

Elizabeth Plumier, Angelika Retzow und Wolfgang Wiegrebe\*)

Aus dem Lehrstuhl Pharmazeutische Chemie I des Instituts für Pharmazie der Universität Regensburg

## Hemmung der Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch Dithranol-Ester

Nach Untersuchungen mehrerer Arbeitsgruppen (1, 2, 3) zeigen die Acetylerster des Dithranols eine gewisse antipsöriatische Wirksamkeit, bewirken aber im Gegensatz zum Dithranol praktisch keine Irritationen der Haut.

In einer vorausgegangenen Publikation haben wir durch kinetische Messungen nachgewiesen, daß Dithranol (1) das Enzym Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) (E. C. 1.1.1.49) irreversibel hemmt (4). Die vorliegende Arbeit beschreibt analoge Untersuchungen mit Dithranol-diacetat (2) und Dithranol-triacetat (3). Nach Raab et al. (5) wirken Dithranol (1) und sein Monoacetyl-ester stärker als 2 und 3.

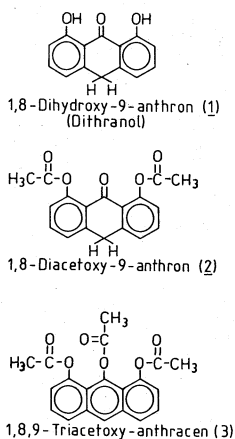


Abb. 1: Dithranol (1), Dithranol-diacetat (2) und Dithranol-triacetat (3)

Tabelle 1:

	Di-2-ac (2)		Di-3ac (3)	
	Octanol	H <sub>2</sub> O	Octanol	H <sub>2</sub> O
$\lambda_{\max}$	261 nm	261 nm	258 nm	255 nm
$\epsilon$	$3,119 \cdot 10^4$	$2,470 \cdot 10^4$	$1,302 \cdot 10^5$	$6,46 \cdot 10^4$
$\log \epsilon$	4,494	4,393	5,115	4,810
$K = \frac{E_{\text{Oct}} \cdot \epsilon_{\text{H}_2\text{O}}}{E_{\text{H}_2\text{O}} \cdot \epsilon_{\text{Oct}}}$	196,0		72,1	

Eingegangen am 11.12.1981.

\*) Herrn Dr. Curt Liesche, Bremen, zum 80. Geburtstag freundlichst gewidmet

### Polaritäten von 1, 2 und 3: Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

Als System wurde Wasser/n-Octanol gewählt, das dem physiologischen Verhalten der Lipoprotein-Membran sehr nahe kommt (6). Nach der Verteilung zwischen den Phasen unter festgelegten Bedingungen wurden die Extinktionen bei  $\lambda_{\max}$  der oben genannten Verbindungen gemessen und die Konzentrationen ausgehend von  $\epsilon$  berechnet. Da Dithranol (1) in Wasser praktisch unlöslich ist, konnten wir für diese Substanz  $K = \frac{C_{\text{Octanol}}}{C_{\text{Wasser}}}$  nicht bestimmen. Für 2 und 3 fanden wir folgende Werte (siehe Tab. 1):

Daraus wird ersichtlich, daß 3 eine höhere Affinität zur Wasser-Phase besitzt als 2; Dithranol ist noch weniger polar.

### G6P-DH-Aktivität als Funktion der Konzentrationen von Di-3-ac (3) und Di-2-ac (2)

Unter den für Dithranol beschriebenen Bedingungen (4) haben wir Di-3-ac (3) und Di-2-ac (2) untersucht. Die Enzymhemmungen sind nicht auf freies Dithranol (1) zurückzuführen: In Parallelversuchen wurden 3 und 2 nicht zu 1 hydrolysiert.

### Dithranol-triacetat (3)

Nach 18stündiger Inkubation bei 0°C mit den in Tab. 2 angegebenen Konzentrationen wurde die verbliebene Enzymaktivität bei 25°C gemessen.

