

## UNTERSUCHUNGEN ZUM WIRKUNGSMECHANISMUS EINER AROMATISCHEN HYDRAZINOKARBONSÄURE, DER $\beta$ -PHENYL- $\alpha$ -HYDRAZINOPROPIONSÄURE

ELSE ACKERMANN, HELGA REX, PETER OEHME und GERHARD PETSCH

Aus dem Institut für Pharmakologie der Deutschen Akademie der Wissenschaften und dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Humboldt-Universität zu Berlin

(Received 27 January 1965; accepted 11 March 1965)

**Abstract**—The pharmacological action of the hydrazine analogue of phenylalanine is less than that of aliphatic amino acids and also shows decreased chronic toxicity while the acute toxicity is the same. As a carbonyl reagent NH-phenylalanine like other NH-amino acids reacts *in vitro* to form a hydrozane. Pyridoxal-5-phosphate dependent enzymes are inhibited at 10 times lower concentration by the hydrazine analogue and this inhibition can be prevented by adding the co-enzyme. *In vivo* enzymes in the brain are not inhibited while those of the liver are. The compound does not reduce blood pressure nor are any of its pharmacological actions dependent on optical activity.

**ALIPHATISCHE** Hydrazinokarbonsäuren und bestimmte Hydrazinopeptide sind starke Hemmer Pyridoxal-5-Phosphat abhängiger Fermentsysteme. Eine Störung Pyridoxal-5-Phosphat abhängiger Stoffwechselvorgänge ist wohl die wesentliche Ursache für die pharmakologische Aktivität dieser Verbindungen.<sup>1, 2, 3, 4</sup> Die nach Hydrazinoverbindungen auftretenden zentralnervösen Erscheinungen haben eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Vitamin B<sub>6</sub>-Mangelsyndrom.<sup>5</sup> Diese Neurotoxizität lässt sich durch hohe Pyridoxingaben teilweise verhindern.<sup>1</sup> *In vitro* bilden Säurehydrazide und die von uns untersuchten aliphatischen Hydrazinokarbonsäuren mit Pyridoxal-5-Phosphat ein Hydrazon.<sup>2, 6, 7, 8</sup>

Aromatische Hydrazinokarbonsäuren sind in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. Sie hemmen die aromatische L-Aminosäuredekarboxylase zehn- bis hundertmal stärker als  $\alpha$ -Methyldopa.<sup>9, 10</sup>  $\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -hydrazinopropionsäure, im weiteren als NH-Phenylalanin bezeichnet, das als Heterobestandteil von Peptiden synthetisiert wurde, gehört in diese Reihe. Es interessierte uns, ob durch die Einführung des Ringsystems Wirkungsspezifitäten gegenüber den aliphatischen Derivaten deutlicher werden. Weiterhin haben wir einen Vergleich einiger pharmakologischer Wirkungen der aromatischen Verbindung mit den früher von uns untersuchten Hydrazinoverbindungen durchgeführt.

Für unsere Untersuchungen standen uns das von der chemischen Arbeitsgruppe unseres Instituts\* synthetisierte DL-NH-Phenylalanin sowie das L- und D-Isomere zur Verfügung:

\* An dieser Stelle möchten wir Frau R. Grupe für die Synthese und die Überlassung der Substanz danken.

## METHODIK

1. Die Temperaturmessung an männlichen Albinoratten nach s.c. oder i.p. Substanzapplikation in einem Flüssigkeitsvolumen von 0,1 ml/10 g Tier erfolgte mit dem Ellabgerät der Elektrolaboratoriet Kopenhagen in der von uns früher angegebenen Versuchsanordnung.<sup>1</sup>
2. Die Motilitätsbestimmung wurde mit weißen Mäusen beiderlei Geschlechts im Zitterkäfig durchgeführt. Jede Versuchsgruppe bestand aus mindestens 28 Tieren. Diese erhielten 1 Stunde vor Applikation der Testsubstanz 2 mg/kg Methamphetamin, 30 Minuten später DL-NH-Phenylalanin i.p. Mit der Registrierung der Kontakte über einen Zeitraum von einer Stunde wurde 1½ Stunden nach der Methamphetamin-injektion begonnen. Die Kontrolltiere erhielten Methamphetamin und Phosphatpuffer pH 7,4.
3. Zur Bestimmung der Reaktionszeit diente die von *Herr* und *Porszase* angegebene Methode.<sup>1, 3</sup> Männliche weiße Mäuse erhielten die Testsubstanzen in der bereits angegebenen Flüssigkeitsmenge s.c.
4. Für die Registrierung des Blutdrucks im akuten Versuch wurden männliche Albinoratten verwendet. In Urethannarkose (1,25 mg/kg) wurde DL-NH-Phenylalanin in Dosen zwischen 5 bis 50 mg/kg, gelöst in Phosphatpuffer pH 7,4, in die V. femoralis injiziert. Das Injektionsvolumen betrug 0,1 bis 0,2 ml/Tier. Gemessen wurde der Blutdruck in der A. carotis über ein Quecksilbermanometer.

Für den chronischen Versuch dienten männliche Albinoratten als Versuchstiere. 3 bis 4 Tage vor Versuchsbeginn wurden die Tiere einseitig nephrektomiert und mit täglich 5 mg/kg DOCA s.c. vorbehandelt. Alle Tiere erhielten eine 2%ige Kochsalzlösung als Trinkwasser. Der Blutdruck wurde in Abständen von 2 bis 4 Tagen am Rattenschwanz mit einem nach *Byron* modifizierten Plethysmographen registriert.<sup>11</sup>

5. Für die spektrophotometrischen Untersuchungen wurde von NH-Phenylalanin und Pyridoxal-5-Phosphat in einer Konzentration von  $1,6 \cdot 10^{-4}$  M/L in 0,067 molarem Phosphatpuffer pH 7,8 bei 37° das UV-Spektrum aufgenommen. Die Aufzeichnung der Spektren der Gemische von Pyridoxal-5-Phosphat und NH-Phenylalanin erfolgte unter gleichen Bedingungen.

6. Die Bestimmung der Glutamat- und Dopa-Dekarboxylase wurde nach der Methode von *Roberts* und *Frankel*, modifiziert nach *Medina* bzw. nach *Holtz* und *Westermann* in der bereits früher angegebenen Versuchsanordnung durchgeführt.<sup>12, 13, 14</sup>

7. Die Aktivität der 5-Hydroxy tryptophan Dekarboxylase wurde in einem 30 %igen Rattenleberhomogenat bestimmt. Als Substrat diente L-5-Hydroxytryptophan. Die Gefäße enthielten 10 µMol Substrat, N-Benzyl-N-Methyl-propylamin (MO 911) in einer Endkonzentration von  $10^{-4}$  m-, DL- oder D-NH-Phenylalanin oder Pufferlösung, 1·0 ml des Homogenats und Phosphatpuffer 0·1 m pH 8, o. Das Endvolumen betrug 3·1 ml. Die Bestimmung des entstandenen Serotonin erfolgte mit der Nitrosonaphtholmethode<sup>15</sup> nach 2-stündiger Inkubation.

8. Für die Reaktivierungsversuche benutzten wir unter Belassung der beschriebenen Methodik ein- und zweiarmige Warburggefäß. Bei Verwendung von einarmigen Gefäßen wurden Homogenat und Koferment in das Hauptgefäß gegeben, bei Verwendung von zweiarmigen Gefäßen enthielt ein Seitengefäß Pyridoxal-5-Phosphat. Bei den Reaktivierungsversuchen mit der 5-Hydroxytryptophan Dekarboxylase wurde 5-Hydroxytryptophan erst nach der Vorinkubation mit dem Inhibitor hinzugefügt.—

Für die Reaktivierung der Dopadekarboxylase wurde Rattenleberüberstand verwendet und die Aktivität auf Proteingehalt bezogen (Proteinbestimmung nach *Folin*).

