

# Chemische Grundlagen des Wirkungsmechanismus von Glyoxalase I, einem Zielenzym für Cancerostatica

Von Kenneth T. Douglas\* und Seiji Shinkai

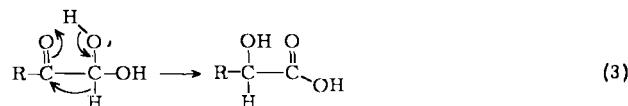
Glyoxalase I wurde zwar schon 1913 entdeckt, die Aufgabe dieses Enzyms im Organismus ist aber trotz allem noch nicht endgültig geklärt. Es katalysiert die Umsetzung von  $\alpha$ -Ketoaldehyden und Glutathion zu *S*-*D*-Lactoylglutathion, das dann von Glyoxalase II zu *D*-Lactat und Glutathion gespalten wird. Als natürliches Substrat vermutete man lange Methylglyoxal, doch war unbekannt, ob diese Verbindung überhaupt im Organismus entsteht oder ob sie ein Artefakt ist. Heute kennt man metabolische Vorgänge, bei denen  $\alpha$ -Ketoaldehyde gebildet werden. Glyoxalase I kommt in Zellen jeder Entwicklungsstufe vor. Obwohl ihre physiologische Bedeutung noch lange nicht enträtselt ist, wurde Glyoxalase I öfters eine Rolle bei der Krebsentstehung zugesprochen. In diesem Fortschrittsbericht wird vor allem der Wirkungsmechanismus des Enzyms diskutiert, dessen Kenntnis die Synthese starker Inhibitoren ermöglicht. Bis vor ca. zehn Jahren nahm man einen Hydridtransfer als entscheidenden Schritt an; heute gilt jedoch – vor allem aufgrund der Befunde von NMR-Untersuchungen – als sicher, daß es sich dabei um eine Protonenübertragung handelt.

## 1. Einleitung

Seit langem ist bekannt, daß  $\alpha$ -Ketoaldehyde stark cancerostatisch sind<sup>[1]</sup>; ihre Verwendung als Cancerostatica ist jedoch nicht möglich, da sie *in vivo* durch das Glyoxalase-System schnell in die entsprechenden inaktiven<sup>[1]</sup>  $\alpha$ -Hydroxycarbonsäuren umgewandelt werden. Das Glyoxalase-System wurde 1913 entdeckt<sup>[2]</sup>; es besteht aus zwei Enzymen und dem Cofaktor Glutathion (GSH). Glyoxalase I (Lactoylglutathion-Lyase, EC 4.4.1.5) überführt das aus GSH und Methylglyoxal oder anderen  $\alpha$ -Oxoaldehyden gebildete Monohemithioacetal gemäß Gleichung (1) in *S*-Lactoylglutathion<sup>[3]</sup>. Dieser Thiolester wird dann von Glyoxalase II (Hydroxyacylglutathion-Hydrolase, EC 3.1.2.6) zu Milchsäure und freiem Glutathion hydrolysiert [Gl. (2)].

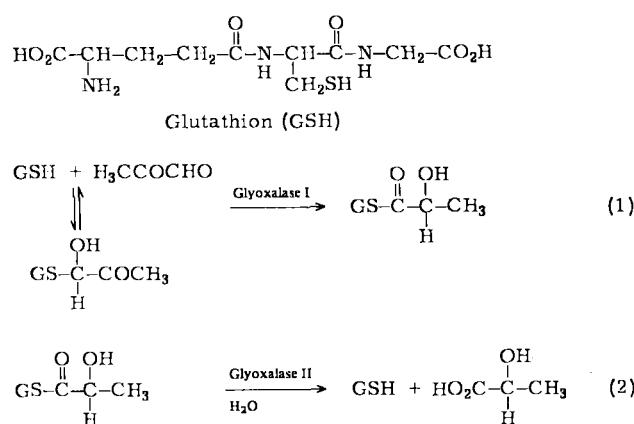
Wie *Walsh*<sup>[4]</sup> bemerkte, müßten zur direkten Oxidation des Aldehyds zwei Elektronen aus der schon stark elektrophilen Gruppe entfernt werden. Nach vorgesetzter Bil-

dung des Monohemithioacetals werden die beiden Elektronen aus einem nicht-elektrophilen Zentrum entfernt, wobei ein Thiolester mit hohem Gruppenübertragungspotential entsteht. Zweifellos erleichtert dies die von der Glyoxalase II katalysierte Hydrolyse. Es ist jedoch auch ein Mechanismus denkbar, der vom hydratisierten Aldehyd (der hauptsächlich vorliegenden Form) direkt zur Milchsäure führt [Gl. (3)].



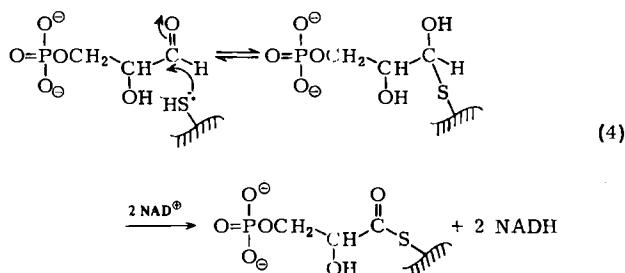
Die Beteiligung von zwei Enzymen und Glutathion sowie die Bildung eines freien Thioesters als Zwischenprodukt bieten wahrscheinlich metabolische Vorteile und ermöglichen eine bessere Regulation. Die Reaktionsfolge ist von den zellulären GSH-Konzentrationen, von der Aufbau- und Abbaugeschwindigkeit der Enzyme etc. abhängig. Nach *Gillespie*<sup>[7]</sup> könnte auch das Zwischenprodukt *S*-Lactoylglutathion wichtige biologische Eigenschaften haben.

