

Untersuchungen zur Hemmung der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase durch Dithranol

Herrn Dr. Ing. Lutz Wiegrebe sehr herzlich zum 80. Geburtstag gewidmet

1916 führte Unna (1) das *Syntheticum Cignolin*[®] (Dithranol, Anthralin) anstelle des Chrysarobins aus *Andira Araroba* (Fabaceae) als Antipsoriatikum ein. Dieses Medikament schien durch die PUVA-Therapie (Psoralene + UV-A) obsolet geworden zu sein, doch deutet sich in jüngster Zeit eine Renaissance an, da gegen die PUVA-Behandlung wegen des Auftretens von Plattenepitheliomen und Basaliomen bei einigen Patienten Vorbehalte angemeldet werden (2). Die Wirkungsweise des Dithranols ist umstritten, u. a. wird eine unspezifische Enzymhemmung als Wirkprinzip angenommen (3). Raab (4) und Rassner (5) untersuchten insbesondere die Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH), die als Schlüsselenzym des Pentosephosphatcyclus große Bedeutung hat. Unsere Untersuchungen der G-6-PDH-Hemmung durch Dithranol (Reinenzym) sollten Aufschlüsse über den Hemmungsmechanismus liefern.

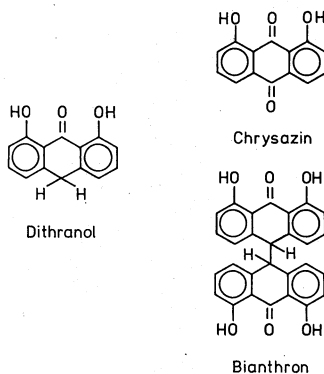


Abb. 1: Dithranol und seine Oxidationsprodukte.

Stabilität von Dithranol

Raab (4) benutzte für seine Untersuchungen Dithranol-Lösungen in Dimethylformamid (DMF) (Endkonzentration an DMF im Versuchsansatz $\leq 1\%$). Wir stellten fest, daß sich Dithranol-DMF-Lösungen nach 1–2 h dunkelbraun färben. Bei der dc-Untersuchung dieser Dithranollösungen zersetzten sie sich auf dem Kieselgel sofort, und es waren nur noch die Oxidationsprodukte Chrysazin und Bianthron nachzuweisen. Daraus kann folglich nicht geschlossen werden, daß diese Lösungen kein Dithranol mehr enthielten. Dimethylsulfoxid zeigte den gleichen Effekt. Da bei Enzymhemmungen längere Inkubationen bei 25° oder 37°C vor dem eigentlichen Test notwendig sind, haben wir nach geeigneteren Lösungsmitteln gesucht: Dithranol, das in

Wasser praktisch unlöslich ist, wurde jeweils im organischen Lösungsmittel gelöst und mit Puffer so verdünnt, daß die Konzentration an Lösungsmittel im Enzymsatz 1–3% betrug: Aceton, Chloroform und Tetrahydrofuran sind ungeeignet, weil das Enzym in den Kontrollen schon zu mehr als 50% gehemmt wird. Die Methode nach Rassner (5) zeigte die besten Ergebnisse: Hier wird Dithranol in Ethanol gelöst und mit Puffer verdünnt, die Ethanolkonzentration im Ansatz ist $\leq 1\%$.

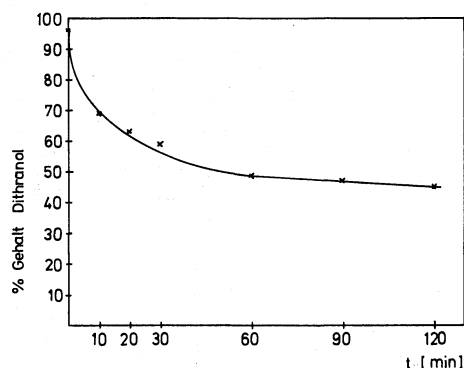


Abb. 2: Zerfall des Dithranols bei pH 7,5 und 37°C.

Inwieweit ist Dithranol unter den Bedingungen der enzymatischen Analyse stabil? Bekanntlich ist es in alkalischer Lösung besonders oxidationsempfindlich; im Enzyminkubationsansatz ist Dithranol einem schwach basischen Puffer 1–2 h bei 37°C ausgesetzt. Wir haben daher das Verhalten von Dithranol in Triethanolamin (TRA)-Puffer (pH 7,5) bei 37°C zeitabhängig untersucht. Dithranol wurde densitometrisch (6) bestimmt (Abb. 2): die Dithranolkonzentration ist bereits nach 10 min. um ca. $\frac{1}{3}$ gesunken. Graphische Darstellungen zeigten, daß sich Dithranol nicht nach 1. oder 2. Ordnung zersetzt. – Nach 18 h Inkubation bei pH 7,5 und 0°C fanden wir 95% der eingesetzten Konzentration. Aus Stabilitätsgründen inkubierten wir das Reinenzym daher bei 0°C, da hier nur Dithranol in bekannter Konzentration und nicht seine schwächer wirkenden Oxidationsprodukte hemmen. Nachteilig ist, daß die Ergebnisse nicht auf in-vivo-Verhältnisse übertragbar sind.