9. Die Fermentaktivität der L-Phenylalaninhydroxylase bestimmten wir nach der Methode von *Freedland* unter Verwendung von L-Phenylalanin als Substrat in einer Konzentration von  $10^{-3}$  m.<sup>16</sup> Die Inkubation dauerte 2 Stunden. Die entstandene Menge Tyrosin wurde pro Ansatz in  $\mu$ Mol angegeben und auf Protein bezogen.
10. Für die *in vivo-vitro*-Versuche wurde männlichen Ratten DL-NH-Phenylalaninaethylesterhydrochlorid i.p. injiziert. Nach 2 Stunden wurden die Tiere getötet, die Lebern bzw. Gehirne entfernt und in 10 %iger Saccharose bei 20,000 g für 45 Minuten bei  $+2^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Die Bestimmung der Dopa- und Glutaminsäuredekarboxylaseaktivität erfolgte 24 Stunden später mit der Warburg-Methode.

An Substanzen verwendeten wir:

1. L-5-Hydroxytryptophan
2. Serotonin-creatininsulfat Monohydrat
3. Pyridoxal-5-Phosphat
4. 3,4-Dihydroxyphenylalanin (Dopa) der Firma Fluka AG
5. L-Phenylalanin des VEB Berlin-Chemie
6. L-Glutaminsäure des VEB Promassolwerk Erfurt
7. Methamphetamine des VEB Berlin-Chemie
8. Desoxycorticosteronazetat des VEB Jenapherm

### Ergebnisse

Für die Bestimmung der LD<sub>50</sub> wurde aus Gründen der besseren Löslichkeit das DL-NH-Phenylalaninaethylesterhydrochlorid verwendet. Die LD<sub>50</sub> konnte an der weißen Maus beiderlei Geschlechts mit 0,84 mMol/kg ermittelt werden. Im Gegensatz zu den aliphatischen NH-Aminosäuren wurden toxinisch-klonische Krämpfe nicht regelmäßig beobachtet. Die für Hydrazinoverbindungen typische Lähmung der hinteren Extremitäten ließ sich auch nach NH-Phenylalanin feststellen.

TABELLE 1. LD<sub>50</sub> EINIGER HYDRAZINE UND HYDRAZIDE

Substanz	LD <sub>50</sub> mMol/kg
$\beta$ -Phenyl- $\alpha$ -hydrazinopropionsäure (NH-Phenylalanin)	0,84
Hydrazinoessigsäureaethylester	0,74
Hydrazinoisobuttersäureaethylester	0,6
Hydrazinoisovaleriansäureaethylester	0,66
Isonikotinsäurehydrazid	1,15
Semikarbazid	1,15

Wie aus dieser Tabelle ersichtlich ist, unterscheiden sich die Doses letales<sub>50</sub> der hier aufgeführten Hydrazinokarbonsäuren nur unwesentlich. Dagegen weisen die Hydrazide eine geringere Toxizität auf.

Nach chronischer Applikation von 1/10 der LD<sub>50</sub> über 4 Wochen waren bei den Ratten unter NH-Phenylalanin weder ein Gewichtsverlust noch Zeichen einer Intoxikation zu erkennen. Dagegen waren nach chronischer Applikation von nur 0,05 mMol/kg Hydrazinoessigester, einer aliphatischen NH-Aminosäure,<sup>1</sup> nach 9 Tagen

bereits 70 % der Versuchstiere gestorben und die überlebenden Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren in ihrem Wachstum gehemmt.

#### *Temperaturversuche an der Ratte*

Aus früheren Untersuchungen war uns bekannt, daß einige Hydrazinokarbonsäuren zu einer Temperatursenkung führen. Auf Abb. 1 sind die Temperaturkurven unter NH-Phenylalanin und Hydrazinoessigester aufgezeichnet. Eine Dosis von 0,16 mMol/kg NH-Phenylalanin i.p. senkt die Körpertemperatur im Vergleich zur Kontrolle nur unwesentlich und nicht signifikant, während eine äquimolare Menge Hydrazinoessigester von 0,13 mMol/kg einen deutlichen hypothermischen Effekt aufwies. Auch nach s.c. Substanzapplikation änderte sich dieses Verhältnis nicht.

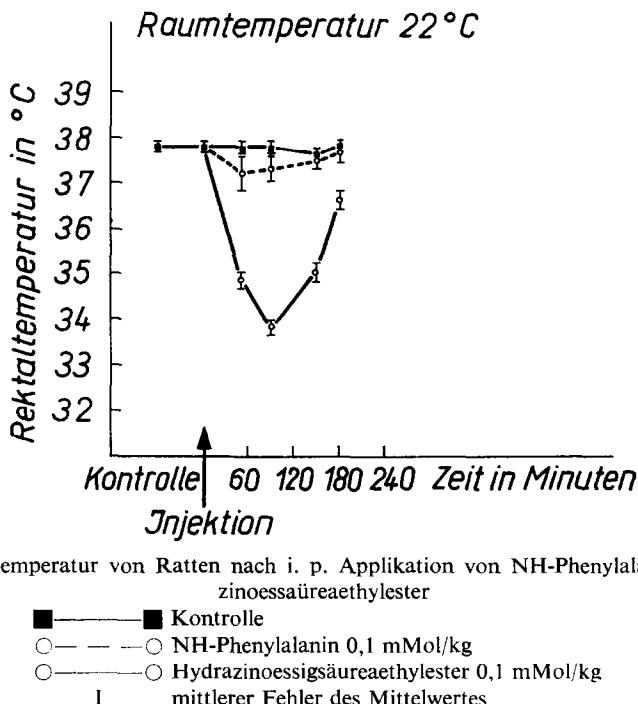


ABB. 1. Rektaltemperatur von Ratten nach i. p. Applikation von NH-Phenylalanin und Hydrazinoessäureaethylster

■ — ■ Kontrolle  
 ○ — ○ NH-Phenylalanin 0,1 mMol/kg  
 ○ — ○ Hydrazinoessigsäureaethylster 0,1 mMol/kg  
 I mittlerer Fehler des Mittelwertes

Versuche bei einer Umgebungstemperatur von 4°C mit einem Wechsel der Raumtemperatur auf 22°C zeigten dagegen bei einer Dosis von 0,084 und 0,167 mMol/kg eine Störung der Gegenregulation (Abb. 2). Die Tiere hatten 4 Stunden nach i.p. und s.c. Injektion, obwohl sie sich bereits 3 Stunden in Zimmertemperatur befanden, noch nicht die normale Körpertemperatur erreicht.

#### *Motilitätsbestimmung an Mäusen*

Zur Bestimmung der Motilität dienten mit Methamphatamin vorbehandelte Mäuse. Wie aus Abb. 3 zu ersehen ist, war die Verminderung der Motilität nur bis zu 0,55 mMol/kg (= 100 mg/kg) dosisabhängig. Eine ähnliche dosisabhängige Motilitätsabsetzung war unter Hydrazinoessigsäureaethylster, allerdings in einem Dosisbereich zwischen 0,1 und 0,2 mMol/kg zu beobachten. Größere NH-Phenylalanindosen—z. T. im Bereich der LD<sub>50</sub>—führten dagegen zu einem Motilitätsanstieg, der aber nicht den Kontrollwert erreichte.