Obwohl man die Glyoxalase-Reaktion schon lange kennt, ist noch vieles an ihr rätselhaft. Welche physiologische Bedeutung hat sie und welcher Wirkungsmechanismus liegt vor? Auch die Natur des Substrats der Glyoxalase I ist nicht endgültig geklärt. Das Substrat könnte entweder das Hemithioacetal sein, das aus GSH und  $\text{CH}_3\text{COCHO}$  nichtenzymatisch gebildet wird, oder freies GSH und  $\text{CH}_3\text{COCHO}$ , die in zufälliger oder geordneter Weise mit dem Enzym reagieren. Das Interesse an Glyoxalase I hat zwei Ursachen: 1) Es wird als Zielenzym für Cancerostatica angesehen, da seine Inhibitoren oft cytotoxisch wirken und auch *in vivo* eine tumorhemmende Aktivität aufweisen. 2) Der Wirkungsmechanismus von Glyoxalase I erinnert an die Reaktionsfolge der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase<sup>[5]</sup>; Cys-149 dieses Enzyms bildet mit Glycerinaldehyd-3-phosphat ein Hemithioacetal.

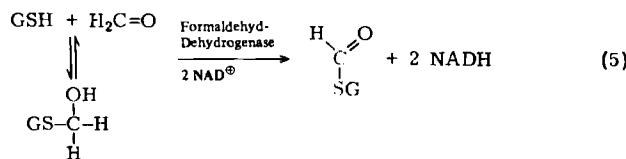


\* Dr. K. T. Douglas  
Department of Chemistry, University of Essex  
Wivenhoe Park, Colchester, Essex CO4 2SQ (Großbritannien)  
S. Shinkai  
Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering,  
University of Nagasaki  
Nagasaki 852 (Japan)

tal, das danach zu einem enzymgebundenen Thiolester (mit  $\text{NAD}^{\oplus}$ ) oxidiert wird [Gl. (4)].



Mit Glyoxalase I verläuft der Redoxprozeß intramolekular (durch eine 1,2-Wasserstoffverschiebung), im Fall der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase jedoch intermolekular (durch Hydridtransfer auf  $\text{NAD}^{\oplus}$ ). Die glutathionabhängige Formaldehyd-Dehydrogenase überführt Formaldehyd in einen energiereichen Glutathion-



thiolester<sup>[6]</sup> der Ameisensäure durch eine intermolekulare ( $\text{NAD}^{\oplus}$ -abhängige) Redoxreaktion des Glutathionhemithioacetals [Gl. (5)].

## 2. Biologische Grundlagen

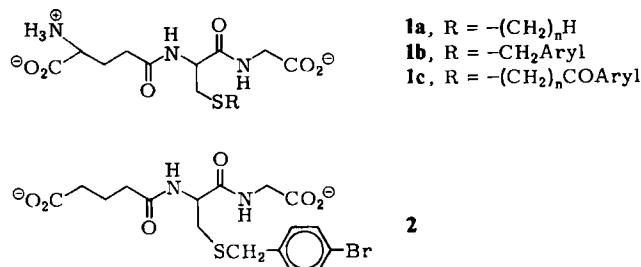
### 2.1. Hypothesen, warum Inhibitoren der Glyoxalase I cancerostatisch sein könnten

Glyoxalase I soll eine Rolle bei der Histaminfreisetzung spielen<sup>[7a]</sup>, für die Mikrotubuli-Polymerisation wichtig sein<sup>[7b]</sup> und am Schutz gegen Darmbakterien beteiligt sein<sup>[8]</sup>; da Methylglyoxal das Desaminierungsprodukt von Aminoaceton ist, wurde auch ein metabolischer Cyclus unter Beteiligung von Glyoxalase I für den Abbau von Glycin und Threonin postuliert<sup>[9]</sup>; möglicherweise hat das Enzym auch eine Aufgabe bei der Häm-Biosynthese<sup>[10]</sup>. All dies ist hier nicht von Belang.

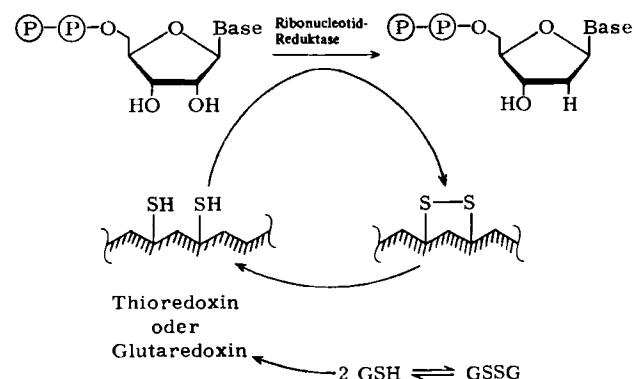
Eine tumorhemmende Aktivität von Inhibitoren der Glyoxalase I wurde etwa gleichzeitig von *Vince* und *Wadd*<sup>[11]</sup> sowie von *Szent-Györgyi*<sup>[12]</sup> vermutet. Da Glyoxalase I in Gegenwart von GSH, das zur Zellteilung nötig ist<sup>[16]</sup>, das cytotoxische Methylglyoxal schnell in das nicht-toxische Lactat umwandelt<sup>[13-15]</sup>, könnten, so *Vince* und *Wadd*<sup>[11]</sup>, Inhibitoren der Glyoxalase I die Methylglyoxalkonzentration in Tumorzellen erhöhen und dadurch das Zellwachstum hemmen. *Szent-Györgyi* vertrat die Ansicht, daß für normales Zellwachstum ein empfindliches Gleichgewicht zwischen wachstumshemmenden (Methylglyoxal) und -fördernden Kräften (Glyoxalase I) wichtig sei. Aufgrund dieser einfachen Annahme sollten Inhibitoren der Glyoxalase I cancerostatisch sein. Heute weiß man, daß die Situation wesentlich komplizierter ist.

### 2.2. Beispiele für Inhibitoren der Glyoxalase I, die cytotoxisch oder cancerostatisch sind

Schon früh wurden Substratanaloga der Glyoxalase I hergestellt und ihre Wirkung untersucht. So wurde die große Gruppe der *S*-substituierten Glutathione 1 synthetisiert, die sich als starke Inhibitoren der Glyoxalase I erwiesen<sup>[1, 17-19]</sup>. Viele dieser Verbindungen sind cytotoxisch für L1210-Leukämie- und KB-Zellen (Zellkulturen)<sup>[20]</sup>. Außerdem wurden einige *S*- und *N*-substituierte Cysteinylglycin-Derivate getestet<sup>[21]</sup>. Alle Verbindungen wurden *in vivo* rasch inaktiviert<sup>[21, 22]</sup>.