Einfluß von Dithranol und Chrysazin auf die G-6-PDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Konzentration

Nach 18 h Inkubationszeit werden Dithranol bzw. Chrysazin in Endkonzentrationen von $2 \cdot 10^{-6}$ bis $2 \cdot 10^{-4}$ M untersucht. Aus konzentrierteren Lösungen in Ethanol/Puffer flockt Dithranol aus. Um unspezifische Enzyminaktivierungen berücksichtigen zu können, werden Kontrollansätze

(Reinenzym-Ethanol-Puffer) mitgeführt. Die Hemmung wird in % der Kontrolle angegeben (Tab. 1, 2*).

Tab. 1: Hemmung der G-6-PDH durch Dithranol.

Konzentration [Mol/l]	Aktivität [U/l]	Hemmung %
$1 \cdot 10^{-5}$	163,8	$8,7 \pm 5,7$
$2 \cdot 10^{-5}$	108,2	$39,7 \pm 3,3$
$1 \cdot 10^{-4}$	30,3	$83,1 \pm 4,0$
$2 \cdot 10^{-4}$	0	100
Kontrolle	179,4	0

Tab. 2: Hemmung der G-6-PDH durch Chrysazin.

Konzentration [Mol/l]	Aktivität [U/l]	Hemmung %
$2 \cdot 10^{-6}$	256,7	$19,6 \pm 4,6$
$1 \cdot 10^{-5}$	243,8	$23,6 \pm 4,9$
$2 \cdot 10^{-5}$	238,7	$25,2 \pm 3,1$
$1 \cdot 10^{-4}$	233,0	$27,0 \pm 3,6$
Kontrolle	319,3	0

Im Bereich 10^{-5} – 10^{-4} M steigt die Hemmung durch Dithranol steil von 8% auf über 80% an. Chrysazin, das nicht antipsoriatisch wirkt, hemmt nur schwach (20–27%). Die G-6-PDH-Hemmung ist nicht mit der antipsoriatischen Wirksamkeit korreliert: Auch antipsoriatisch unwirksame Substanzen (7, 8, 9) inaktivieren G-6-PDH. Glucocorticoide (10) sind ebenfalls G-6-PDH-Hemmer, doch kann ihre antipsoriatische Wirksamkeit außerdem auf dem Eingriff in RNS-Synthese und Transkription und damit in die Protein-Biosynthese beruhen.

Einfluß von Dithranol auf die G-6-PDH-Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit

Inkubation bei 0°C

Nach den in Tab. 3 angegebenen Zeiten wird die Aktivität des dithranolhaltigen Ansatzes (Konzentration $3 \cdot 10^{-5}$ M) bestimmt. Innerhalb der ersten 6 h sinkt die G-6-PDH-Aktivität um fast 30%. Der weitere Verlauf der Kurve ist hauptsächlich auf eine dithranolunabhängige Inaktivierung zurückzuführen. Da aber die Kurven nicht parallel laufen, muß ein weiterer uns unbekannter Effekt hinzukommen.

Tab. 3: Hemmung der G-6-PDH durch Inkubation bei 0°C.

Zeit [h]	Enzymaktivität [U/l]		Hemmung %
	Kontrolle	Dithranol	
0	246	225	8,5
6	249	177	28,9
18	245	173	29,4
31	233	166	28,8
115	217	106	51,1
210	189	70	63,0
307	170	25	85,3

*) Aus Gründen der Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen von Raab (4) behalten wir diese Darstellung bei; üblich ist $\frac{v_i}{v_c} \cdot 100\% = \text{Restaktivität}$.

Inkubation bei 37°C

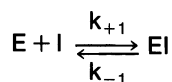
Tab. 4 zeigt die zeitabhängige Hemmung durch Dithranol bei 37°C Inkubationstemp. Hier sinkt die G-6-PDH-Aktivität in den ersten 30 min. um ca. 60%. Nachteilig ist die starke Spontaninaktivierung der Kontrolle. Nach 2 h ist dort die Aktivität auf ca. 50% gesunken. Zum anderen (s. o.) ist die Hemmwirkung nicht allein dem Dithranol zuzuschreiben, da es sich während der Inkubation zersetzt. Diese Nachteile werden durch Inkubieren bei 0°C ausgeschlossen. Dort werden auch, zumindest in den ersten 30 h, die Kontrollansätze nicht inaktiviert.

Tab. 4: Hemmung der G-6-PDH durch Inkubation bei 37°C.

