER, Abstracts, Division of Biological Chemistry, American Chemical Society, 129. Versammlung, Dallas, p. 2C (1956).

³⁾ E. A. ZELLER, *Helv.* **21**, 880, 1645 (1938); **23**, 1418 (1940).

⁴⁾ E. WERLE, *Biochem. Z.* **304**, 201 (1940).

⁵⁾ E. F. GALE, *Biochem. J.* **36**, 64 (1942).

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

⁷⁾ E. A. ZELLER, J. BARSKY, J. R. FOUTS, W. F. KIRCHHEIMER & L. S. VAN ORDEN, *Experientia* **8**, 349 (1952).

⁸⁾ A. N. DAVISON, *Biochem. J.* **64**, 546 (1956).

⁹⁾ E. A. ZELLER, L. A. BLANKSMA & J. A. CARBON, *Helv.* **40**, 257 (1957).

¹⁰⁾ G. N. PERSHIN & V. V. NESVADBA, *Biokhimiya* **22**, 752 (1957).

¹¹⁾ E. A. ZELLER, On the Nature of the Reactive Surface of Amine Oxidases, in: Symposium on Biochemistry and Nutrition, Cornell University, May 1955, published by the New York State College of Agriculture, Ithaca, N. Y., 1956, p. 25–33.

Experimenteller Teil

Für die Versuche mit DO verwendeten wir ein aus Schweinenierenrinde partiell gereinigtes Präparat¹²), für diejenigen mit Monoamin-oxydase (MO) gewaschene Mitochondrien aus Rinderleber¹³). Die Aktivität der Fermente wird als Q_{ox} und Q_{am} (Anfangsgeschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme, ausgedrückt in Mikroatomen pro Std., und Bildung von flüchtigen Aminen, gemessen nach 60 Min. für MO und 90 Min. für DO und berechnet als Mikromole pro Std.) angegeben. Diese Werte dienten für die Berechnung der pI_{50} -Werte (pI_{ox} und pI_{am}), die den negativen Logarithmus derjenigen Inhibitor-konzentration darstellen, die eine 50-proz. Hemmung verursacht.

Die Aldehyde – EASTMAN KODAK White Label Chemicals – wurden unmittelbar vor Gebrauch destilliert, während die übrigen Carbonylverbindungen unverändert benutzt wurden¹⁴). Das Methylhydrazinsulfat (White Label) stammte von der Firma EASTMAN KODAK, 1,2-Diäthylhydrazin, 2HCl, 1,2-Di-n-propylhydrazin, 2HCl und 1,2-Diisopropylhydrazin, HCl, von der Firma ABBOTT LABORATORIES¹⁵). 1,1-Dimethylhydrazin, HCl und 1,2-Dimethylhydrazin, 2HCl wurden nach HATT *c. s.*¹⁶) dargestellt. Das 1,1-Dimethylhydrazon des Acetaldehyds wurde als farblose Flüssigkeit erhalten, die bei 89° destillierte (KLAGES *c. s.* geben Sdp. 89–94° an¹⁷)).

Möglichst ähnliche Bedingungen herrschten für die manometrischen und spektrophotometrischen Bestimmungen. Als Lösungsmittel gelangte in beiden Fällen 0,067-m. Phosphatpuffer pH 7,2 zur Anwendung.

Die Absorptionsspektren wurden mit einem BECKMAN-Modell DU Spektrophotometer aufgenommen (optische Weglänge: 1 cm). Ein Thermospacer hielt die Temperatur der Küvettenkammer konstant. Alle Inkubationen und Messungen fanden, wenn keine weiteren Angaben erfolgen, bei 38° statt. Da der Luftsauerstoff Aldehyde und Hydrazine oxydierte und dadurch merkliche Änderungen der Spektren verursachte, erfolgten alle länger dauernden Inkubationen in evakuierten THUNBERG-Gefässen. Um messbare Reaktionsänderungen zu erzielen, mussten in einigen Fällen Konzentrationen angewandt werden, die zu hoch für direkte optische Messungen waren; in diesen Fällen verdünnten wir die Lösungen unmittelbar vor der Ablesung. Alle optischen Dichten wurden auf molare Extinktionen (ϵ) umgerechnet.