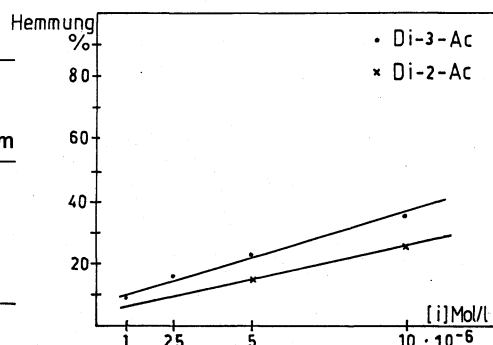


Abb. 2: Hemmwirkung von 2 und 3 auf G6P-DH in Abhängigkeit von den Inhibitorkonzentrationen

**Tabelle 2:**

Di-3-ac (Mol/l)	Enzymaktivität *) (U/l)	Restaktivität %	Hemmung %
-; Kontrolle	309,7	100	0
$1 \cdot 10^{-5}$	205,5	66,3	33,7
$5 \cdot 10^{-6}$	241,9	78,1	21,9
$2,5 \cdot 10^{-6}$	267,8	86,4	13,6
$1 \cdot 10^{-6}$	281,9	91,0	9,0

\*) Mittelwerte aus drei Messungen, Streuung  $\pm 2,3\%$

Unterhalb  $1 \cdot 10^{-6}$  Mol/l Di-3-ac (3) kann die Hemmwirkung nicht sicher gemessen und vernachlässigt werden, oberhalb  $1 \cdot 10^{-5}$  Mol/l fällt 3 aus dem Puffer aus.

**Dithranol-diacetat (2)**

Da Di-2-ac (2) G6P-DH schwächer hemmt als 3, wurde nur bei den Konzentrationen  $1 \cdot 10^{-5}$  M und  $5 \cdot 10^{-6}$  M gemessen (Tab. 3).

**Tabelle 3:**

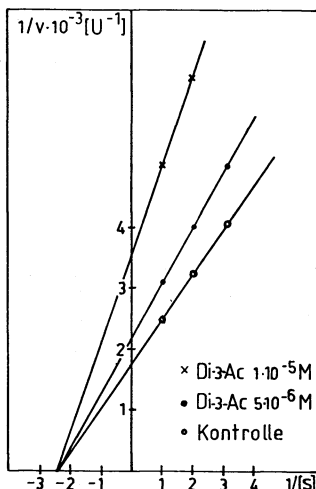
Di-2-ac (Mol/l)	Enzymaktivität*) U/l	Restaktivität %	Hemmung %
-; Kontrolle	268,8	100	0
$1 \cdot 10^{-5}$	193,8	72,1	27,9
$5 \cdot 10^{-6}$	229,3	85,4	14,6

\*) Mittelwerte aus drei Messungen, Streuungen  $\pm 1,9\%$

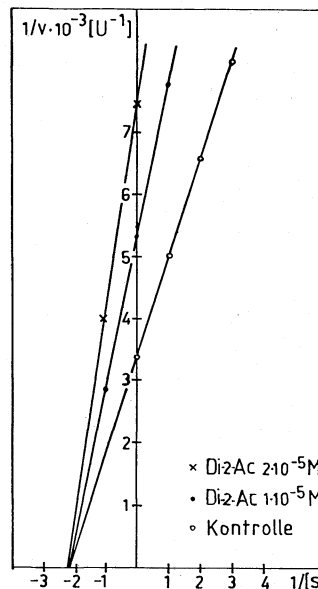
Die gegenüber 3 kleinere Hemmwirkung von 2 war unerwartet: Als gemischtes phenyloges Anhydrid sollte 2 chemisch reaktiver sein. Andererseits deckt sich dieser Befund mit den Ergebnissen von Raab (5).