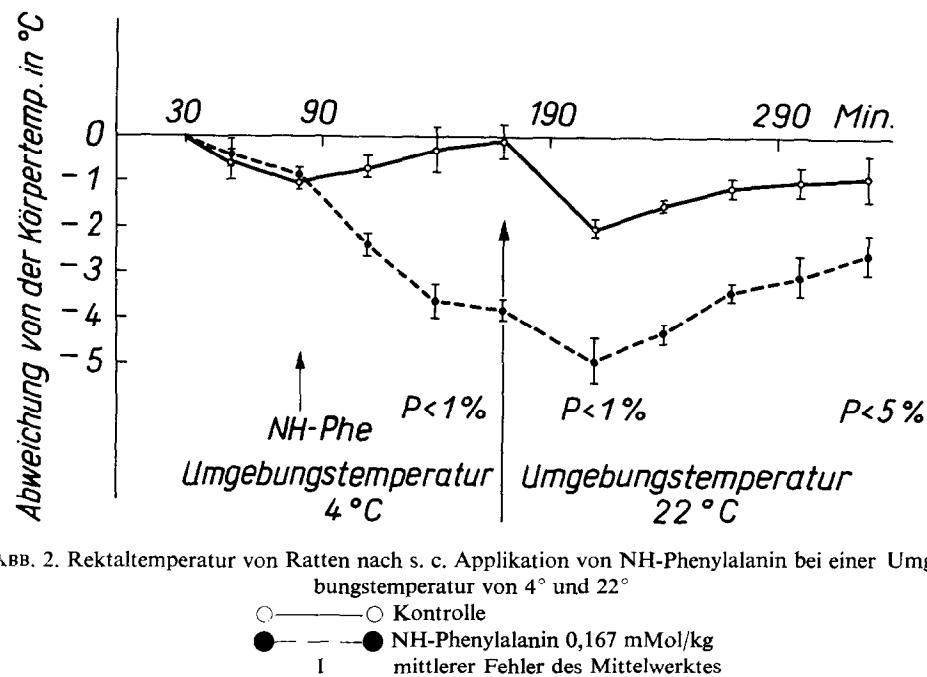


ABB. 2. Rektaltemperatur von Ratten nach s. c. Applikation von NH-Phenylalanin bei einer Umgebungstemperatur von 4° und 22°

○ —○ Kontrolle  
 ● —● NH-Phenylalanin 0,167 mMol/kg  
 I mittlerer Fehler des Mittelwertes

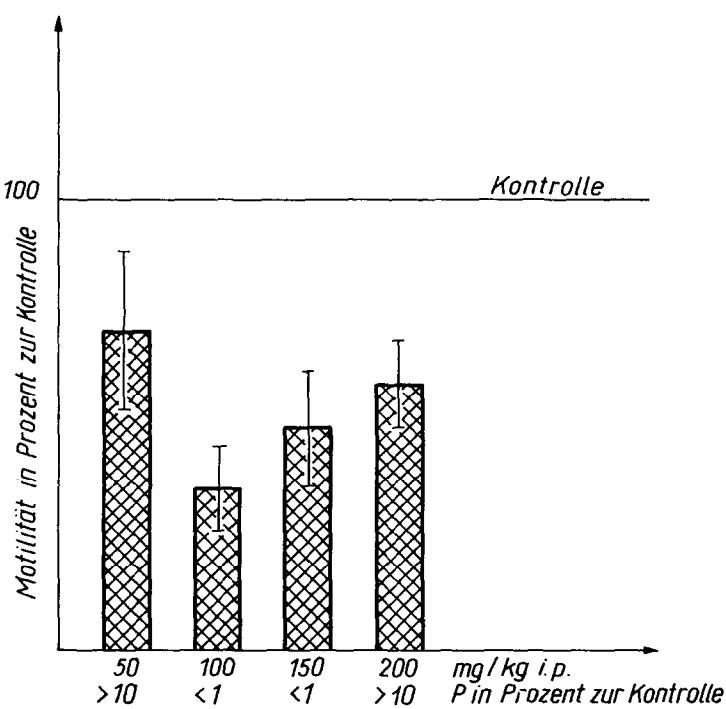


ABB. 3. Motilität von Mäusen nach Vorbehandlung mit NH-Phenylalanin in Dosen zwischen 0,27 und 1,1 mMol/kg i. p. (50 bis 200 mg/kg).

I mittlerer Fehler des Mittelwertes

### *Reaktionszeitbestimmung an Mäusen*

Auch die Reaktionszeit war unter NH-Phenylalanin dosisabhängig verlängert. Eine Dosis von 1,1 mMol/kg, die bereits die LD<sub>50</sub> um 12% überschritten hatte, verlängerte die Reaktionszeit gegenüber der Kontrolle um 320%. Alle Werte unterschieden sich von der Kontrolle signifikant (Abb. 4).

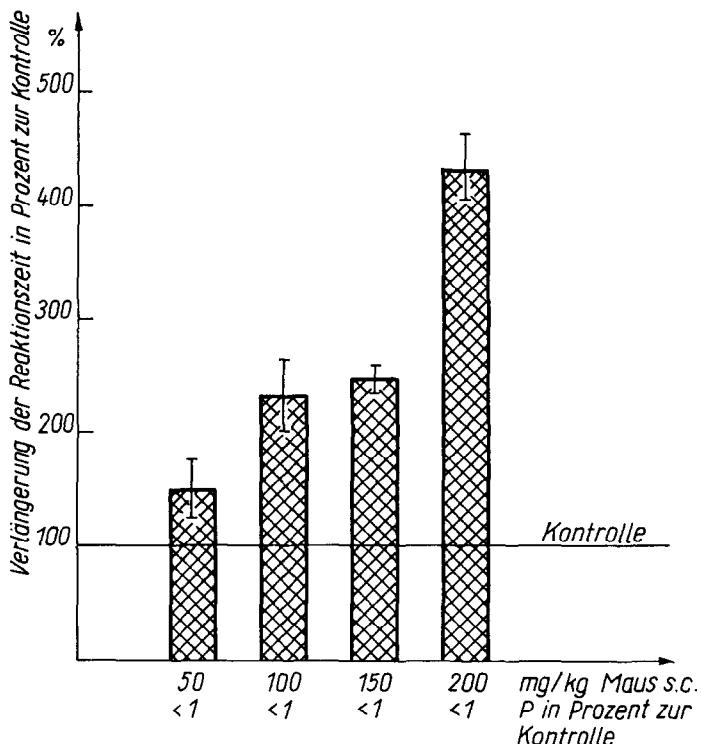


ABB. 4. Reaktionszeit von Mäusen nach Vorbehandlung mit NH-Phenylalanin in Dosen zwischen 0,27 und 1,1 mMol/kg s. c. (50 bis 200 mg/kg). I mittlerer Fehler des Mittelwertes

### *Verhalten des Blutdrucks*

Im akuten Versuch zeigte sich weder eine blutdrucksenkende Wirkung des NH-Phenylalanins noch eine Hemmung des durch 5 µg/kg Noradrenalin hervorgerufenen Blutdruckanstiegs.

Die Testung der Tiere des chronischen Versuchs begann am 23. Tag, nachdem der Blutdruck um 40 mmHg angestiegen war (Abb. 5). Im Gegensatz zu α-Methyldopa, das zu einem Blutdruckabfall auf das Niveau der nicht vorbehandelten Kontrollgruppe führte, blieb dieser unter täglicher oraler Gabe von 50 mg/kg (=0,27 mM) L-NH-Phenylalanin per os unbeeinflusst.

### *Spektrophotometrische Untersuchungen*

Auf Grund der chemischen Struktur und der Ergebnisse früherer Arbeiten mit aliphatischen Hydrazinokarbonsäuren war eine Reaktion des NH-Phenylalanins mit der Aldehydgruppe des Pyridoxal-5-Phosphats zu einem entsprechenden Hydrazen

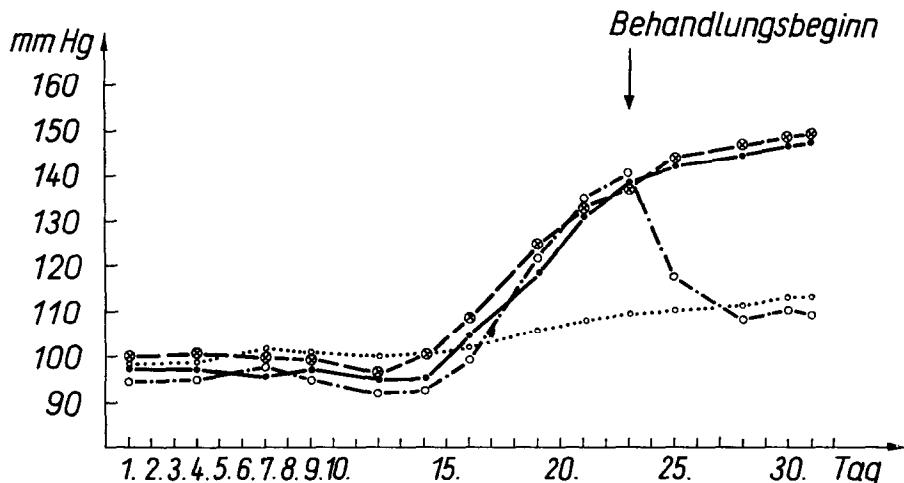


ABB. 5. Verhalten des Blutdrucks von chronisch hypertensiven Ratten unter NH-Phenylalanin

- · · ○ physiologische Kochsalzlösung s.c.
- ⊗ — — — ⊗ Desoxycorticosteronazetat
- — ● Desoxycorticosteronazetat + L-NH-Phenylalanin 50 mg/kg
- — — ○ Desoxycorticosteronazetat + L- $\alpha$ -Methyldopa 50 mg/kg s.c.