Ergebnisse

1. *Einfluss von 1,2-Dialkylhydrazinen auf Amin-oxydasen.* Zwischen dem hemmenden Einfluss der 1,2-Dialkylderivate auf die MO und auf die DO besteht eine weitgehende Parallelität. Während die ersten drei Derivate der Tab. I den gleichen Blockierungseffekt hervorbringen, fällt die Diisopropylverbindung stark ab. Die DO wird ungefähr 20mal stärker als die MO gehemmt. Doch ist die Inhibitorwirkung selbst für die MO beinahe so gross wie die des Iproniazids¹⁸) ($pI_{50} = 5,0$).

Die enzymologische Analyse erfolgte unter den früher dargestellten Standardbedingungen^{11,12,13}). Zur Erzielung maximaler Hemmung wurde der Inhibitor 15 Min. vor dem Substrat dem Enzym zugesetzt^{13,18}).

2. *Modellversuche mit Carbonyl- und Hydrazin-Verbindungen.* Zuerst wurden Versuche mit Acetaldehyd als elektrophiler Komponente und 1,1-Dimethylhydrazin durchgeführt. Wenn der Aldehyd, dessen optische Dichte bei der angewandten Konzentration vernach-

¹²) E. A. ZELLER, J. R. FOUTS, J. A. CARBON, J. C. LAZANAS & W. VOEGTLI, *Helv.* **39**, 1632 (1956).

¹³) E. A. ZELLER, J. BARSKY & E. R. BERMAN, *J. biol. Chemistry* **214**, 267 (1955).

¹⁴) Für die Überlassung von Oxalessigsäure, α -Ketoglutar säure, Pyridoxal und Pyridoxalphosphat sind wir der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Nutley, N. J., zu Dank verpflichtet.

¹⁵) Wir danken Herrn Dr. W. J. CLOSE für diese Hydrazinderivate.

¹⁶) H. H. HATT, *Organic Syntheses*, Collective Vol. **2**, 208 (1943).

¹⁷) F. KLAGES, G. NOBER, F. KIRCHER & M. BOCK, *Liebigs Ann. Chem.* **547**, 27 (1941).

¹⁸) A. N. DAVISON, *Biochem. J.* **67**, 316 (1957).

¹⁹) 1-Isonicotinyl-2-isopropylhydrazin, Marsilid.

Tabelle I. *Hemmung von Amin-oxidasen durch 1,2-Dialkylhydrazine*

In 2 ml Phosphatpuffer war entweder MO in Form von Mitochondrien, die 0,1 g Rinderleber entsprachen ($Q_{ox} = 17,8$), oder DO in Form von 0,2 ml eines Schweinenierenpräparates ($Q_{ox} = 3,7$) suspendiert

1,2-Disubstituierte Hydrazine	MO		DO	
	pI_{ox}	pI_{am}	pI_{ox}	pI_{am}
Dimethylhydrazin . . .	4,3 ²⁰⁾	4,7	5,9	5,7
Diäthylhydrazin	4,6	4,6	5,7	5,7
Di-n-propylhydrazin . .	4,6	4,6	6,0	6,0
Di-isopropylhydrazin . .	2,6	2,7	3,7	3,3

lässigt werden konnte, der 1,1-Dimethylhydrazinlösung zugesetzt wurde, änderte sich das UV.-Absorptionsspektrum der Lösung und wurde innerhalb 15 Min. identisch mit dem Spektrum des synthetischen 1,1-Dimethyläthylidenhydrazins (Fig.1). Somit trat die Wechselwirkung zwischen Acetaldehyd und der nukleophilen Verbindung in unserer Versuchsanordnung tatsächlich zutage.