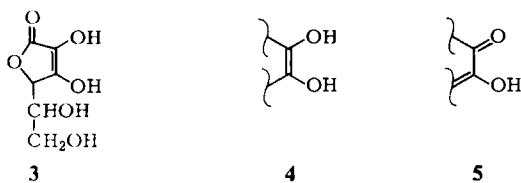


Verbindung 2, die durch  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidase nicht gespalten wird, schien vielversprechende biologische Eigenschaften zu besitzen. Obwohl *S*-(*p*-Brombenzyl)glutathion ein starker Inhibitor der Glyoxalase I ist (besonders für das Enzym in menschlichen Erythrocyten), ist unklar, ob dies die Ursache für die tumorhemmende Aktivität dieser und analoger Verbindungen ist. So inhibieren Glutathion-Derivate auf komplizierte Weise die Ribonucleotid-Reduktase<sup>[23, 24]</sup>, die die Bildung von Desoxyribonucleotiden aus Ribonucleotiden durch Reduktion der Furano-sereste katalysiert (siehe Schema 1); diese Reaktion kann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der DNA-Replikation in vielen Systemen sein. Es ist somit möglich, daß die Inhibierung dieses lebensnotwendigen Prozesses die tumorhemmende Wirkung hervorruft. Eines der Di-thiol-Donorproteine, das Glutaredoxin, wird durch eine Reaktionsfolge regeneriert, an der auch Glutathion beteiligt ist, und so war es nicht überraschend, daß Glutathion-Derivate, die am Schwefel- und/oder Stickstoffatom blockiert sind, die Donoraktivität des Glutaredoxins bei der Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* hemmten<sup>[23]</sup>. Analoga des oxidierten Glutathions inhibieren die Ribonucleotid-Reduktase aus *E. coli* noch stärker<sup>[24]</sup>.

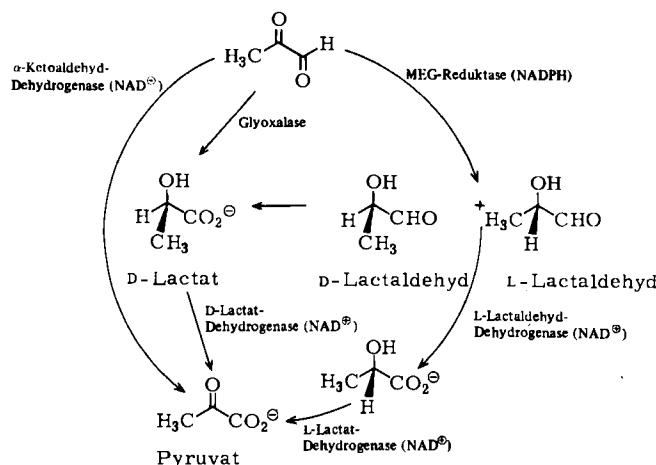


Schema 1. Mechanismus der Umwandlung von Ribonucleotiden in Desoxyribonucleotide, die durch das Enzymsystem Ribonucleotid-Reduktase katalysiert wird.

Reduktionsmittel wie Ascorbinsäure 3, die mit Methylglyoxal strukturell verwandt sind, verhindern das Wachstum des Sarcoma 180; sie sind zugleich starke Inhibitoren der Glyoxalase I<sup>[25]</sup>. Die Inhibierung der Glyoxalase I durch 3 und andere Verbindungen, die eine Endiol- (4) oder *paene*-Endiol-Struktur (5)<sup>[1]</sup> aufweisen, wurde deren Ähnlichkeit mit einem Teil des vermeintlichen Übergangszustandes des Substrats der Glyoxalase-I-Reaktion zugeschrieben<sup>[26]</sup>. Solche Verbindungen sind gute Chelatbildner, und die Hemmung der Glyoxalase I, eines Zn-haltigen Metalloenzym, könnte teilweise oder ganz auf dieser Eigenschaft beruhen<sup>[27]</sup>.



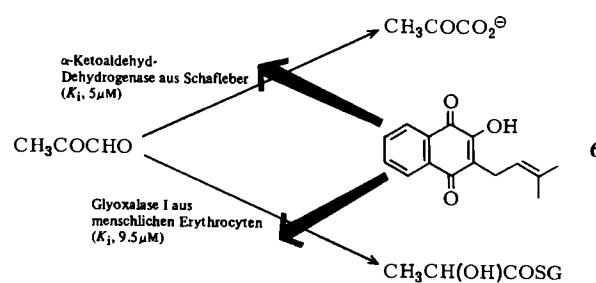
Methylglyoxal wird noch durch andere Reaktionen entgittert; alle Wege sind in Schema 2 zusammengefaßt. Die direkte (NAD-abhängige) Oxidation zu Pyruvat durch die  $\alpha$ -Ketoaldehyd-Dehydrogenase findet sowohl in Säugetierzellen<sup>[27]</sup> (einschließlich einiger Tumorzellen) als auch in Bakterien statt. Der NADPH-abhängige Weg über Lactaldehyd wurde in Bakterien beobachtet<sup>[28]</sup>. Um die zelluläre  $\alpha$ -Ketoaldehyd-Konzentration im Säugetierorganismus zu erhöhen, muß sowohl der Glyoxalase-I- als auch der  $\alpha$ -Ketoaldehyd-Dehydrogenase-Entgiftungsweg blockiert werden; diese Notwendigkeit wurde erstmals von *Vince* und *Daluge*<sup>[20]</sup> betont.



**Schema 2.  $\alpha$ -Ketoaldehyd-Katabolismus.**

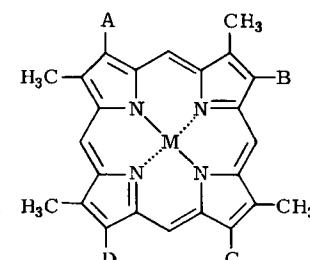
Lapachol **6** und einige Derivate sind tumorhemmend. Wir konnten vor kurzem zeigen, daß Lapachol nicht nur die Glyoxalase I aus menschlichen Erythrocyten inhibiert, sondern auch die  $\alpha$ -Ketoaldehyd-Dehydrogenase aus Schafleber.