Zeit [min]	Enzymaktivität [U/l] Hemmung %			Enzymaktivität [U/l] Hemmung %		
	Kontrolle	$3,3 \cdot 10^{-5}$		Kontrolle	$3,3 \cdot 10^{-6}$	
0	500	440	12	250	222	11
30	435	112	74	205	132	36
60	345	53	85	160	95	41
90	315	30	91			
120	265	20	92			
150	240	15	94			

Kinetische Untersuchungen zur Reaktion von Dithranol mit G-6-PDH

Inhibitoren können Enzyme reversibel oder irreversibel hemmen. Bei einer reversiblen Hemmung handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion nach folgender Gleichung:



Bei reversibler Hemmung kann infolge der Dissoziation von EI der Inhibitor, z. B. durch Dialyse, entfernt werden. Kompetitive, nichtkompetitive und unkompetitive reversible Hemmungen werden durch die Wirkung des Inhibitors auf die Reaktionskinetiken nach der Michaelis-Menten-Gleichung (11) unterschieden. – Bei einer irreversiblen Hemmung bleibt der Inhibitor an das Enzym gebunden: Die Enzymaktivität läßt sich nicht regenerieren.

G-6-PDH reagiert in einer Zwei-Substrat-Reaktion mit G-6-P und NADP^+ als Cosubstrat und zeigt eine komplexe Kinetik. Hält man eine Substratkonzentration im Sättigungsbereich konstant und ändert die Konzentration des zweiten Substrates, so läßt sich die Reaktionskinetik nach einer Pseudo-Ein-Substrat-Reaktion ermitteln.

Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der G-6-P-Konzentration

Bei konstanter NADP^+ -Konzentration wurde die Wirkung variabler G-6-P-Konzentrationen auf die Reaktionsgeschwindigkeit gemessen. Zur Bestimmung des Hemmtyps wurden Enzymlösungen mit $1 \cdot 10^{-4}$ oder $2 \cdot 10^{-4}$ M Dithranol inkubiert.

Die graphische Darstellung nach Lineweaver-Burk ($1/v$ gegen $1/[s]$) ergab eine Gerade, aus der sich v_{\max} und K_m ablesen lassen (Abb. 3). In der Abbildung nach Dixon (12) ($1/v$ gegen Inhibitorkonzentration $[i]$) kann man K_i direkt ablesen (Abb. 4).

Den Darstellungen nach Lineweaver-Burk bzw. Dixon zufolge scheint es sich um einen nicht-kompetitiven

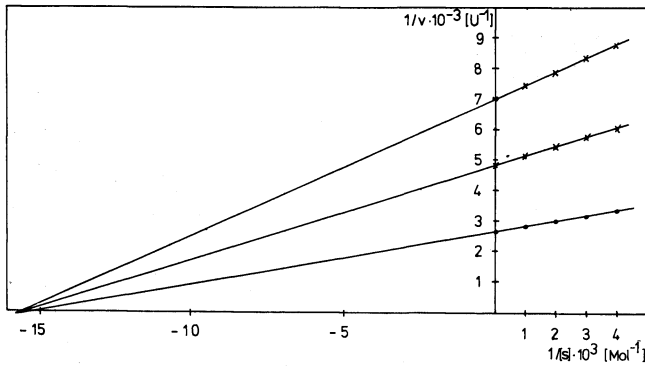


Abb. 3: Lineweaver-Burk-Diagramm.

Hemmtyp zu handeln. Die Reaktionsgeschwindigkeit wird durch Dithranol verringert und kann auch durch hohe Substratkonzentrationen nicht wieder erhöht werden.

Der K_m -Wert für G-6-P läßt sich aus der ungehemmten Reaktion im Lineweaver-Burk-Diagramm mit $6,8 \cdot 10^{-5}$ M (Lit. 13: $6,9 \cdot 10^{-5}$ M) berechnen. Als K_i -Wert folgt aus der Darstellung nach Dixon $1,4 \cdot 10^{-4}$ M. Cotton und van Rossum (14) geben einen »wahren« K_i -Wert von $2 \cdot 10^{-4}$ M an: Dieser Wert ist nicht vergleichbar, da diese Autoren als K_i -

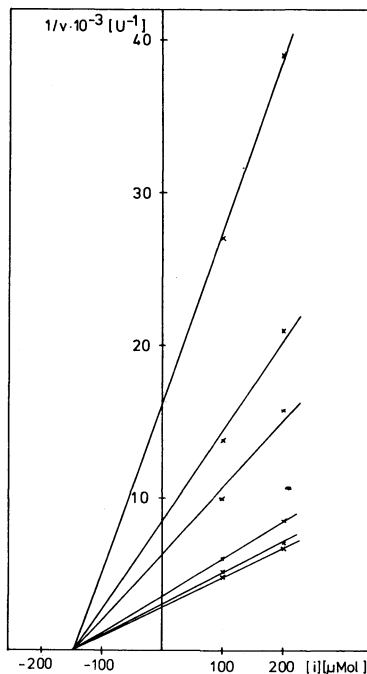


Abb. 4: Dixon-Diagramm.

Wert diejenige Hemmstoffkonzentration bezeichnen, die bei Substratkonzentrationen im Bereich des K_m -Wertes 50%ige Hemmungen hervorruft.

Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der NADP^+ -Konzentration

Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden bei konstanter G-6-P-Konzentration und variablen NADP^+ -Konzentrationen nach Inkubation mit $1 \cdot 10^{-4}$ und $2 \cdot 10^{-4}$ M Dithranol gemessen.

Die Reaktionsgeschwindigkeitsmessungen führen in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver-Burk und im Dixon-Diagramm zu Parallelen. Das wäre charakteristisch für unkompetitive Hemmungen, bei denen die Steigungen der Geraden mit zunehmenden Inhibitorkonzentrationen konstant bleiben, die Reaktionsgeschwindigkeiten dagegen abnehmen. Dieser Hemmtyp ist bei Zwei-Substrat-Reaktionen verbreitet.

Untersuchungen zur Reversibilität der G-6-PDH-Hemmung durch Dithranol

Den zuvor genannten Hemmtypen liegt die Theorie von Michaelis und Menten (11) zugrunde, die eine reversible Enzymhemmung voraussetzt. Die Reversibilität läßt sich durch Verdünnen prüfen: Ist die Hemmung reversibel, so darf die Aktivität nicht auf die Hälfte sinken (hervorgerufen durch die Verdünnung auf das doppelte Volumen), sondern muß darüber liegen, da der Enzym-Inhibitor-Komplex zur Erhaltung des Gleichgewichtes dissoziiert. Dieses Verhalten zeigt der G-6-PDH-Dithranol-Inkubationsansatz nicht. Weiter kann durch Dissoziation freigesetzter Inhibitor – hier Dithranol – durch Ausschütteln mit einem organischen Lösungsmittel oder durch Adsorption an Kohle entfernt werden: Ausschütteln mit Ether oder Methylenchlorid schädigt die G-6-PDH. – Durch die Behandlung des Inkubationsansatzes mit Kohlesuspension sollen niedermolekulare Stoffe adsorbiert werden. Nach Zentrifugieren wird im Überstand die Aktivität gemessen. In unserem Fall war die Aktivität auf 0 gesunken, d.h., G-6-PDH wurde ebenfalls adsorbiert. – Die Reversibilität läßt sich auch durch Zugabe von Rinderserumalbumin (RSA) oder Hühnereiweiß testen, wenn diese eine starke Affinität zum Hemmstoff haben. Wang und Buhler (8) finden nach RSA-Zugabe eine Aktivitätserhöhung von 20–30% der durch Hexachlorophen gehemmten G-6-PDH.

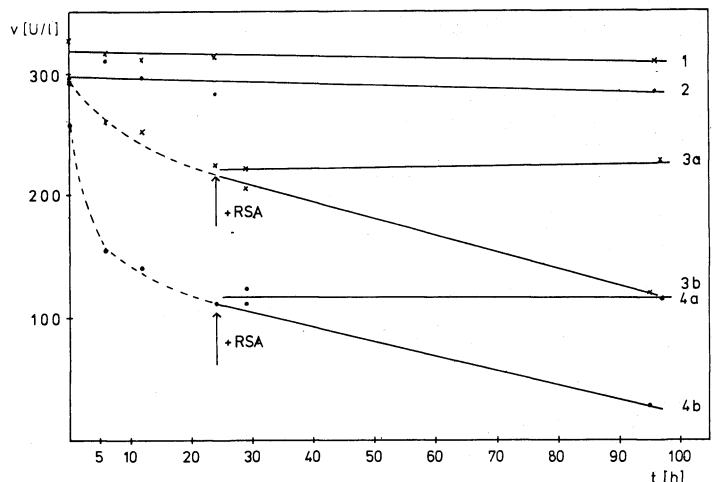


Abb. 5: G-6-PDH-Aktivität im System Dithranol/RSA.

Wir untersuchten das System Dithranol/G-6-PDH, indem wir RSA vor oder nach der Inkubation zusetzten und zeitabhängig die Aktivität bestimmten (Abb. 5).

Bei den Versuchen 1 (Kontrolle) und 2 (Dithranol) wird RSA vor der Inkubation zugesetzt. Weder in der Kontrolllösung noch im Dithranol-Inkubationsgemisch sank die Aktivität in der gemessenen Zeit. Unter den vorher beschriebenen Bedingungen fiel selbst in den Kontrollansätzen die Aktivität: RSA scheint das Enzym zu stabilisieren, außerdem wird eine Wechselwirkung des Dithranols mit dem Enzym verhindert. Vermutlich bindet der RSA-Überschuß Dithranol. In den Ansätzen 3 (Kontrolle) und 4 (Dithranol) wurde die Aktivität zunächst ohne RSA gemessen: Bei der Kontrolle und der mit Hemmstoff versetzten Probe sank die Enzymak-

tivität. Nach 24 h wurde jeweils einem Teil der Inkubationsgemische RSA zugesetzt und die Aktivität der Proben mit und ohne RSA zu bestimmten Zeiten gemessen. In den Proben 3b (Kontrolle) und 4b (Dithranol) ohne RSA sank die Aktivität weiter gleichmäßig ab. Die Inkubationsgemische mit RSA 3a und 4a zeigen selbst nach 4d noch die gleiche Aktivität wie zum Zeitpunkt der Albuminzugabe. Da die Aktivität im Ansatz 4a nicht wieder ansteigt, läßt sich mit dieser Methode Dithranol nicht vom Enzym entfernen. Das spricht für eine irreversible Hemmung.