Wenn Acetaldehyd und 1,2-Dimethylhydrazin zusammen in Puffer gelöst wurden, dann fanden wir, ähnlich wie beim 1,1-Dimethylhydrazin, eine Verschiebung der Endabsorption nach grösseren Wellenlängen²¹⁾. Die Reaktion erreichte bei einer Temperatur von 2° in weniger als 15 Sek. den Endpunkt. Ähnliche Versuche mit Butyr- und Valeraldehyd führten zum gleichen Ergebnis. Im Hinblick auf die Ergebnisse der enzymologischen Versuche (Tab. I) war es für uns von Interesse, das Verhalten des 1,2-Diisopropylhydrazins mit dem anderer 1,2-Dialkylhydrazine im Modellversuch zu vergleichen. Die

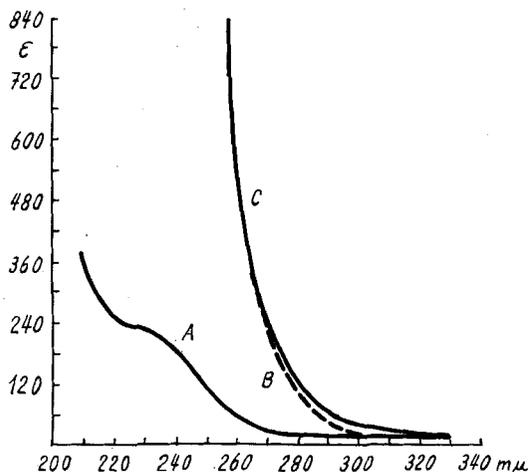


Fig. 1

UV-Absorptionsspektren von 1,1-Dimethylhydrazinderivaten

Alle Substanzen lagen in 1,67-milli-m. Lösungen vor. Kurve A: 1,1-Dimethylhydrazin; Kurve B: 1,1-Dimethyläthylidenhydrazin; Kurve C: Acetaldehyd + 1,1-Dimethylhydrazin. Das Maximum der Absorption von Acetaldehyd ($\epsilon = 6,2$) in dem angegebenen Bereich lag bei 280 $m\mu$

²⁰⁾ Der früher angegebene Wert von 2,7 (siehe Literaturhinweise 11 und 21) konnte nicht bestätigt werden.

²¹⁾ E. A. ZELLER, J. Clin. Exp. Psychopath. & Quart. Rev. Psychiat. Neurol. **19**, Suppl. 1, 27 (1958); Fig. 2.

Spektra der 1,2-Dialkylhydrazine und deren Reaktionsprodukte mit Acetaldehyd wurden zwischen 220 und 300 $m\mu$ aufgenommen. Wiederum trat beim Aldehydzusatz eine Verschiebung der Endabsorption nach kleineren Frequenzen auf, die aber beim 1,2-Diisopropylhydrazin nur schwach angedeutet war. Die in Tab. II angeführten molaren Extinktionen geben ein deutliches Bild der Verhältnisse. Der Unterschied zwischen der beobachteten molaren Extinktion der Mischung (ϵ_{a+h}) und der arithmetischen Summe der individuellen Extinktionen ($\epsilon_a + \epsilon_h$) wird durch das Symbol Δ angegeben. Wie beim Fermentversuch, so fällt auch hier das Isopropylderivat aus dem Rahmen der übrigen 1,2-Dialkylverbindungen.

Tabelle II. Einfluss des Zusatzes von Acetaldehyd auf die Extinktion von 1,2-Dialkylhydrazinen

Die in der Tab. angeführten Verbindungen wurden in 16,7-milli-m. Lösungen 10 Min. bei 38° inkubiert (Standardbedingungen) und dann mit Pufferlösung so weit verdünnt, dass die Ablesungen in günstigen optischen Bereichen gemacht werden konnten. Wellenlänge: 230 $m\mu$, Temperatur der Küvettenkammer: 13°, Acetaldehyd $\epsilon_a = 1,3$. Für weitere Erklärungen siehe Text

Verbindung	Ablesungs-konzentrat.	ϵ_h	$\epsilon_a + \epsilon_h$	ϵ_{a+h}	Δ
1,2-Dimethylhydrazin .	0,0083-m.	21,1	22,4	148	126
1,2-Diäthylhydrazin . .	0,0056-m.	56,2	57,5	106	48,5
1,2-Di-n-propylhydrazin .	0,0033-m.	93,6	94,9	321	236
1,2-Diisopropylhydrazin	0,0083-m.	23,9	25,2	31,6	6,4