Lapachol greift auch an anderer Stelle in den Stoffwechsel ein<sup>[29]</sup>. Als Hydroxychinon entkoppelt es die oxidative

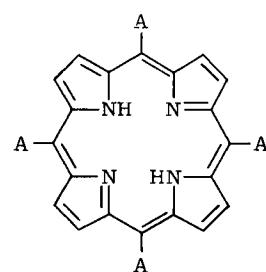


Phosphorylierung (wahrscheinlich auf ähnliche Weise wie 2,4-Dinitrophenol). Es inhibiert zudem die Succinat-Dehydrogenase und die  $3\alpha$ -Hydroxysteroid-abhängige Transhydrogenase. Vor kurzem wurde vorgeschlagen, daß seine antineoplastische Wirkung auf der Inhibierung der L-Dihydroorotat-Dehydrogenase und damit der Pyrimidin-Biosynthese beruht.

Die cytotoxische Wirkung des Methylglyoxals wird durch gleichzeitige Gabe von *S*-blockiertem Glutathion als Glyoxalase-I-Inhibitor potenziert<sup>[20]</sup>. Yamamoto<sup>[30,31]</sup> berichtete, daß die Bindung von Phytochlorin-Natrium (einem Porphyrin) an Krebszellen *in vitro* bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht durch Methylglyoxal verstärkt wird. Methylglyoxal senkte zudem die Tumorbildungshäufigkeit auf ein Drittel<sup>[30,31]</sup>. Yamamoto schlug angesichts des Synergismus von  $\alpha$ -Ketoaldehyd und Porphyrin bei der Teilung von Krebszellen eine Beteiligung des Glyoxalase-Systems bei der Mitose vor. Wir beobachteten eine starke



	A,B	C,D	„M“
Hämin	$\text{CH}=\text{CH}_2$	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2^\ominus$	$\text{FeC}_5\text{H}_7\text{O}_4^\ominus$
Protoporphyrin IX	$\text{CH}=\text{CH}_2$	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2^\ominus$	$2\text{H}$
Hämatoporphyrin	$\text{CII}(\text{OH})-\text{CH}_3$	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2^\ominus$	$2\text{H}$
Coproporphyrin III	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2^\ominus$	$(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2^\ominus$	$2\text{H}$



*meso*-Tetra(4-*N*-methylpyridyl)porphin(TMPyP), A = 

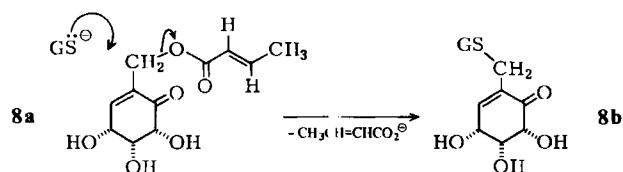
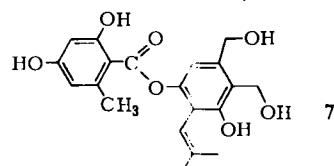
*meso*-Tetra(4-carboxyphenyl)porphin(TCCP), A = 

*meso*-Tetra(4-sulfonatophenyl)porphin(TPPS4), A = 

Abb. 1. Porphyrin-Inhibitoren der Glyoxalase I.

Hemmung der Glyoxalase I aus vielen Spezies durch eine Reihe von Porphyrinen (siehe Abb. 1)<sup>[32,33]</sup> und konnten Yamamatos Ansicht bestätigen. Da die Hemmung bei niedrigerem pH-Wert stärker ist und da Krebszellen – besonders nach Glucosegaben – niedrigere pH-Werte als normales Gewebe aufweisen<sup>[34]</sup>, wird Glyoxalase I durch Porphyrine in Krebszellen stärker inhibiert als in normalen Zellen; dieser Effekt trägt auch zur selektiven Aufnahme von einigen Porphyrinen durch Krebszellen bei<sup>[32]</sup>.

Umezawa et al. fanden im Kulturmedium eines Pilzes einen starken kompetitiven Inhibitor ( $K_i = 4.6 \cdot 10^{-6}$  M) der Glyoxalase I, bei dem es sich um die Polyhydroxyverbindung 7 handelt<sup>[35]</sup>. 7 hemmt das Wachstum von Yoshida-Sarcoma-Zellen, ist aber in vivo unwirksam, wahrscheinlich weil die Esterbindung leicht gespalten wird<sup>[36]</sup>. Man

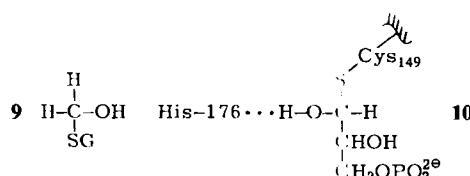


weiß jedoch heute, daß 7 eine Reihe von Enzymen inhibiert<sup>[37]</sup>. Ein weiterer Inhibitor der Glyoxalase I aus Actinomyceten<sup>[38,39]</sup> ist der Crotonsäureester 8a, der sehr schnell mit Glutathion zu 8b reagiert. 8 ist kaum antibakteriell, hemmt aber das Wachstum von Yoshida-Sarcoma-Zellen in Gewebekultur. Das Wachstum von Asciten und soliden Tumoren des Ehrlich-Carcinoms konnte in Mäusen durch tägliche intraperitoneale Injektion von 8 gestoppt werden. Außerdem wurde die Überlebenszeit von Mäusen mit Leukämie L1210 verlängert<sup>[38,39]</sup>.