Irreversible Hemmstoffe, die bei verschiedenen Inhibitor-konzentrationen nach Lineweaver-Burk analysiert werden, geben das Bild eines nicht-kompetitiven Inhibitors (15): Jede Verringerung der Enzymkonzentration wird die Reaktionsgeschwindigkeit v vermindern, ohne jedoch K_m zu beeinflussen. Man kann eine irreversible Hemmung von einer nicht-kompetitiven durch Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit v bei variabler Enzymkonzentration unterscheiden (16). Bei reversibler, nicht kompetitiver Hemmung hat die Gerade mit Inhibitorzusatz eine kleinere Steigung als die Kontrolle. Beide Kurven gehen durch den Nullpunkt. Bei Zusatz eines irreversiblen Hemmstoffs zeigt die Gerade die gleiche Steigung wie die Kontrolle; der Schnittpunkt mit der x-Achse liegt in diesem Fall nicht im Nullpunkt, sondern bei derjenigen Enzymkonzentration, die irreversibel gehemmt wird. Entsprechende Versuche bestätigten, daß G-6-PDH durch Dithranol irreversibel gehemmt wird (Abb. 6).

Untersuchungen zur proteindenaturierenden Wirkung von Dithranol mit Ellmann's Reagenz

Meiers, Kühling und Ippen (3) wiesen immunoelektrophoretisch nach, daß Dithranol Serumproteine nicht denaturiert und nehmen eine unspezifische, lockere Bindung an das Enzymprotein an. – Denaturierende Wirkungen zeigen sich in Strukturänderungen eines Proteinmoleküls, durch die gegebenenfalls die enzymatische Aktivität verloren geht. Eine solche Änderung läßt sich durch die Bestimmung der SH-Gruppen mit Ellmann's Reagenz nachweisen (17). Thiole reagieren quantitativ mit 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure (Ellmann's Reagenz) in schwach alkalischem Milieu zu einem Thiophenolat (Abb. 7), (λ_{\max} 412 nm, ϵ (18) = 14500). So lassen sich Thiolgruppen photometrisch

bestimmen. Während niedermolekulare Thiole sehr rasch reagieren, ist bei Proteinen eine schnelle Reaktion nur für freiliegende SH-Gruppen zu erwarten. SH-Gruppen, die durch die Tertiär- und Quartärstruktur von der umgebenden Lösung abgeschirmt sind, reagieren nur langsam. Durch Zerstörung der nativen Konformation mit Harnstoff oder SDS (Sodiumdodecylsulphate) lassen sich alle Thiolgruppen erfassen, wie Domschke et al. (19) für G-6-PDH aus *Candida utilis* nachgewiesen haben. Dabei reagieren zwei Cysteinmoleküle sofort, zwei nach Zerstörung der nativen Konformation mit SDS, zwei erst nach Reduktion.

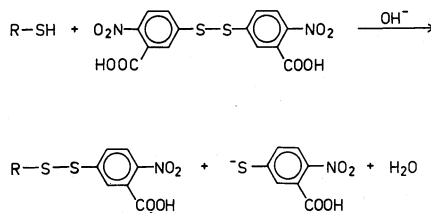


Abb. 7: Prinzip der Ellmann-Bestimmung.

Abb. 8 zeigt die Reaktionskinetiken für natives, denaturiertes und mit Dithranol behandeltes Enzym.

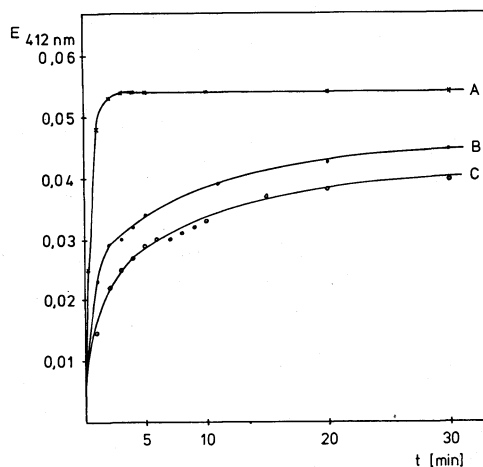


Abb. 8: SDS- und Dithranol-Einwirkung auf G-6-PDH.