**G6P-DH-Aktivität als Funktion der Substratkonzentration**

Mit Ausnahme der Substrat-Konzentration wurden alle Parameter (NADP<sup>+</sup>, G6P-DH, Hemmstoffe) konstant gehalten. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden bei fünf G6P-Konzentrationen zwischen  $100 K_m$  und  $0,5 K_m$  bestimmt. Im Lineweaver-Burk-Diagramm schneiden sich die Geraden auf der x-Achse: Diese Tatsache entspricht entweder einer (reversiblen) nicht-kompetitiven oder einer irreversiblen Hemmung. Die Versuche zur Bestimmung des Hemmtyps (s. u.) unterscheiden zwischen diesen Möglichkeiten.



**Abb. 3: Enzymatische Aktivität als Funktion der Substratkonzentration**



**Abb. 4: Enzymatische Aktivität als Funktion der Substratkonzentration**

**Di-3-ac (3)**

Zur Bestimmung des Hemmtyps wurde G6P-DH mit 3 in den Konzentrationen  $1 \cdot 10^{-5}$  M bzw.  $5 \cdot 10^{-6}$  M inkubiert (Abb. 3).

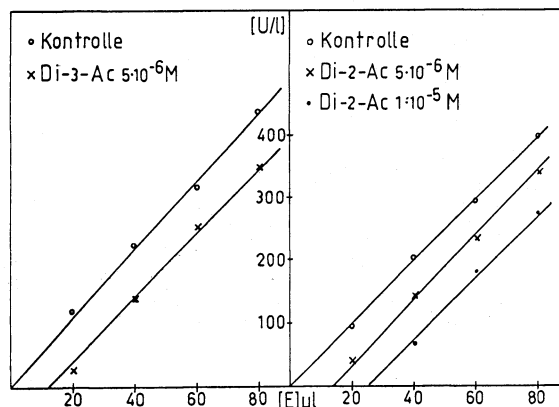
**Di-2-ac (2)**

2 wurde in  $1 \cdot 10^{-5}$  M und  $2 \cdot 10^{-5}$  M Konzentration eingesetzt (Abb. 4).

**Bestimmung des Hemmtyps**

Nach Segel (7) bzw. Whitaker (8) läßt sich eine reversible, nichtkompetitive Hemmung von einer irreversiblen unterscheiden, wenn man in einem Diagramm  $v_{max}$  als Funktion der Enzymkonzentration aufträgt: Bei einer nicht-kompetitiven Hemmung gehen die Geraden der Kontrolle und der gehemmten Reaktion durch den Koordinaten-Nullpunkt und haben folglich verschiedene Steigungen; bei einer irreversiblen Hemmung sind die entsprechenden Geraden auf der x-Achse verschoben und parallel. Die Kontrollgerade läuft durch den Nullpunkt, die Inhibitorgerade ist um einen Wert x verschoben, der von der Menge des Hemmstoffes abhängt. Mit anderen Worten: Diese Verschiebung entspricht der irreversibel gehemmten Menge des Enzyms.

Unsere entsprechenden Versuche zeigen für Di-3-ac (3) und Di-2-ac (2) die charakteristischen Diagramme einer



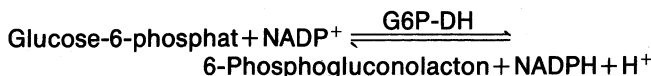
**Abb. 5: Enzymatische Aktivität als Funktion der Enzymkonzentration**

irreversiblen Hemmung (Abb. 5). Die Konzentrationen an G6P und NADP<sup>+</sup> waren konstant, die G6P-DH-Konzentration wurde variiert, **3** wurde  $5 \cdot 10^{-6}$  molar eingesetzt, **2** in den Konzentrationen  $5 \cdot 10^{-6}$  M/l und  $1 \cdot 10^{-5}$  M/l.