### 3. Chemische Grundlagen

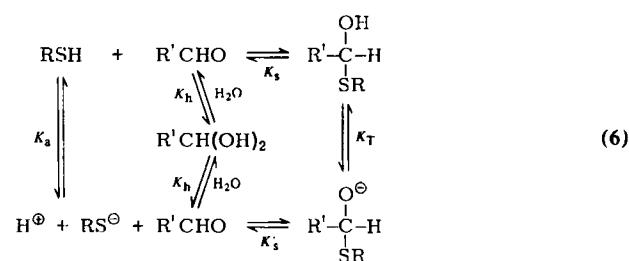
#### 3.1. Die Thiol-Aldehyd-Reaktion

Schon vor 100 Jahren wurde über die Reaktion von Thiolen mit Aldehyden berichtet<sup>[40]</sup>. Die Substrate für Glyoxalase I [Gl. (1)] und Formaldehyd-Dehydrogenase (9)<sup>[41,42]</sup> werden in einer solchen Reaktion gebildet. Außerdem entstehen Zwischenprodukte der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Reaktion (10)<sup>[43]</sup> auf diese Wei-



se. Die Hemmung einiger Thiol-Proteasen durch Aldehyde beruht gleichfalls auf dieser Reaktion. Die Verhältnisse sind kompliziert, da a) Hydratormen des Aldehyds<sup>[44]</sup>, b)

Ionisierung des Thiols<sup>[44,48]</sup> und c) Ionisierung der OH-Gruppe des Monohemithioacetals<sup>[41,48]</sup> berücksichtigt werden müssen. Gleichung (6) zeigt deshalb nur ein vereinfachtes Schema ( $K_s$  = wahre Assoziationskonstante von RSH und Aldehyd;  $K_a$  = Säurekonstante des Thiols).



Da die  $pK_T$ -Werte (für die Dissoziationskonstante der OH-Gruppe des Hemithioacetals) beim verwendeten Aldehyd größer als 12 waren, ergibt sich die gemessene Gleichgewichtskonstante ( $K^{\text{obs}}$ ) für die Hemithioacetalbildung nach Gleichung (7).

$$K^{\text{obs}} = K_s / (1 + K_a / H^{\oplus}) (1 + K_h) \quad (7)$$

Anhand dieser Gleichung wurden die Auswirkungen von Strukturveränderungen des Aldehyds auf  $K_s$  für Reaktionen mit Glutathion und 4-Nitrothiophenol bestimmt<sup>[44]</sup>. Man würde erwarten, daß sterische Effekte bei der Reaktion des Aldehyds mit dem „großen“ Glutathion ausgeprägter sind als bei der Reaktion mit Wasser, aber das Hydratations- und Hemithioacetal-Gleichgewicht veränderten sich in gleicher Weise (lg  $K_s$  korreliert gut mit lg  $K_h$ ). Aldehyde mit ionischen Substituenten (z. B. Glycerinaldehyd-3-phosphat) zeigten keine Besonderheit, so daß angenommen werden kann, daß ionische Wechselwirkungen zwischen GSH und Aldehyd zu der Hemithioacetal-Stabilität nicht beitragen<sup>[44]</sup>.

Es scheint, daß sowohl  $K_s$  als auch die  $\sigma^*$ -Konstante für aliphatische Aldehyde unabhängig vom Thiol ist<sup>[44]</sup>. Das Hemithioacetal aus Aldehyden (einschließlich Methylglyoxal) und Glutathion ist um 4.3 ( $\pm 0.2$ ) kcal mol<sup>-1</sup> stabiler als das entsprechende Hydrat<sup>[44]</sup>. Der  $pK_a$ -Wert des Hemithioacetals ( $pK_T$ ) ist nahezu unabhängig vom  $pK_a$ -Wert des Thiols [Gl. (8)]<sup>[44,47]</sup>.

$$pK_T = 0.16 pK_a + 11.1 \quad (8)$$

Tabelle 1 zeigt eine Reihe experimenteller Gleichgewichtskonstanten ( $K^{\text{obs}}$ ) für die Hemithioacetalbildung aus verschiedenen  $\alpha$ -Ketoaldehyden und *N*-substituierten Glutathionen. Normalerweise werden enzymatische Untersuchungen der Glyoxalase I bei pH 6.6 vorgenommen, so daß – da bei diesem pH-Wert die Thiol-Ionisierung keine Rolle spielt –  $K^{\text{obs}}$  wenig, wenn überhaupt korrigiert werden muß<sup>[44,48]</sup>. Erst bei höherem pH-Wert muß dieser Effekt berücksichtigt werden. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß das Gleichgewicht sogar für GSH auf der Hemithioacetalseite liegt. Tatsächlich wurden die Hemithioacetale einiger  $\alpha$ -Ketoaldehyde isoliert<sup>[49,50]</sup>.

Für Acetaldehyd ist die Gleichgewichtskonstante ( $K$ ) vom  $pK_a$ -Wert des Thiols unabhängig<sup>[45,46]</sup>. Die  $K$ -Werte

Tabelle 1. Gleichgewichtskonstanten ( $K^{\text{obs}}$ ) für die Hemithioacetalbildung aus einem Aldehyd (RCHO) und Glutathion;  $K^{\text{obs}}$  ist definiert als  $[\text{Hemithioacetal}]/[\text{RCHO}][\text{GSH}]$ .

R	$K^{\text{obs}} [\text{M}^{-1}]$	Lit.
H	667 [a]	[41]
CH <sub>3</sub> CO	200 ± 10 [b]	[44]
	333 [c]	[54, 17]
PhCO	603 ± 31 [d]	[48]
	625 ± 75 [e]	[48]
X-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -CO		
X = H	1667 [f]	[54]
p-CH <sub>3</sub>	909 [f]	[54]
p-OCH <sub>3</sub>	714 [f]	[54]
p-Br	667 [f]	[54]
p-Cl	278 [f]	[54]
p-Ph	1124 [f]	[54]
m-OCH <sub>3</sub>	833 [f]	[54]
p-NO <sub>2</sub>	833 [f]	[54]
p-OH	1075 [f]	[54]

[a] Bei pH 8.0. [b] Für Thiol-Ionisierung korrigiert. [c] Daten aus [17] bei pH 6.6; Daten aus [54] bei pH 7.0; der Wert war zwischen pH 5 und 9 nicht pH-abhängig. [d] Gemessen bei 280 nm, pH 6.67. [e] Gemessen bei 250 nm, pH 6.67; der Wert nimmt sigmoidal mit steigendem pH-Wert nach Ionisierung ( $pK_{\text{app}} = 9.0$ ) ab. [f] Bei pH 7.0,  $\mu = 0.2$ .

für Phenylglyoxal (bestimmt aus der Sättigungskinetik von Amin-katalysierter Umlagerung des Hemithioacetals zum Thiolester) scheinen jedoch etwas vom  $pK_a$ -Wert des Thiols abzuhängen. Es besteht eine lineare Abhängigkeit des  $K^{\text{obs}}$ -Wertes mit einer Steigung von  $-0.3$  (aus [48]) vom  $pK_a$  des Thiols über etwa drei Einheiten des Thiol- $pK_a$ . Dies ähnelt der Abhängigkeit des  $pK_a$ -Wertes der CH<sub>2</sub>-Brücke in Acetoacetaten 11<sup>[51]</sup> vom  $pK_a$ -Wert der konjugierten Säure der Abgangsgruppe (für Thiole und Phenoole).