A beschreibt die Reaktion in SDS-Lösung: Nach 3 min. ist das Enzym bereits denaturiert und die maximale Extinktion

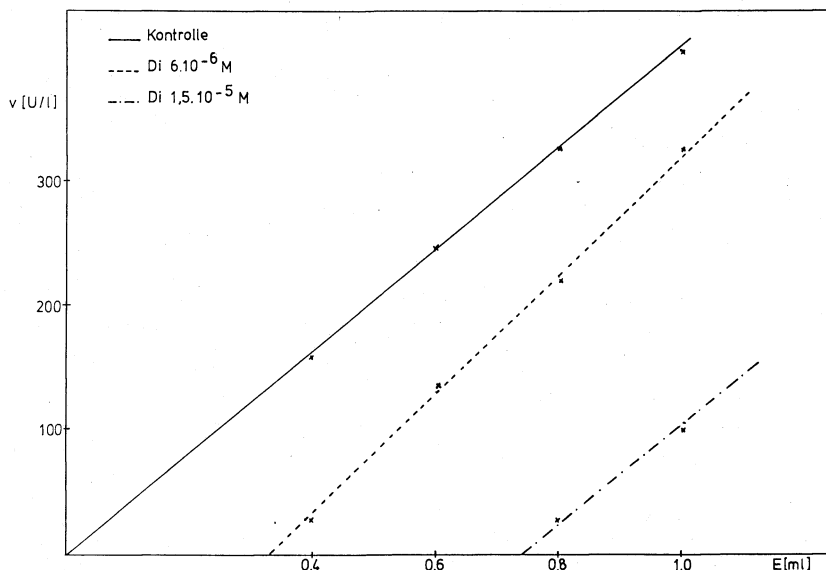


Abb. 6: Irreversible Hemmung der G-6-PDH durch Dithranol.

erreicht. B zeigt die Reaktion des nativen, C die des mit Dithranol inkubierten Enzyms: Diese beiden Proben unterscheiden sich nicht signifikant. Die Extinktionen nehmen langsam zu und erreichen in der gemessenen Zeit nicht den Wert des denaturierten Enzyms. Bei der anschließenden Aktivitätsbestimmung zeigt das mit Dithranol inkubierte Enzym gegenüber der Kontrolle eine Hemmung von 25%.

Experimenteller Teil

1. Densitometrische Gehaltsbestimmung von Dithranol in TRA-Puffer (50 mMol, pH 7,5)

- 1.1. PUFFER: 0,93 g Triethanolamin-Hydrochlorid und 0,2 g EDTA- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{O}$ werden in ca. 50 ml H_2O gelöst, mit 0,1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit H_2O auf 100,0 ml aufgefüllt.
- 1.2. PROBELÖSUNG: 2 mg Dithranol, genau gewogen, werden in 5,00 ml Ethanol p.a. unter N_2 und Lichtausschluß gelöst. 1,00 ml dieser Stammlösung wird jeweils mit 30,0 ml Puffer verdünnt und im Eisbad bei 0 °C unter N_2 und Lichtausschluß 10 min. gerührt.
- 1.3. EICHLÖSUNG: 1 mg Dithranol, genau gewogen, wird in 5,00 ml CH_2Cl_2 gelöst.
- 1.4. VERSUCH: Die Probelösungen werden a) sofort, b) nach Inkubationen von jeweils 10, 20, 30, 60, 90 und 120 min. bei 37 °C und c) nach Inkubation von 18 h bei 0 °C mit 2 N HCl angesäuert und 3 × mit je 10 ml CH_2Cl_2 ausgeschüttelt. Die vereinigten organischen Auszüge werden über Na_2SO_4 sicc. getrocknet, eingeeengt und in einen 5-ml-Meßkolben überführt (= Meßlösung).
- 1.5. GEHALTSBESTIMMUNG: Auf eine DC-Platte (Kieselgel F_{254}) werden mit einer Hamilton-Spritze (stumpfe Nadel) $2 \times 10 \mu\text{l}$ Meßlösung und je $2 \times 2, 4, 6$ und $8 \mu\text{l}$ der Eichlösung aufgetragen und mit Toluol-Eisessig (97+3) ohne Kammersättigung entwickelt; die Platten werden im kalten Luftstrom getrocknet.
- 1.6. AUSWERTUNG: Densitometrisch durch Messung des reflektierten Anteils vom eingestrahnten monochromatischen Licht ($\lambda = 360 \text{ nm}$). Mit einem Zweikanalschreiber werden das Absorptionsprofil und dessen Integration aufgezeichnet, anhand der jeweiligen Eichkurve wird ausgewertet.

2. Bestimmung der Enzymaktivität der G-6-PDH im optischen Test

PRINZIP:



Die Bildungsgeschwindigkeit von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ kann anhand der Extinktionszunahme bei 340, 334 oder 365 nm pro Zeiteinheit verfolgt werden.