Im Unterschied zu den aliphatischen Aldehyden reagierte Benzaldehyd viel langsamer mit Methylhydrazin. Das vollständige System wie auch die einzelnen Komponenten wurden anaerob während 5 Std. bei 38° inkubiert. Die Hydrazonbildung ist durch die Abnahme der Bande bei 250 $m\mu$ (Bande III) und durch die Zunahme der Bande bei 280 $m\mu$ (Bande II) gekennzeichnet (Fig. 2). Wenn Benzaldehyd und 1,2-Dimethylhydra-

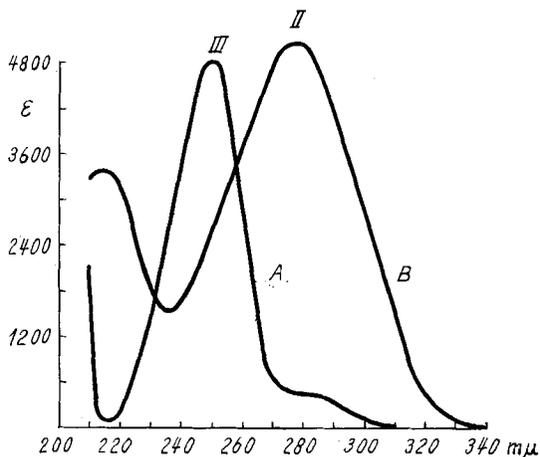


Fig. 2

UV-Absorptionsspektren von Benzaldehyd und Methylhydrazin

Die Komponenten wurden in 1,67-milli-m. Lösungen anaerob inkubiert; nach 5 Std. wurde mit der zehnfachen Menge Pufferlösung verdünnt und unmittelbar darauf die Absorption gemessen. Kurve A: Benzaldehyd; Kurve B: Benzaldehyd + Methylhydrazin

zin unter gleichen Bedingungen geprüft wurden, dann änderte sich, im Gegensatz zum Versuch mit aliphatischen Aldehyden, das Aldehyd-Spektrum nur langsam (Fig. 3). Die Verschiebungen sind im Prinzip die gleichen wie bei Fig. 2; nur sind sie weniger ausgeprägt, vor allem die Zunahme der Bande bei 280 $m\mu$ (Bande II).

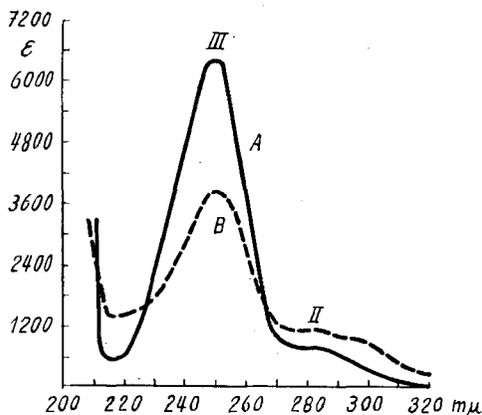


Fig. 3

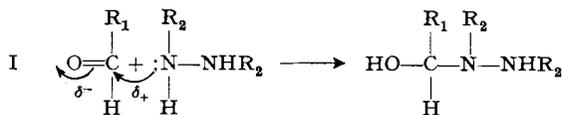
UV.-Absorptionsspektren von Benzaldehyd und 1,2-Dimethylhydrazin

Die Komponenten wurden in 1,67-milli-m. (Benzaldehyd) und 16,7-milli-m. (1,2-Dimethylhydrazin) Lösungen anaerob inkubiert, nach 5 Std. mit der zehnfachen Menge Pufferlösung verdünnt und unmittelbar darauf analysiert. Kurve A: Benzaldehyd; Kurve B: Benzaldehyd + 1,2-Dimethylhydrazin

Aktive Ketone, wie Oxalessigsäure und α -Ketoglutarsäure waren ausserstande, mit 1,2-Dimethylhydrazin messbar zu reagieren, während die optische Dichte mit Methylhydrazin als Zusatz rasch zunahm ($\Delta 260 = 1957$).

Diskussion

Aus den spektroskopischen Versuchen geht hervor, dass auch da, wo keine Hydrazonbildung möglich ist, eine Reaktion zwischen Hydrazinen und Carbonylen erfolgen kann. Als treibende Kraft dieses Vorgangs muss wohl eine Wechselwirkung zwischen nukleophilen und elektrophilen Gruppen angenommen werden. Ob *beide* Stickstoffatome gemäss dem Schema I reagieren, sei



dahingestellt. Auf Grund von ausgedehnten Infrarot- und Ultraviolettmessungen wurden ähnliche Formulierungen für transannulare Bindungen zwischen Ketogruppen und substituiertem Ringstickstoff gegeben^{22) 23)}. Als Beispiel ist ein ringförmiges Aminoacyloin in Schema II angeführt.