## Elektrophorese

Aliquote Teile der Inkubationsansätze von G6P-DH mit Di-2-ac (**2**) bzw. Di-3-ac (**3**) in Tris-Puffer pH 7,5 sowie entsprechende Volumina des ungehemmten Enzyms in gleicher Verdünnung ließ man auf einer Cellogel-Platte wandern. – Zur Detektion haben wir die Methoden von Sparkes (9, 10) bzw. Rattazzi (11) abgewandelt und die Wanderungstrecke des Enzyms festgelegt, indem wir die Elektropho-

rese-Platte in Kontakt mit einer zweiten Cellogel-Platte brachten, die mit G6P und NADP<sup>+</sup> getränkt war, und auf der nach der Reaktion:



die Fluoreszenz des NADPH bei 366 nm lokalisiert wurde.

Diese Experimente führten zu dem Schluß, daß wir es mit einer irreversiblen Hemmung zu tun haben. Tatsächlich fanden wir bei Konzentrationen an Enzym und Inhibitor, die zu einer vollständigen Hemmung führen, daß das Enzym nicht freigesetzt wird: Nur in der ungehemmten Enzymprobe trat Fluoreszenz auf.

## Experimenteller Teil

### Bestimmung der Verteilungskoeffizienten

PHASEN: Frisch destilliertes Wasser bzw. n-Octanol, mit Wasser gesättigt.

UNTERSUCHUNGSBEDINGUNGEN: Je 25 ml Octanol- und Wasserphase wurden bei  $25 \pm 1^\circ$  5h unter N<sub>2</sub> in braunen Schliffgefäßen geschüttelt. Dann ließ man 15 h absetzen.

BERECHNUNG VON  $\epsilon$ :

In Octanol: 2 mg Dithranol-diacetat (**2**) bzw. Dithranol-triacetat (**3**) wurden genau gewogen und in 100 ml n-Octanol gelöst ( $6,45 \cdot 10^{-5}$  molare Lösung **2**;  $5,68 \cdot 10^{-5}$  molare Lösung **3**). Die Extinktionen wurden bei 22°C in 3 ml Quarzküvetten beim jeweiligen  $\lambda_{\text{max}}$  der Substanz bestimmt und  $\epsilon$  berechnet:  $\epsilon = \frac{E}{c \cdot d}$ ; E = abgelesene Extinktion, c = Konzentration (Mol/l), d = Schichtdicke (1,00 cm).

In Wasser:  $\epsilon = E/c \cdot d$ ; Ermittlung von c:  $c = \frac{E_1 - E_2}{\epsilon_{\text{Octanol}}}$ ; E<sub>1</sub> = Extinktion der lipophilen Phase vor Extraktion mit Wasser, E<sub>2</sub> = Extinktion der lipophilen Phase nach Extraktion. – **2** und **3** lassen sich nicht direkt in Wasser lösen. E = Extinktion der durch Ausschütteln erhaltenen Wasserphase.

VERSUCHE: 25 ml der Lösungen von **2** oder **3** in Octanol (drei verschiedene Konzentrationen) wurden mit 25 ml Wasser 5 h geschüttelt. Nach der Gleichgewichtseinstellung (15 h) zentrifugiert man 15 min und liest die Extinktion in jeder Phase wie oben ab. Berechnung von K: Tab. 1.

### Enzymaktivität als Funktion der Konzentration des Hemmstoffes

METHODE: Man mißt die Absorptionszunahme bei 340 nm, die auf die Bildung von NADPH zurückgeht.

LÖSUNGEN:

TRA-Puffer pH 7,5, 50 mmolar (4).

Enzymverdünnung: G6P-DH aus Hefe, Reinheitsgrad I, spezifische Aktivität ca. 350 U/mg, wird 1:1000 mit TRA-Puffer verdünnt. Diese Verdünnung führt zu  $\Delta E/\Delta t$  zwischen 0,02 und 0,04/min für das ungehemmte Enzym.

Glucose-6-Phosphat- und NADP<sup>+</sup>-Lösungen: (4).

Di-3-ac-Lösung: 2,64 mg **3** in 5,0 ml Ethanol (Stammlösung,  $1,5 \cdot 10^{-3}$ M).