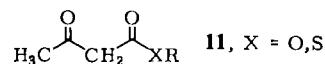
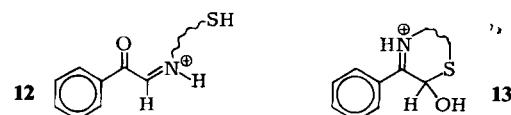


Tabelle 2 faßt die Gleichgewichtskonstanten ( $K^{\text{obs}}$ ) der Reaktionen von  $\alpha$ -Ketoaldehyden mit N-substituierten Glutathionen zusammen. N-Acetylierung scheint demnach den  $K^{\text{obs}}$ -Wert für Methylglyoxal wenig, für Phenylglyoxal kaum und für *p*-Chlorphenylglyoxal gar nicht zu beeinflussen. Im Fall der Phenylglyoxal-Derivate trägt die Bildung einer Schiff-Base zwischen der Aminogruppe des Glutathions und der Aldehyd- oder Ketogruppe (12 bzw. 13, protoniert) nichts bei.



In der Zelle ist die Glutathion-Konzentration sehr hoch (oft  $\geq 10^{-3} \text{ M}$ <sup>[52]</sup>) und die Methylglyoxal-Konzentration niedrig<sup>[53]</sup>, so daß nur sehr wenig dieses elektrophilen Aldehyds frei vorliegt. Schon dieses Gleichgewicht trägt signifikant zur Entgiftung des cytotoxischen Aldehyds bei. Da die Konzentration der Glyoxalase (relativ zu der von GSH) niedrig ist, stellt erst die hohe zelluläre GSH-Konzentration eine Reaktion mit dem  $\alpha$ -Ketoaldehyd sicher.

Die Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion (scheinbar 1. Ordnung) von GSH mit einer Reihe von  $\alpha$ -Ketoalde-

Tabelle 2. Auswirkung des Aminosubstituenten R' auf die Gleichgewichtskonstanten bei der Hemithioacetalbildung.

R'	Aldehyd	CH <sub>3</sub> COCHO	PhCOCHO	<i>p</i> -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> COCHO
			$K^{\text{obs}} [\text{M}^{-1}]$	
H		333 [a]	1667 [b]	625 [b]
CH <sub>3</sub> CO		1000 [b]	1111 [b]	625 [b]
PhCH <sub>2</sub> OCO		571 [c]	—	—

[a] Aus [17] und [67]. [b] Aus [67]. [c] K. T. Douglas, C. D'Silva, unveröffentlicht (pH 6.60, 25°C).

hyden (25 °C, Ameisensäurepuffer, pH 3.0, [GSH]/[ $\alpha$ -Ketoaldehyd] ≈ 12) sind unabhängig von der Struktur des  $\alpha$ -Ketoaldehyds (einschließlich Methylglyoxal und neun Arylglyoxalen)<sup>[54]</sup>. Die Substituenten wirken sich auch auf die Gleichgewichtskonstante kaum aus; ebenso wird die Schwingungsfrequenz der Aldehydcarbonylgruppe bei 1727 cm<sup>-1</sup> kaum beeinflußt; dies gilt nicht für die Ketocarbonylgruppe. Die Geschwindigkeitskonstanten gelten für die Einstellung des Hemithioacetal-Gleichgewichts und sind durch das Hydratations-Gleichgewicht beeinflußt<sup>[54]</sup>.

### 3.2. Modellsysteme zur Untersuchung der Umlagerung von Hemithioacetal zum Thiolester

Die Umlagerung des vom  $\alpha$ -Ketoaldehyd abstammenden Hemithioacetals zum entsprechenden  $\alpha$ -Hydroxythiolester durch Glyoxalase I wurde in mehreren Modellsystemen auch in Abwesenheit des Enzyms beobachtet. In diesem Abschnitt geben wir eine Übersicht über diese Umlagerung und scheinbar analoge Reaktionen (z. B. die Cannizzaro-Reaktion) in Modellsystemen.

Schon viele Systeme wurden als Modell für die Glyoxalase-I-Reaktion herangezogen. Zu diesen gehören Umsetzungen von Glyoxal-Derivaten mit den Franzen-Katalysatoren 2-(Dialkylamino)ethanthonen<sup>[55-60]</sup>, Base-katalysierte Umlagerungen von Hemithioacetalen (aus einfachen Thiolen) mit<sup>[61]</sup> oder ohne<sup>[48, 58, 60]</sup> Katalyse durch Metallionen sowie OH<sup>-</sup>-katalysierte Umlagerungen von Arylglyoxalen zu Mandelaten<sup>[62]</sup> (intramolekulare Cannizzaro-Reaktion<sup>[62-65]</sup>) und Analoga<sup>[66]</sup>.

#### 3.2.1. Modellsysteme zum Studium der Hydrid-Wanderung – Cannizzaro-Typ

Man weiß heute, daß die OH<sup>-</sup>-katalysierte Disproportionierung von Phenylglyoxal zum Mandelat-Ion in wäßrigem Medium über einen internen Hydrid-Transfer im Hydrat-Anion 14 und -Dianion 15 verläuft<sup>[1]</sup>.

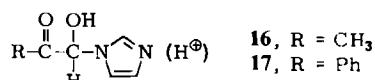


[\*] Kürzlich wurde für die Cannizzaro-Reaktion von Benzaldehyd ein Weg über freie Radikale vorgeschlagen: S. K. Chung, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 480.