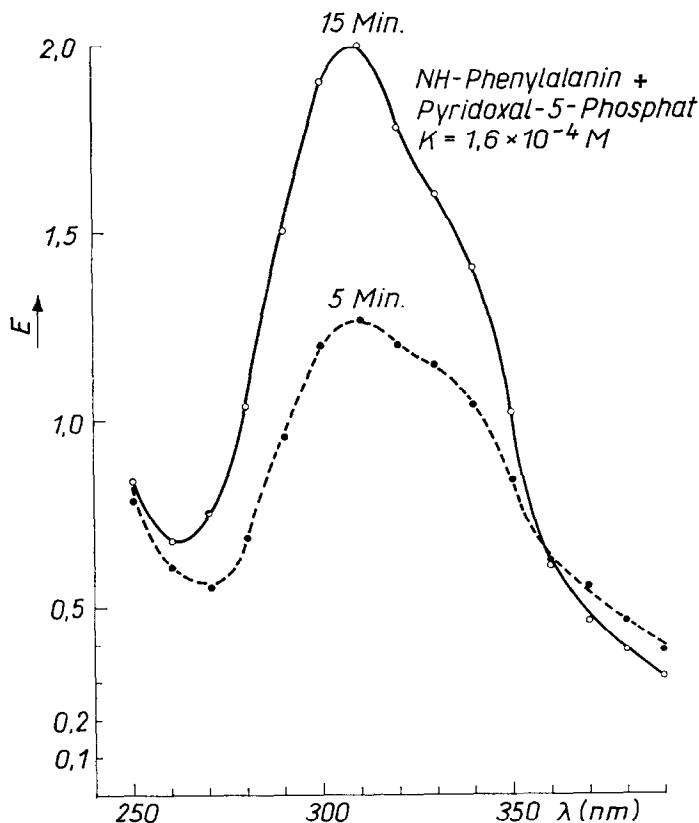


ABB. 6. UV-Spektrum des Gemisches von NH-Phenylalanin mit Pyridoxal-5-Phosphat. Aufgenommen in 1/15 m Phosphatpuffer 7,8 bei 37° nach 5 und 15 Minuten.

anzunehmen. Auf Abb. 7 III ist das ursprüngliche Pyridoxal-5-Phosphat-Spektrum aufgezeichnet, das durch Zusatz von NH-Phenylalanin eine charakteristische Veränderung mit einem Maximum bei 310 nm erfährt (Abb 6). Abb. 7 zeigt mehrere Spektren, die nach Mischen von Pyridoxal-5-Phosphat und einigen aliphatischen Hydrazinokarbonsäuren entstehen und auf die Bildung des entsprechenden Hydrazons zurückzuführen sind.<sup>2, 3</sup> Allen Spektren ist die typische Hydrazonbande im UV-Bereich gemeinsam.

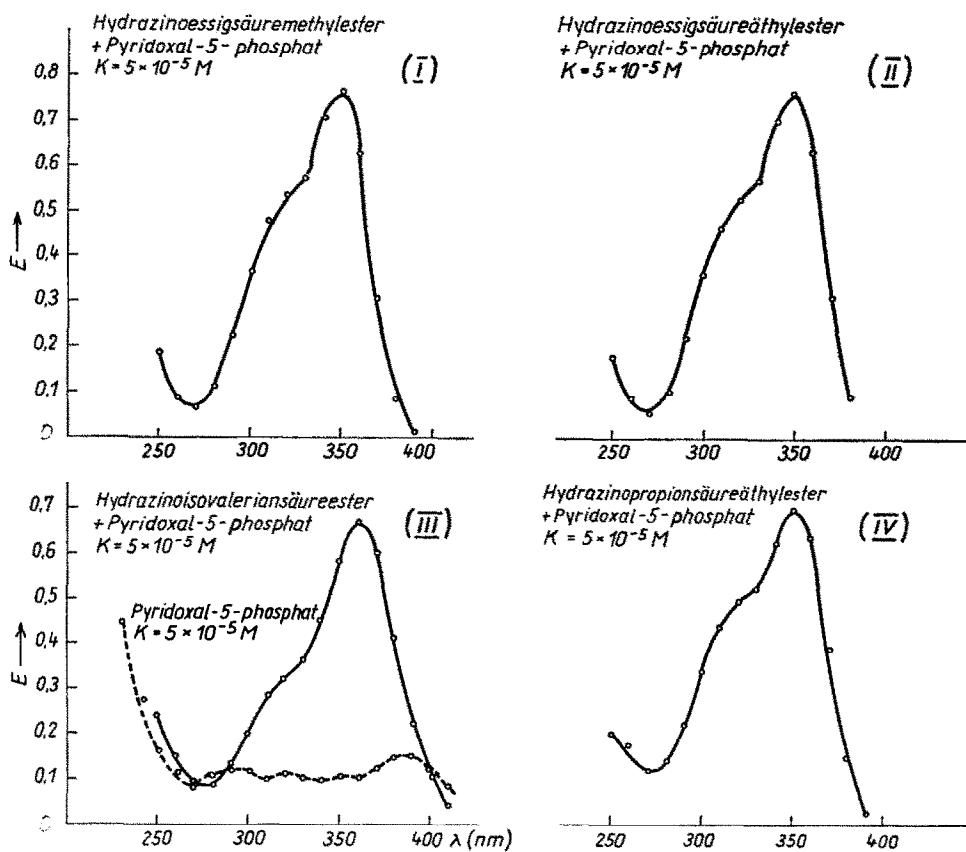


ABB. 7. UV-Spektren von Gemischen einiger Hydrazinokarbonsäuren mit Pyridoxal-5-Phosphat. Aufgenommen in Azetatpuffer pH 4,6 0,1 n bei Raumtemperatur nach 120 Minuten.

#### *Die Aktivität der Glutamat,-Dopa-5-unol Hydroxytryptophandekkarboxylase*

Die *in vitro* nachgewiesene Hydrazonbildung ließ eine Hemmung Pyridoxal-5-Phosphat abhängiger Fermentsysteme durch eine Kofermentinaktivierung vermuten. Es zeigte sich, daß die Glutamatdekarboxylase durch das D- und L-Isomere sowie das Razemat etwa gleichstark in einem Inhibitorenkonzentrationsbereich zwischen  $10^{-4}$  und  $10^{-6} M$  gehemmt wurde (Abb. 8).

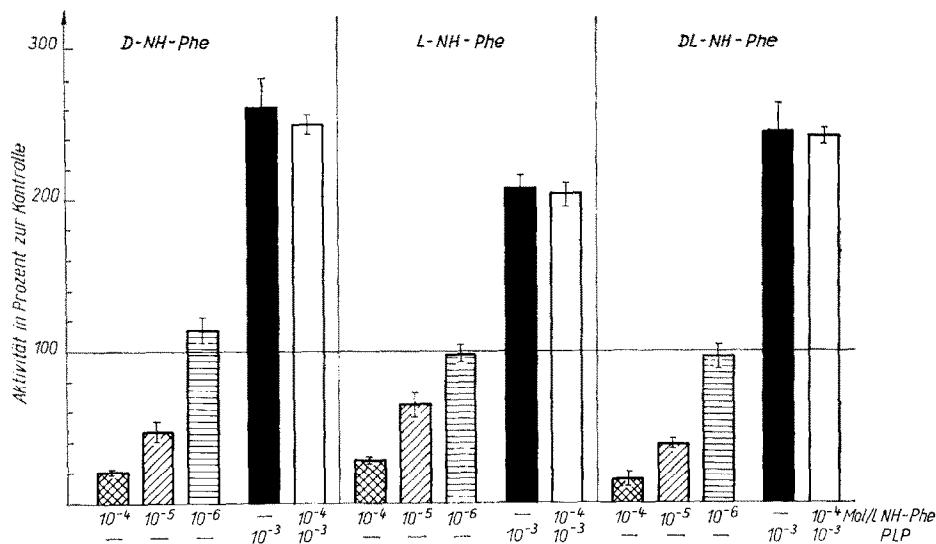


ABB. 8. Die Aktivität der Glutamatdekarboxylase unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und Pyridoxal-5-Phosphat (PLP).