Di-2-ac-Lösung: 2,32 mg **2** in 5,0 ml Ethanol (Stammlösung,  $1,5 \cdot 10^{-3}$ M).

INKUBATIONSANSATZ: 0,20 ml der jeweiligen Stammlösungen wurden mit Puffer zu 5,00 ml verdünnt. 4,30 ml TRA-Puffer, 0,50 ml G6P-DH-Verdünnung und 0,2 ml der jeweiligen Stammlösungs-Verdünnungen wurden 18 h bei 0°C unter Schütteln inkubiert.

BESTIMMUNGSANSATZ: Meßstrahlung: 340 nm; Schichtdicke: 1 cm; Temp.: 25°C; Meßvolumen: 3,0 ml

TRA-Puffer 2,40 ml

Inkubationsansatz 0,50 ml

NADP<sup>+</sup>-Lösung 0,05 ml

mischen, 5 min bei 25°C halten

G6P-Lösung 0,05 ml

mischen, nach 1 min Wartezeit 5 min lang jede min Extinktion ablesen.

BERECHNUNG DER AKTIVITÄT:

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

$$\epsilon_{340} = 6,22 \text{ cm}^2/\mu\text{Mol}$$

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

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

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

$\Delta E/\Delta t$  = Extinktionsdifferenz pro Zeiteinheit. – Alle Tabellenangaben sind Mittelwerte aus drei Messungen.

### Enzym-Aktivität in Abhängigkeit von der Substrat-Konzentration

G6P-Lösungen: 75,6 mg G6P-Na<sub>2</sub> wurden in 0,60 ml Wasser gelöst (100 K<sub>m</sub>). Durch Verdünnen mit Wasser (vgl. (4)) wurden Lösungen von 50 K<sub>m</sub>, 10 K<sub>m</sub>, 1 K<sub>m</sub> und 0,5 K<sub>m</sub> hergestellt. – Die molaren Verhältnisse sind auf den Bestimmungsansatz bezogen.

### Bestimmung des Hemmtyps (bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen)

INKUBATIONEN:

	A	B	C	D
G6P-DH-Verdünnung (ml)	0,04	0,06	0,08	0,10
Di-3-ac- bzw. Di-2-ac-Lösung	0,02	0,02	0,02	0,02
TRA-Puffer (ml)	0,44	0,42	0,40	0,38

MESSUNGEN UND AKTIVITÄTSBERECHNUNGEN vgl. unter »Enzymaktivität als Funktion der Konzentration des Hemmstoffes«.

### Elektrophorese

TRIS-PUFFER pH 7,5 (11): 7,26 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan und 1,19 g EDTA-Na<sub>2</sub> wurden in 900 ml bidestilliertem Wasser gelöst, Zusatz von 3,15 g Citronensäure gab pH 7,5. Die Lösung wurde auf 1000 ml aufgefüllt.

**ENTWICKLERLÖSUNG:** 30 mg G6P und 15 mg NADP<sup>+</sup> in 10 ml Tris-Puffer zum Imprägnieren von vorbehandelten Cellogele-Streifen.

**FOLIEN:** Celluloseacetat-Streifen (»Cellogele« Fa. Chemetron) 4 cm breit, 17 cm lang und 0,25 mm dick wurden in 40% Methanol bei 0°C gelagert; vor Gebrauch wurde während 1 h dreimal mit Tris-Puffer gewaschen und 10 min unter Spannung aequilibriert.

**VERSUCH:** 7,9 mg **3** bzw. 9,3 mg **2** wurden in je 5,00 ml Ethanol gelöst. – Inkubationsmischung: 4,30 ml Tris-Puffer, 0,50 ml G6P-DH-Verdünnung und 0,20 ml der oben angegebenen Lösungen von **2** bzw. **3** wurden 18 h bei 0° inkubiert. – 3 µl Inkubationsmischung wurden auf Cellogelestreifen an der Kathode aufgetragen, man ließ 2 h bei 250 V wandern. – Zur Entwicklung der NADPH-Fluoreszenz wurden Entwicklerplatte und Probenplatte 10 min im Dunkeln aufeinander gelegt.