Die transannulare Bindung in Schema II wird in polaren Lösungsmitteln, beispielsweise in Wasser, begünstigt, wenn R eine Methyl- oder Äthylgruppe

²²⁾ N. J. LEONARD, M. ŌKI, J. BRADER und H. BOAZ, J. Amer. chem. Soc. **77**, 6237 (1955).

²³⁾ N. J. LEONARD und M. ŌKI, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 6239 (1955).

MO (b) und DO (b) angenommen (V). Auf Grund ausgedehnter Untersuchungen über die Spezifität der MO wurde die Hypothese entwickelt²⁷⁾, dass MO (b) eine Peptidgruppe darstellte, was nach der Ähnlichkeitsbeziehung V auch für DO (b) gelten müsste.



Es liegen somit bei der MO eine (oder mehrere) Peptidbindungen und bei der DO eine Aldehyd- und Peptid-Gruppe im aktiven Fermentzentrum vor, die beide elektrophiler Natur sind und mit Hydrazinen reagieren können. Dies ist umso wahrscheinlicher, als Inhibitorversuche mit einem 1,2-disubstituierten Hydrazin – Iproniazid – zeigten, dass diese Verbindung die MO kompetitiv hemmt und somit am Fermentzentrum angreift¹⁸⁾ 18). Für die Aldehydgruppe wird der in Formeln I und II angedeutete Mechanismus angenommen, während für die Peptidbindung noch kein ähnlich begründetes Reaktionsschema existiert²⁸⁾. Hingegen ist wohlbekannt, dass manche Hydrazinderivate mit Peptiden (Hydrazinolyse) und ähnlichen Amid²⁹⁾ in Reaktion treten. Die Wirkung der 1,2-Dialkylhydrazine auf zwei Gruppen des aktiven Zentrums der DO mag für die ungefähr zwanzigfach stärkere Hemmung der DO, verglichen mit der MO, verantwortlich sein.

SUMMARY

1. The pI_{50} -values of 1,2-dimethyl-, 1,2-diethyl- and 1,2-dipropyl-hydrazine are of the order 4,7 for monoamine oxidase (MO) and about 5,8 for diamine oxidase (DO). For both enzymes the pI_{50} -values of 1,2-diisopropylhydrazine are much smaller³⁰⁾.

2. Under conditions similar to those of the enzyme determinations, acetaldehyde reacts non-enzymically with the first three 1,2-dialkyl derivatives mentioned above, whilst 1,2-diisopropylhydrazine remains inert during the spectrophotometric analysis.

3. In similar systems, 1,2-dimethylhydrazine reacts slowly with benzaldehyde.

4. From these observations, and from data obtained in the literature concerning transannular bond formation, it is concluded that 1,2-dialkylhydrazines react on MO and DO by virtue of their nucleophilic nature. The electrophilic counterpart of the active surface of the enzyme seems to be an aldehyde group in DO and a non-aldehyde and non-ketone carbonyl residue in MO and DO.

Department of Biochemistry, Northwestern
University Medical School, Chicago, Illinois

²⁷⁾ Vorläufige Mitteilung, Federation Meeting, Philadelphia April 1958; siehe auch E. A. ZELLER, L. M. BARBATO, J. BARSKY, L. A. BLANKSMA & J. C. LAZANAS, Federation Proc. 17, 342 (1958).

²⁸⁾ Untersuchungen über die Wechselwirkung zwischen Peptiden und Alkylhydrazinen sind im Gange.

²⁹⁾ E. C. TAYLOR, JR., J. Amer. chem. Soc. 74, 1651 (1952).

³⁰⁾ Anmerkung bei der Korrektur: Für 1,2-Di-(2-butyl)-hydrazin wurden die folgenden pI_{50} -Werte gemessen: MO: 2,9/2,4; DO: 2,9/2,7.