I mittlerer Fehler des Mittelwertes

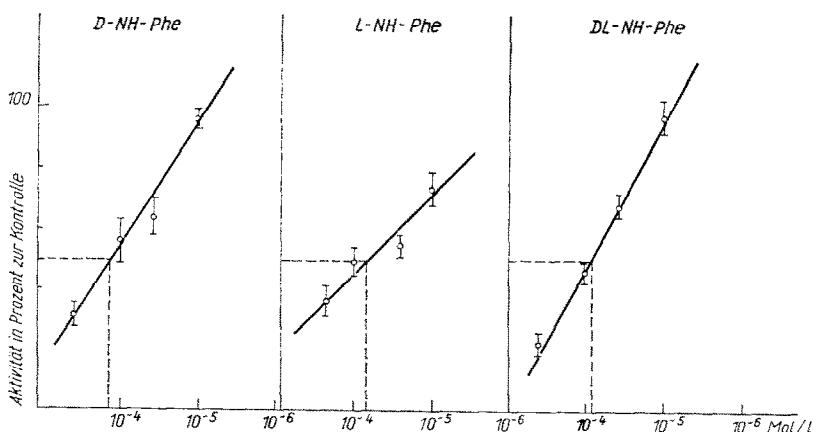


ABB. 9. Die Aktivität der Dopadekarboxylase unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen  
I mittlerer Fehler des Mittelwertes

Ähnlich verhielt sich die Dopadekarboxylase der Ratteniere. Aus Abb. 9 ist zu ersehen, daß die Inhibitorkonzentration, die eine 50 %ige Fermenthemmung herverruft, für das Razemat und die optisch aktiven Isomeren etwa bei  $10^{-4}$  m liegt bzw. sich voneinander nur geringfügig unterscheidet. Auch die 5-Hydroxytryptophan-dekarboxylase wird durch das D-Isomere etwa gleichstark wie durch das Razemat gehemmt (Abb. 10).

### *Reaktivierungsversuche mit Pyridoxal-5-Phosphat*

Bereits mit Hydrazinoessigsäureethyllester konnten wir die Beobachtung machen, daß sich die Fermenthemmung durch einen Überschuß an Pyridoxal-5-Phosphat aufheben läßt.<sup>3, 4</sup> Ein Überschuß von Koferment im Inkubationsansatz sollte deshalb die Frage klären, ob die durch NH-Phenylalanin induzierte Fermenthemmung verhindert oder abgeschwächt werden kann. Auf Abb. 8 ist die Aktivität der Glutamatdekarboxylase unter den optisch aktiven Isomeren und dem Razemat dargestellt. Durch Zusatz von Pyridoxal-5-Phosphat läßt sich die Aktivität der Kontrolle erwartungsgemäß um mehr als 100 % steigern. Die durch eine Inhibitorenkonzentration von  $10^{-4}$  m etwa 80 %ige Fermenthemmung wird durch Pyridoxal-5-Phosphat im 10fachen Überschuß für alle Verbindungen aufgehoben.

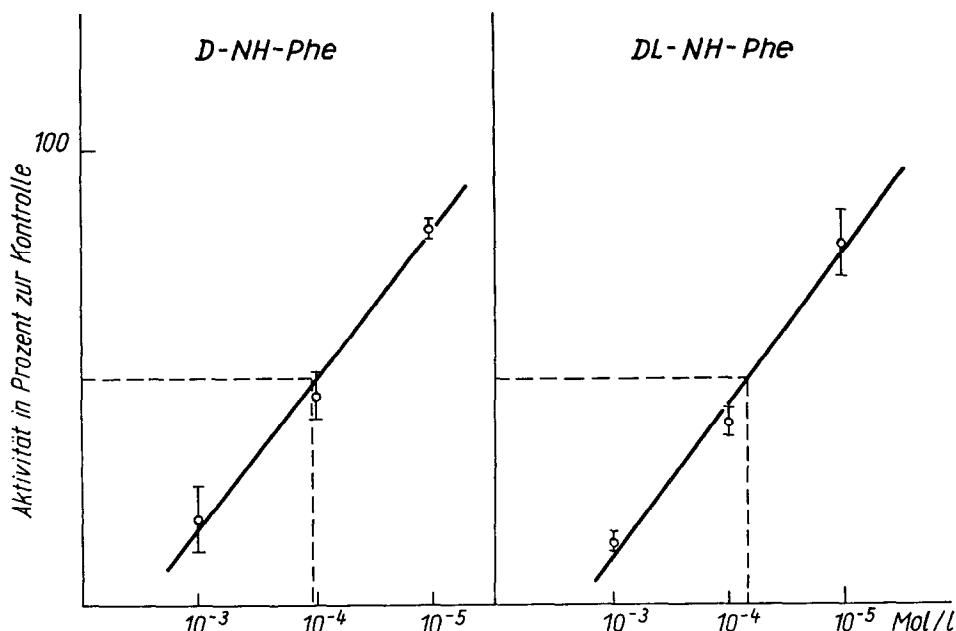


ABB. 10. Die Aktivität der 5-Hydroxytryptophandekarboxylase unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen.

Ein ähnliches Ergebnis war zu beobachten, wenn die durch D- und L-NH-Phenylalanin gehemmte Dopadekarboxylase nach einer Vorinkubation von 20 Minuten durch einen 10fachen Überschuß an Pyridoxal-5-Phosphat reaktiviert wurde.

Nach Zugabe des Koferments beginnt für die Kontrolle die Aktivierung und für das durch D- und L-NH-Phenylalanin gehemmte Ferment die Reaktivierung, wobei die  $\text{CO}_2$ -Entwicklung pro Zeiteinheit annähernd gleich bleibt (Abb. 11).

Auch die 5-Hydroxytryptophandekarboxylase wird durch NH-Phenylalanin bei Verwendung des Razemates zu etwa 70 % gehemmt, aber bereits durch eine äquimolare Menge Pyridoxal-5-Phosphat teilreaktiviert (Abb. 12).