- 2.1. LÖSUNGEN: Alle Lösungen werden mit bidestilliertem Wasser frisch hergestellt.
G-6-P-Lösung: 130 mg G-6-P- Na_2 werden in 10,0 ml H_2O gelöst.
NADP⁺-Lösung: 25 mg NADP⁺- $\text{Na}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ werden in 1,0 ml 1% NaHCO_3 -Lösung gelöst.
TRA-Puffer und Dithranol-Lösung: s.o.
Enzymverdünnung: G-6-PDH aus Hefe (Reinheitsgrad I, spez. Aktivität ca. 350 U/mg) wird 1:1000 mit Puffer verdünnt.
- 2.2. INKUBATIONSANSATZ: Pro Meßwert werden 0,05 ml der Enzymverdünnung mit 0,1 ml Dithranol/Pufferlösung bzw. Ethanol/Puffer versetzt und bei 0 °C 18 h inkubiert.
- 2.3. BESTIMMUNGSANSATZ: Meßstrahlung: 334 nm;
Schichtdicke: 1 cm; Meßtemp. 25 °C;
Meßvolumen: 3,0 ml.

TRA-Puffer	2,75 ml
Inkubationsansatz	0,15 ml
NADP ⁺ -Lösung	0,05 ml

mischen, 5 min. bei 25 °C halten

G-6-P-Lösung	0,05 ml
--------------	---------

mischen, danach 5 min. jede min. die Extinktion ablesen.

Pro Meßwert drei Bestimmungsansätze.

2.4. BERECHNUNG DER AKTIVITÄT MITTELS EXTINKTIONSKOEFFIZIENTEN

$$\text{Volumenaktivität} = \frac{V \cdot 1000}{\epsilon \cdot d \cdot v} \cdot \Delta E / \Delta t \text{ [U/l]}$$

$$\epsilon_{334} \text{NADPH} + \text{H}^+ = 6,0 \text{ cm}^2 / \mu\text{Mol}$$

$$V = 3,00 \text{ ml}$$

$$v = 0,05 \text{ ml}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

$$\Delta E / \Delta t = \text{Extinktionsdifferenz pro Zeit}$$

Die in den Tabellen angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei Messungen.

3. Reaktionskinetik bei variabler G-6-P-Konzentration

3.1. HERSTELLUNG DER G-6-P-LÖSUNGEN:

- 1) 251 mg G-6-P- Na_2 werden in 2,0 ml H_2O gelöst ($\leftarrow 100 \text{ K}_m$)
- 2) 3 Teile Lsg. 1) + 1 Teil H_2O ($\leftarrow 75 \text{ K}_m$)
- 3) 1 Teil Lsg. 1) + 1 Teil H_2O ($\leftarrow 50 \text{ K}_m$)
- 4) 1 Teil Lsg. 1) + 9 Teile H_2O ($\leftarrow 10 \text{ K}_m$)
- 5) 1 Teil Lsg. 4) + 9 Teile H_2O ($\leftarrow 1 \text{ K}_m$)
- 6) 1 Teil Lsg. 5) + 1 Teil H_2O ($\leftarrow 0,5 \text{ K}_m$)
- 7) 1 Teil Lsg. 5) + 4 Teile H_2O ($\leftarrow 0,2 \text{ K}_m$)

Die molaren Verhältnisse beziehen sich auf den Bestimmungsansatz, in den jeweils 0,05 ml pipettiert werden; weitere Daten s. 2.1. – 2.4.

4. Reaktionskinetik bei variabler NADP⁺-Konzentration

4.1. HERSTELLUNG DER NADP⁺-LÖSUNG:

- 1) 126 mg NADP⁺- $\text{Na}_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ werden in 1,0 ml einer 1% NaHCO_3 -Lösung gelöst ($\leftarrow 50 \text{ K}_m$)
- 2) 1 Teil Lsg. 1) + 4 Teile NaHCO_3 -Lösung ($\leftarrow 10 \text{ K}_m$)
- 3) 1 Teil Lsg. 2) + 9 Teile NaHCO_3 -Lösung ($\leftarrow 1 \text{ K}_m$)
- 4) 1 Teil Lsg. 3) + 1 Teil NaHCO_3 -Lösung ($\leftarrow 0,5 \text{ K}_m$)
- 5) 1 Teil Lsg. 3) + 2,3 Teile NaHCO_3 -Lsg. ($\leftarrow 0,3 \text{ K}_m$)
- 6) 1 Teil Lsg. 3) + 4 Teile NaHCO_3 -Lösung ($\leftarrow 0,2 \text{ K}_m$)

Die molaren Verhältnisse beziehen sich auf den Bestimmungsansatz, in den 0,05 ml pipettiert werden, alle weiteren Daten s. 2.1–2.4.

5. Prüfung auf Reversibilität der G-6-PDH-Hemmung

- 5.1. HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN: 0,5 g RSA werden in 1,0 ml TRA-Puffer gelöst, weitere Daten s. 2.1.
- 5.2. INKUBATIONSANSATZ: Pro Meßwert werden 0,05 ml Enzymverdünnung mit 0,1 ml Dithranol/Pufferlösung bzw. Ethanol/Puffer versetzt. Dazu gibt man a) sofort, b) nach 24 h 0,2 ml der RSA-Lösung und inkubiert bei 0 °C.

Messung und Auswertung wie unter 2.3. und 2.4.