Für substituierte Phenylglyoxale liegt die Substituentenkonstante  $\rho$  bei +2.0, der Übergangszustand ist also stark durch Abzug von Elektronen aus der  $\alpha$ -Ketogruppe stabilisiert<sup>[65]</sup>. Die Reaktionsgeschwindigkeit korreliert gut mit der Schwingungsfrequenz der C=O-Gruppe in Nachbarschaft zum freien oder hydratisierten Aldehyd<sup>[65]</sup>.

### 3.2.2. Allgemeine Basekatalyse

In Gegenwart der Basen Imidazol und  $\text{HPO}_4^{2-}$  lagern sich die von Glutathion abstammenden Hemithioacetale des Methyl- und Phenylglyoxals zu entsprechenden *S*-Lactoyl- und Mandeloylglyoxal-thionen um<sup>[58, 61]</sup>. Imidazol bildet mit dem  $\alpha$ -Ketoaldehyd das Addukt 17, das sich wahrscheinlich nicht zum Lactoyl- oder Mandeloylimidazol umlagert<sup>[58]</sup>. Man nimmt an, daß die Umlagerung auf einer



allgemeinen Basekatalyse beruht<sup>[48]</sup>, da in  $\text{D}_2\text{O}$  Deuterium an C-2 der entstehenden  $\alpha$ -Hydroxsäure eingebaut wird<sup>[58]</sup>. Im Gegensatz dazu wird unter Bedingungen der Cannizzaro-Reaktion (starke Base in  $\text{D}_2\text{O}$ ) Methylglyoxal ohne bedeutenden Deuteriumeinbau an C-2 in Lactat überführt. Demnach wird in Abwesenheit von Thiol bei hohem pH-Wert ein Hydrid-Ion übertragen und unter milden Bedingungen bei allgemeiner Basekatalyse (pH 7) in Gegenwart von Glutathion ein Proton<sup>[58]</sup>. Für die Reaktion mit allgemeiner Basekatalyse ergibt sich ein kinetischer Lösungsmittelisotopeneffekt ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ) von  $3.3 \pm 0.5$  für  $\text{CH}_3\text{COCHO}$  und von  $2.3 \pm 0.2$  für  $\text{PhCOCHO}$  bei Vergleich der  $-\text{CDO}$ -Derivate; diese Werte liegen beträchtlich unter denen der  $\text{OH}^\ominus$ -katalysierten Cannizzaro-Reaktion (typisch sind 3.8 und 5.0)<sup>[67]</sup>. Die Autoren vermuteten, daß das Glutathion die Rolle eines kovalent gebundenen Katalysators übernimmt<sup>[58]</sup>; das Schwefelatom macht die  $\alpha$ -C-H-Bindung acider. Für die Deprotonierung müßte dann ein basischer Aminosäurerest im aktiven Zentrum der Glyoxalase I zur Verfügung stehen. Das Metallion diente dieser Hypothese zufolge nur dem Zweck, das Substrat im aktiven Zentrum zu chelatisieren<sup>[58]</sup>.

Die Daten von *Okuyama* et al.<sup>[48]</sup> zeigen, daß die oben genannten Isotopeneffekte, die bei einer bestimmten Thiolkonzentration gemessen wurden, nicht so einfach zu interpretieren sind<sup>[58]</sup>. Für Hemithioacetale aus Phenylglyoxal und  $\beta$ -Mercaptoethanol oder Glutathion weist die Umlagerung zu Thioestern eine hyperbolische Abhängigkeit von der Thiolkonzentration auf. Der Lösungsmittelisotopeneffekt  $k_{\text{H}_2\text{O}}/k_{\text{D}_2\text{O}}$  beträgt für die Umlagerung etwa 1.0, während er für das Gleichgewicht der Thiol-Aldehyd-Reaktion bei 0.38 liegt (über primäre Isotopeneffekte wurde nicht berichtet)<sup>[48]</sup>. Nach den Untersuchungen von *Hall* et al.<sup>[58]</sup> dürfte das Lösungsmittel keine Isotopeneffekte auf das Gleichgewicht der Aldehyd-Thiol-Reaktion ausüben, da sie sich in der Kinetik der Thioesterbildung bemerkbar machen müßten (es wurde nicht angegeben, ob die Experimente zum primären Isotopeneffekt mit  $\text{PhCOCDO}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  oder in  $\text{D}_2\text{O}$  durchgeführt wurden). Die Kinetik beschreibt Gleichung (9)<sup>[48]</sup>, in der  $K_h$  die Bildungskonstante des Hemithioacetals und  $k_{\text{max}}$  die maximale Geschwindig-

keitskonstante der Umlagerungsreaktion bei hohen Thiolkonzentrationen ist<sup>[48]</sup>.

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{max}} \cdot K_h [\text{RSH}]}{(1 + K_h [\text{RSH}])} \quad (9)$$

Bei niedrigen Thiolkonzentrationen wird  $k_h [\text{RSH}] \ll 1$ , und wir erhalten Gleichung (10).

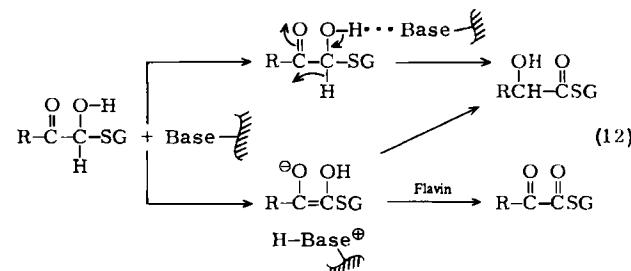
$$k_{\text{obs}} = k_{\text{max}} \cdot K_h [\text{RSH}] \quad (10)$$

Der primäre Isotopeneffekt ( $k_{\text{obs}(\text{H/D})}$ ) (z. B. beim Vergleich  $\text{PhCOCHO}$  in  $\text{H}_2\text{O}$  mit  $\text{PhCOCDO}$  in  $\text{D}_2\text{O}$ ) läßt sich mit Gleichung (11) beschreiben.

$$k_{\text{obs}(\text{H/D})} = k_{\text{max}(\text{H/D})} \cdot K_h(\text{H/D}) \quad (11)$$