**Addendum:** LPLC-Trennung von **2** und **3** (Kurt Hahn)

4,5 g Dithranol (**1**) in 50 ml Acetanhydrid wurden 4 h unter N<sub>2</sub> gekocht; durch Umkristallisation des Rohprodukts aus Benzol (**12**) wurde nichtumgesetztes **1** weitgehend entfernt. Das resultierende **2+3**-Gemisch wurde wie folgt getrennt:

Gerät: Chromatospac Prep 10; Säule: 35 × 500 mm; Füllung: 200 g LiChroprep Si 60, 15–25 µm, in ca. 500 ml CHCl<sub>3</sub> aufgeschwemmt. – Trennung: 2–3 g **2+3**-Gemisch in 30–50 ml CHCl<sub>3</sub> wurden bei 9–9,9 bar Säulendruck (Förderdruck am Säulenkopf 1,4 bar) mit Toluol/Aceton 95+5 getrennt.

Detektion: UV-Absorption bei 323 nm (Spectrochrom Gilson). Die Fraktionen wurden dc (**13**) zugeordnet und vereinigt, die Abdampfrückstände aus Benzol umkristallisiert. – Schmp. **2**: 195–196° [Lit. (**12**) 195–196°]; Schmp. **3**: 218–219° [Lit. (**14**) 208°].

## Literatur

1. Whitefield, M.: *Arzneim.-Forsch.* **20** (1970) 137.
2. Hellier, F.F., u. M. Whitefield: *Br. J. Derm.* **79** (1967) 491.
3. Hodgson, C., u. E. Hell: *Br. J. Derm.* **83** (1970) 397.
4. Retzow, A., Plumier, E., u. W. Wiegrebe: *Pharm. Ztg.* **126** (1981) 2150.
5. Raab, W., u. H. Siber: *Arch. Derm. Forsch.* **249** (1974) 179.
6. Leo, A., Hansch, C., u. D. Elkins: *Chem. Rev.* **71** (1971) 525.
7. Segel, J.H., *Enzyme Kinetics*, John Wiley & Sons, New York 1975, S. 127.
8. Whitaker, J.R., *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker, New York 1972, S. 218 u. 234.
9. Sparkes, R.S., Baluda, M.C., u. D.E. Townsend: *Analyt. Bioch.* **30** (1969) 289.
10. Sparkes, R.S., Baluda, M.C., u. D.E. Townsend: *J. of Lab. and Clin. Med.* **73** (1973) 531.
11. Rattazzi, M.C., Bernini, L.F., Fiorelli, G., u. P.M. Mannucci: *Nature* **213** (1967) 79.
12. Wiegrebe, W., Gerber, A., Kappler, J., u. Chr. Bayerl: *Arzneim.-Forsch.* **29** (1979) 1089.
13. Retzow, A., Schäublin, J., u. W. Wiegrebe: *Pharm. Ztg.* **123** (1978) 1808.
14. Yarrow, H.: *Brit. Pat.* 1,070,949; CA **67**: P 90585 (1967).

## Zusammenfassung

Kinetische Messungen und Elektrophorese zeigen, daß Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase durch Dithranol-triacetat (**3**) und Dithranol-diacetat (**2**) irreversibel gehemmt wird.

## Summary

Kinetic measurements and electrophoresis reveal an irreversible inhibition of glucose-6-phosphate-dehydrogenase by dithranol-triacetate (**3**) and dithranol-diacetate (**2**), respectively.



Wir danken der Deutschen Forschungsgemeinschaft herzlich für die Unterstützung dieser Arbeiten.

*Anschrift der Verfasser:*

*E. Plumier, Dr. A. Retzow und Prof. Dr. W. Wiegrebe  
Institut für Pharmazie der Universität Regensburg  
Universitätsstraße 31, 8400 Regensburg*