5.3. REAKTIONSKINETIK BEI VARIABLER G-6-PDH-KONZENTRATION.

5.3.1. Herstellung der Lösungen: s. 2.1.

5.3.2. Inkubationsansatz:

	A	B	C	D
Enzymverdünnung (ml)	0,04	0,06	0,08	0,10
Dithranollösung (ml)	0,02	0,02	0,02	0,02
TRA-Puffer (ml)	0,44	0,42	0,40	0,38

5.3.3. Bestimmungsansatz: Meßstrahlung: 334 nm;
Schichtdicke: 1 cm; Meßtemp.: 25 °C; Meßvolumen: 3,0 ml

TRA-Puffer	2,40 ml
Inkubationsansatz	0,50 ml
NADP ⁺ -Lösung	0,05 ml

mischen, 5 min. bei 25 °C halten

G-6-P-Lösung	0,05 ml
--------------	---------

mischen, danach 5 min. jede min. die Extinktion ablesen.

6. SH-Gruppen-Bestimmung mit Ellmann's Reagenz

6.1. HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN:

- Zur Herstellung einer 10⁻² M Lösung von Ellmann's Reagenz werden 39,6 mg 5,5'-Dithio-bis-2-nitrobenzoesäure unter Zusatz von 100 mg NaHCO₃ in 10,0 ml H₂O gelöst.
- 0,3 g SDS werden in 100,0 ml H₂O gelöst.
- G-6-PDH-Suspension wird unverdünnt verwendet (5 mg/ml).

6.2. INKUBATIONSANSATZ: 0,20 ml Enzymsuspension, 0,50 ml TRA-Puffer und 2,15 ml H₂O werden mit 0,05 ml gesättigter Lösung von Dithranol in Ethanol bzw. mit 0,05 ml Ethanol versetzt und bei 0 °C 18 h inkubiert.

6.3. BESTIMMUNGSANSATZ: Meßstrahlung: 412 nm; Schichtdicke: 1 cm; Meßtemp.: 25 °C; Meßvolumen: 3,0 ml.

Inkubationsansatz	0,20 ml
TRA-Puffer	0,50 ml
H ₂ O (SDS-Lösung)	2,20 ml

nach 3 min. Vorinkubation
Reaktion durch Zugabe von

Ellmann's Reagenz	0,10 ml
-------------------	---------

starten und 30 min. die Extinktion verfolgen.

Zusammenfassung

Durch kinetische Messungen wurde nachgewiesen, daß Dithranol das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase irreversibel hemmt.

Summary

Kinetic measurements indicate that glucose-6-phosphate dehydrogenase is inhibited irreversibly by dithranol.

Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft verbindlich für die Förderung dieser Arbeit.

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. W. Wiegrebe, E. Plumier und A. Retzow
Naturwissensch. Fak. IV der Universität Regensburg
Universitätsstraße 31, 8400 Regensburg

Literatur

- Unna, P. G.: Derm. Wschr. 62 (1916) 116, 150, 175.
- Stern, R. S.: N. Engl. J. Med. 300 (1979) 809 ref. in: Dermatosen 27 (1979) 80.
- Meiers, H. G., Kühling, K., u. H. Ippen: Dermatologica 136 (1968) 497.
- Raab, W., u. H. Siber: Arch. dermat. Forsch. 249 (1974) 179.
- Rassner, G.: Arch. dermat. Forsch. 241 (1971) 237.
- Retzow, A., Schäublin, J., u. W. Wiegrebe: Pharm. Ztg. 123 (1978) 1808.
- Domschke, W., u. G. F. Domagk: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 350 (1969) 1111.
- Wang, J.-L. u. D. R. Buhler: Biochemical Pharmacology 27 (1978) 2947.
- Zwarenstein, H., Sapeika, N., u. J. Holmes: Research Communications in Chemical Pathology und Pharmacology 6 (1973) 701.
- Raab, W., u. H. Siber: Arch. dermat. Forsch. 249 (1974) 357.
- Michaelis, L., u. M. L. Menten: Biochem. Z. 49 (1913) 333.
- Dixon, M.: Biochem. J. 55 (1953) 170.
- Löhr, G. W., u. W. D. Waller in H. U. Bergmeyer, Methoden der enzymatischen Analyse, Bd. I, 3. Aufl. Verlag Chemie Weinheim 1974, S. 673 ff.
- Cotton, D. W. K., u. E. van Rossum: Arch. dermat. Forsch. 252 (1975) 147.
- Dixon, M., u. E. C. Webb, Enzymes, 3. Aufl., Longman Group Ltd. 1979, S. 337.
- Segel, J. H., Enzyme Kinetics, John Wiley & Sons 1975, S. 127.
- a) Ellmann, G. L., Archives of Biochem. and Biophysics 74 (1958) 443.
b) Ellmann, G. L., ibidem 82 (1959) 70.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L., u. B. Zerner, Analytical Biochemistry 94 (1979) 75.
- Domschke, W., von Hinüber, C., u. G. F. Domagk: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 351 (1970) 194.