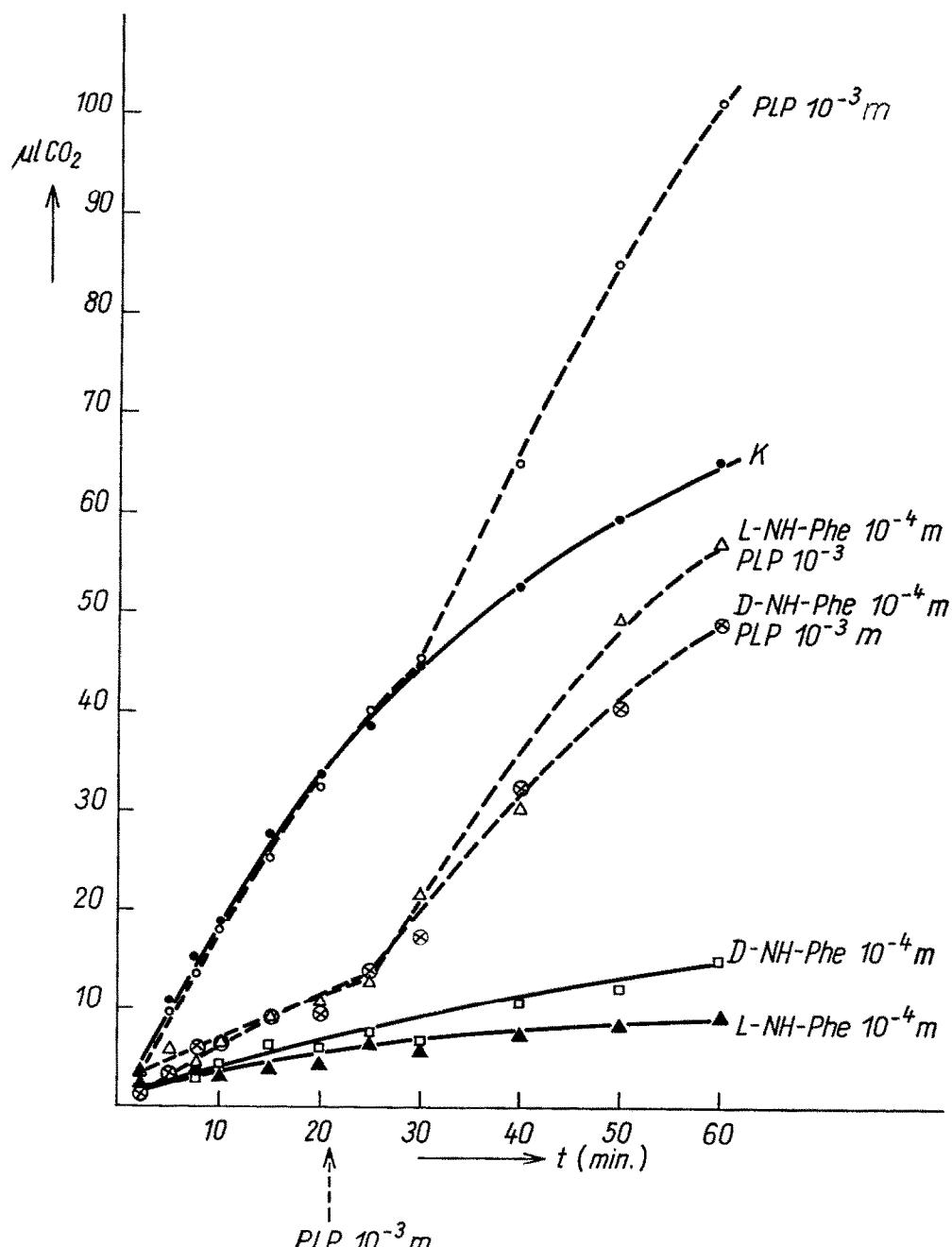


ABB. 11. Die Aktivität der Dopadekarboxylase unter verschiedenen Inhibitorkonzentrationen und unter Zusatz von Pyridoxal-5-Phosphat (PLP).

### *Die Aktivität der L-Phenylalaninhydroxylase*

Die strukturelle Beziehung des NH-Phenylalanins zum Phenylalanin veranlaßte uns, die Aktivität der L-Phenylalaninhydroxylase, die L-Phenylalanin zu L-Tyrosin hydroxyliert, unter NH-Phenylalanin zu untersuchen. Eine Hemmung dieses recht spezifischen Fermentes konnte jedoch ausgeschlossen werden. Wenn man aber NH-Phenylalanin als Substrat an Stelle von Phenylalanin einsetzte, konnte nach der Inkubation eine Verbindung nachgewiesen werden, die mit Nitrosonaphthol wie

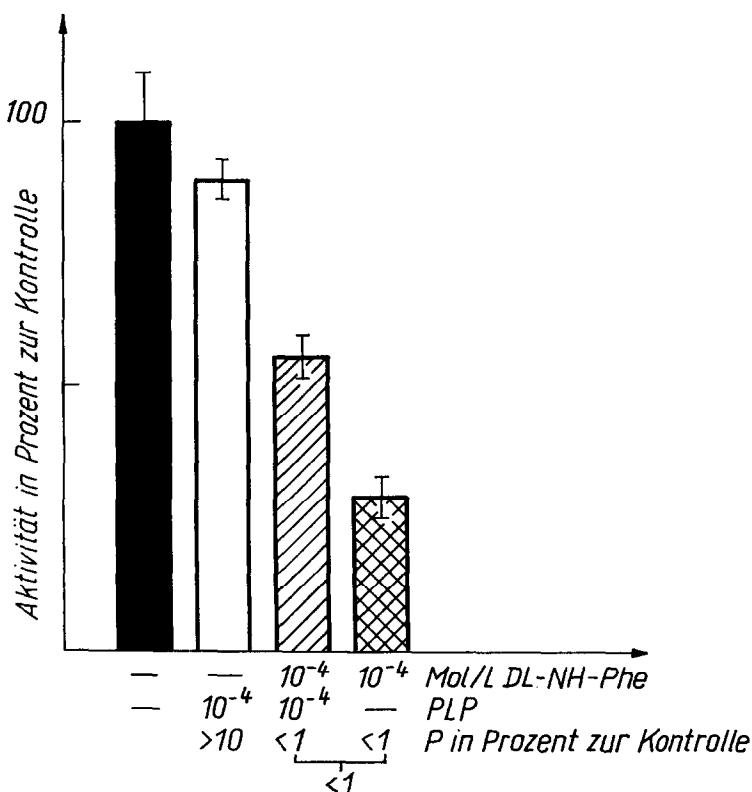


ABB. 12. Die Aktivität der 5-Hydroxytryptophandekarboxylase unter DL-NH-Phenylalanin und Zusatz von Pyridoxal-5-Phosphat (PLP).

I mittlerer Fehler des Mittelwertes

Tyrosin reagierte. Die Abb. 13 zeigt, daß unter gleichen Inkubationsbedingungen wie für die Kontrolle L-NH-Phenylalanin als Substrat ein Tyrosinanalogen entsteht, das etwa 25 % der maximal entstehenden Tyrosinmenge ausmacht. Der Unterschied zwischen D- und L-NH-Phenylalanin als Substrat ist signifikant. Auch der Leeransatz ohne Substrat unterscheidet sich von den Ansätzen mit NH-Phenylalanin signifikant.

### *Die Aktivität der Dopadekarboxylase nach Vorbehandlung mit NH-Phenylalanin*

Diese Untersuchungen sollten klären, ob sich am Ganztier ähnliche Hemmwirkungen wie am isolierten Fermentsystem feststellen lassen. Nach i.p. Injektion und

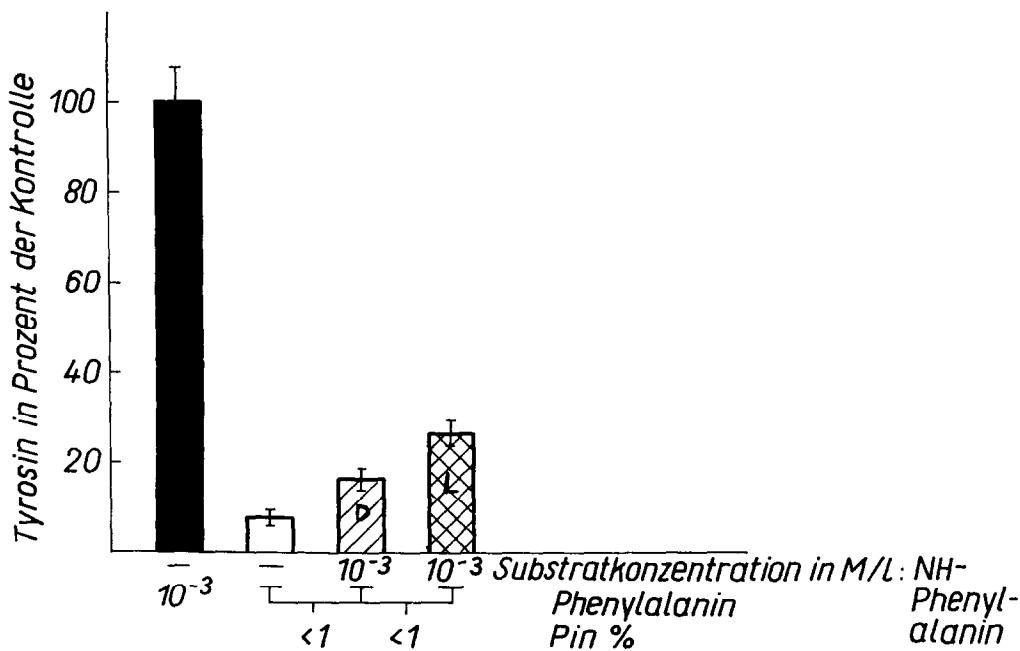


ABB. 13. Tyrosinbildung durch die Phenylalaninhydroxylase mit L-Phenylalanin und D- und L-NH-Phenylalanin als Substrat

I mittlerer Fehler des Mittelwertes

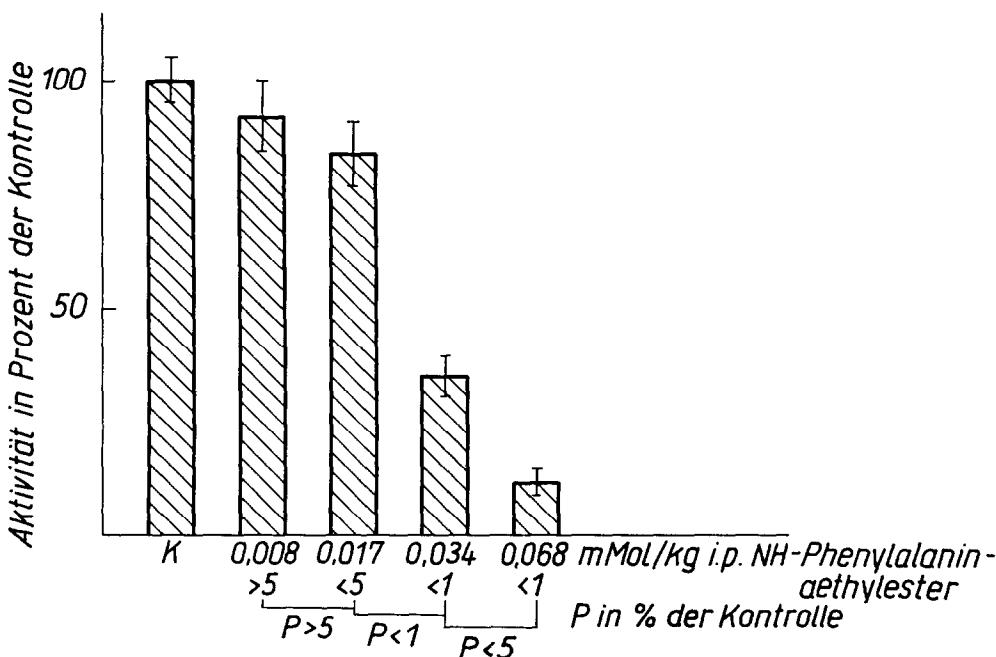


ABB. 14. Die Aktivität der Dopadekarboxylase der Rattenleber nach Vorbehandlung mit verschiedenen Dosen DL-NH-Phenylalanin-näthyl esterhydrochlorid

I mittlerer Fehler des Mittelwertes

2-stündiger Vorbehandlung wurde ein Aktivitätsverlust der Dopadekarboxylase der Rattenleber bis zu einer Dosis von 0,017 mMol/kg gefunden. Eine Dosis von 0,068 mMol/kg rief noch eine 90 %ige Hemmung hervor (Abb. 14). Unter den gleichen Versuchsbedingungen war die Aktivität der Glutamatdekarboxylase bis zu einer Dosis von 0,55 mMol/kg i.p. für die Esterverbindung und die freie Säure nicht herabgesetzt.

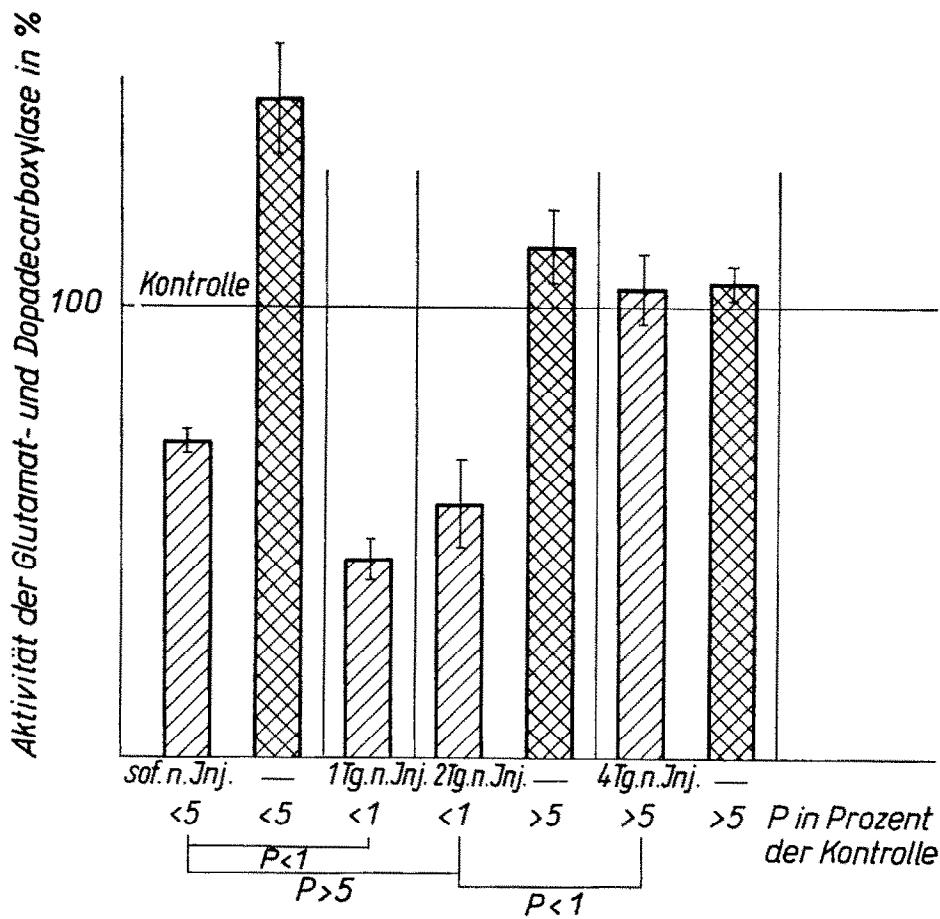


ABB. 15. Die Aktivität der Glutamat- und Dopadekarboxylase nach Vorbehandlung mit 0,08 mMol/kg NH-Phenylalanin s.c.

////// Dopadekarboxylase  
XXXXX Glutamatdekarboxylase  
1 mittlerer Fehler des Mittelwertes

Bei der Auswertung eines chronischen Versuchs, in dem die Ratten 4 Wochen 0,08 mMol/kg DL-NH-Phenylalanin s.c. injiziert bekamen, war das Verhältnis der Hemmung beider Fermente zueinander annähernd gleich. Wie aus Abb. 15 hervorgeht, war die Aktivitätsverminderung der Dopadekarboxylase der Leber in den ersten 2 Tagen nach Beendigung des chronischen Versuchs im Vergleich zur Kontrolle signifikant, am 4. Tag nicht mehr nachzuweisen. Die Glutamatdekarboxylase zeigte dagegen zu keinem Zeitpunkt eine Hemmung.

## DISKUSSION

Das NH-Analoge des Phenylalanins war für uns von besonderem Interesse, weil wir die Wirkung dieser aromatischen Hydrazinokarbonsäure mit der aliphatischer Hydrazinokarbonsäuren, die uns als starke Karbonylreagentien bekannt waren, vergleichen wollten. Aliphatische Hydrazinokarbonsäuren bilden mit Pyridoxal-5-Phosphat ein definiertes Hydrazon. Aus dem Ergebnis der spektrophotometrischen Untersuchungen ist zu entnehmen, daß auch NH-Phenylalanin mit Pyridoxal-5-Phosphat zu einem Hydrazon reagiert. Pyridoxal-5-Phosphat ist das Koferment vieler Fermente, u.a. auch der Dopa- und Glutamatdekarboxylase. In Gegenwart einer Hydrazinoverbindung besteht die Möglichkeit einer Konkurrenz um die Aldehydgruppe des Pyridoxal-5-Phosphats zwischen der Aminogruppe des Substrats, der Aminogruppe des Lysins des Apoenzyms und der Hydrazinogruppe des Hemmers. Bisher unveröffentlichte Untersuchungen haben ergeben, daß selbst ein 100facher Überschuß von Glutaminsäure die Umwandlung einer Schiff'schen Base in ein Hydrazon in Gegenwart einer Hydrazinokarbonsäure nicht verhindern kann. Somit scheint auch NH-Phenylalanin die Dopa- und Glutamatdekarboxylase durch eine vorwiegende Inaktivierung des Koferments zu hemmen. NH-Phenylalanin wurde bereits von *Roberts*<sup>18</sup> untersucht und als starker Hemmer der Glutamatdekarboxylase befunden. In unseren Versuchen war die Hemmung Pyridoxal-5-Phosphat abhängiger Fermentsysteme etwa 10mal stärker als die von uns für aliphatische Hydrazinokarbonsäuren beschriebene bei Verwendung äquimolarer Dosen.

Diesen biochemischen Befunden entsprach dagegen nicht die geringere Toxizität des NH-Phenylalanins im chronischen Versuch im Vergleich zu Hydrazinoessigsäureaethylester, während die akute Toxizität keine wesentlichen Unterschiede zeigte. Andererseits erwies sich das NH-Phenylalanin im akuten Temperaturversuch als nahezu unwirksam, während die bereits erwähnte aliphatische Verbindung in einer annähernd gleichen molaren Dosis zu starken Temperatursenkungen führte. Möglicherweise durchdringt NH-Phenylalanin nicht die Blut-Liquor-Schranke. Im Widerspruch dazu steht die gestörte Gegenregulation, die vielleicht rein peripher durch eine Vasodilatation mit vermehrter Wärmeabstrahlung zustande kommt.

Das Ergebnis der Motilitätsversuche und die Bestimmung der Reaktionszeit lassen eine sedative Wirkung dieser Verbindung erkennen, die aber z. T. erst im toxischen Dosisbereich auftritt.

Dekarboxylasehemmer, die spezifisch auf die aromatische Aminosäuredekarboxylase wirken, werden als blutdrucksenkende Mittel auch therapeutisch genutzt.<sup>19-21</sup> Von der Vorstellung ausgehend, daß die Dekarboxylasehemmung die Ursache der Blutdrucksenkung wäre, wurden Hydrazinoanaloge von Hydroxybenzol- und Di-hydroxyphenylverbindungen synthetisiert. Keiner dieser starken Fermenthemmer hatte hypotensive Eigenschaften.<sup>22</sup> In Übereinstimmung mit diesen Befunden fehlt auch dem NH-Phenylalanin eine blutdrucksenkende Wirkung. Dagegen entsprach die Hemmung der Leberdopadekarboxylase *in vivo* der anderer aromatischer Hydrazinoverbindungen.<sup>9</sup> Die fehlende Hemmung der Glutaminsäuredekarboxylase *in vivo* könnte mit der Wirkungslosigkeit des NH-Phenylalanins auf das Temperaturzentrum in Zusammenhang gebracht werden und als Folge einer fehlenden Liquorgängigkeit gedeutet werden. Ähnliche Ergebnisse wurden von anderen Autoren mit dem Hydrazinoanalogen des  $\alpha$ -Methyldopa erzielt.<sup>23</sup> Im Gegensatz zu einigen aliphatischen

Hydrazinokarbonsäuren wirkt demnach NH-Phenylalanin vorwiegend peripher und besitzt gegenüber den aliphatischen Derivaten kiene Wirkungsspezifitäten.

### ZUSAMMENFASSUNG

Das Hydrazinoanaloge des Phenylalanins wird in seiner pharmakologischen Wirkung mit aliphatischen Aminosäuren verglichen. Von diesen unterscheidet es sich durch eine geringere pharmakologische Aktivität und chronische Toxizität, während die akute Toxizität annähernd gleich ist. Als Karbonylreagens reagiert NH-Phenylalanin wie andere NH-Aminosäuren mit Pyridoxal-5-Phosphat *in vitro* zu einem Hydrazon. Pyridoxal-5-Phosphat-abhängige Fermente wie die Dopa- und Glutamatdekarboxylase werden *in vitro* etwa 10mal stärker gehemmt als durchäquimolare Mengen aliphatischer NH-Aminosäuren. Die Hemmung kann durch Koferment im Überschuß aufgehoben werden. *In vivo-vitro* wird die Glutamatdekarboxylase des Rattenhirns auch in hohen Dosen nicht gehemmt, die Dopadekarboxylase der Leber dagegen sehr stark. NH-Phenylalanin scheint außerdem als Substrat der Phenylalaninhydroxylase zu dienen.

Eine blutdrucksenkende Wirkung besitzt diese Verbindung nicht. Ebenso fehlen den optisch aktiven Isomeren des NH-Phenylalanins biochemische Wirkungsspezifitäten.

### LITERATUR

1. E. ACKERMAN, P. OEHME, H. REX u. P. LANGE *Acta biol. med. german.* **12**, 322 (1964).
2. P. OEHME, H. REX u. E. ACKERMANN, *Acta biol. med. german.* **12**, 234 (1964).
3. E. ACKERMANN, P. OEHME u. P. LANGE, *Acta biol. med. german. Suppl.* **2**, 52 (1963).
4. H. REX, E. ACKERMANN u. P. OEHME, *Vortrag auf dem Internationalen Symposium über Tranquilizer in Wrocław*, V. R. POLEN, vom 7. bis 9. 11 (1963).
5. G. M. MC KHANN, O. MICKELSEN and B. TOWER, *Am. J. Physiol.* **200**, 34 (1961).
6. A. N. DAVISON, *Biochim. biophys. Acta* (Amsterdam) **19**, 131 (1956).
7. G. A. LEESON, B. DUBNICK and C. C. SCOTT, *Fedn. Proc. Am. Soc. exp. Biol.* **18**, 1634 (1959).
8. P. T. SAH, *J. Am. chem. Soc.* **76**, 300 (1964).
9. ESKIL HANSSON and G. WILLIAM CLARK, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **111**, 793 (1962).
10. E. KUNTZ, *Arch. int. Pharmacodynam. Thérap.* **147**, 1 (1964).
11. F. B. BYRON, and WILSON, *J. Physiol.* **93**, 301 (1938).
12. E. ROBERTS and S. FRANKEL, *J. biol. Chem.* **188**, 789 (1951).
13. M. A. MEDINA, H. D. BRAYMER and J. C. REEVES, *J. Neurochem.* **9**, 307 (1962).
14. P. HOLTZ u. E. WESTERMANN, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmakol.* **227**, 538 (1956).
15. S. UDENFRIED, H. WEISSBACH u. C. T. CLARK, *J. biol. Chem.* **215**, 337 (1955).
16. R. A. FREEDLAND, I. M. WADZINSKI and HARRY A. WAISMAN, *Biochem. biophys. Res. Commun.* **5**, 94 (1961).
17. S. UDENFRIED and JACK R. COOPER, *J. biol. Chem.* **196**, 227 (1952).
18. E. ROBERTS, *Biochem. Pharmac.* **12**, 113 (1963).
19. C. T. DOLLERY and M. T. HARRINGTON, *Lancet* **1**, 795 (1962).
20. L. GILLEPSIE, J. A. OATES, R. CROUT and A. SJOERDSMA, *Circulation* **25**, 281 (1962).
21. J. A. OATES, L. GILLEPSIE, S. UDENFRIED and A. SJOERDSMA, *Science* **131**, 1890 (1960).
22. M. SLETZINGER, J. M. CHEMERDA and E. W. BOLLINGER, *J. med. Chem.* **6**, 101 (1963).
23. C. C. PORTER, L. S. WATSON, D. C. TITUS, J. A. TOTARO and S. S. BYER *Biochem. Pharmac.* **11**, 1067 (1962).