Für Phenylglyoxal erhält man bei der Umlagerung einen  $k_{\text{max}(\text{H/D})}$ -Wert von 6.1, wenn für  $k_{\text{obs}(\text{H/D})}$  ein Wert von 2.3 eingesetzt wird (vorausgesetzt, der primäre Isotopeneffekt wird durch das Lösungsmittel nicht verändert) und für  $K_h(\text{H/D})$  ein Wert von 0.38 (vorausgesetzt, der Wechsel von  $\text{PhCOCHO}$  zu  $\text{PhCOCDO}$  beeinflußt den  $K_h$ -Wert nicht so sehr wie der Wechsel von  $\text{H}_2\text{O}$  zu  $\text{D}_2\text{O}$ ). Ein primärer Isotopeneffekt von 6.1 deutet auf einen Wasserstoff-Transfer im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt hin; es läßt sich jedoch nicht zwischen einer Hydrid- und einer Protonen-Wanderung unterscheiden. Das Produkt aus  $\text{PhCOCHO}$  enthält bei Reaktion in  $\text{D}_2\text{O}$  Deuterium in  $\alpha$ -Stellung ( $\text{PhCD(OD)COSR}$ ), was auf eine Protonenübertragung – wie von *Hall* et al.<sup>[58]</sup> vorgeschlagen – hinweist.

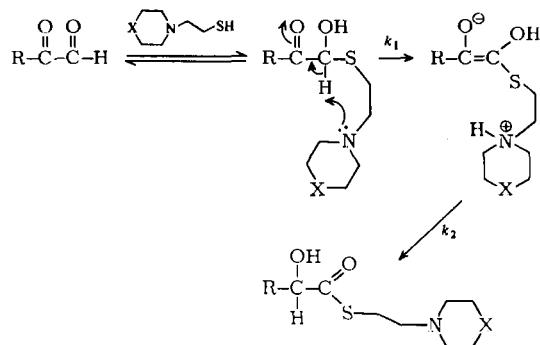
Endiole können oxidativ von Flavinen, die keine guten Hydrid-Acceptoren sind, abgefangen werden<sup>[59]</sup>. Falls also die Reaktion über ein Endiol-Zwischenprodukt verläuft, würde zugesetztes Flavin eine Umlagerung verhindern und eine Oxidation bewirken. In Gegenwart von Tetra-*O*-acetyl-3-methylriboflavin wurde die Umlagerung von Hemithioacetalen zu  $\alpha$ -Hydroxythioestern fast vollständig inhibiert; es entstanden nur  $\alpha$ -Ketosäuren<sup>[59]</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von *Hall* et al.<sup>[58]</sup> weist dieser Befund auf eine Umlagerung über ein Endiolat hin [Gl. (12)].



Kinetische Untersuchungen ergaben, daß die Oxidation durch das Flavin eine Reaktion 0. Ordnung bezüglich Flavin und 1. Ordnung bezüglich der Thiol- und Glyoxal-Derivate ist. Die Reaktionsfolge besteht also aus der geschwindigkeitsbestimmenden Deprotonierung des Hemithioacetals zum Endiolat und anschließender rascher Oxidation durch das Flavin. Der primäre Isotopeneffekt ( $k_{\text{H}}/k_{\text{D}}$ ) von 5–12 für  $\text{C}_6\text{H}_5\text{COCHO}/\text{C}_6\text{H}_5\text{COCDO}$  ist damit in Einklang<sup>[59]</sup>.

### 3.2.3. Intramolekulare Katalyse

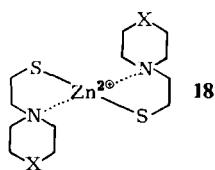
Franzen zeigte schon früh, daß  $\beta$ -aminosubstituierte Thiole effektive Katalysatoren einer intramolekularen Reaktion sind<sup>[55-57]</sup>. Die Kinetik der Franzen-Reaktion – Umsetzung von Glyoxalen mit katalytischen Mengen 2-(Dialkylamino)ethanthylen – wurde erneut untersucht, und man fand, daß die Reaktion über ein zwischen Katalysator und Phenylglyoxal gebildetes Hemithioacetal verläuft<sup>[60]</sup>, welches sich durch allgemeine Basekatalyse zum Thiolester umlagert.



Es wurde vorgeschlagen, daß – wenn  $X = O$  – die intramolekulare Deprotonierung zum Endiolat der geschwindigkeitsbestimmende Schritt sei. Für  $X = CH_2$  war bei  $pH < 8$  der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Deprotonierung zum Endiolat; bei  $pH > 8$  sollte der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Reprotonierung des Endiolats an C-2 ( $k_2$ ) zum Thiolester sein. Verglichen mit der intermolekularen Aminogruppen-Katalyse der Hemithioacetalumlagerung<sup>[48]</sup> zeigt der intramolekulare Prozeß geringe effektive Molaritäten (30 M bei  $X = O$  und 90 M bei  $X = CH_2$ ). Für intramolekulare Vorgänge mit allgemeiner Basekatalyse sind solche niedrigen effektiven Molaritäten häufig<sup>[68]</sup>.

### 3.2.4. Metallionen-Effekte

Schon früh berichteten Hall und Poet von einer wirksamen Katalyse der Umlagerung von Hemithioacetalen zu Thioestern in nichtwässrigen Systemen durch Metallionen<sup>[61]</sup>; in wässrigen Systemen erfolgt keine Katalyse<sup>[58]</sup>. Dieser Befund wurde bestätigt<sup>[60]</sup> und damit erklärt, daß sich das Hemithioacetal wegen der Komplexbildung des Metallions durch das 2-(Dialkylamino)ethanthyd zu **18** nicht bildet.



Die Autoren postulierten aufgrund dieser Ergebnisse<sup>[60]</sup>, daß das aktive Zentrum der Glyoxalase I für eine Metallionen-Katalyse unpolar genug und zudem gegen Wassermoleküle geschützt sei. Zwar trifft es zu, daß das aktive Zentrum der Glyoxalase I eine hydrophobe Tasche<sup>[11, 17, 19-22, 29, 32, 33]</sup> im Bereich der „Endiol“-Stelle (S-

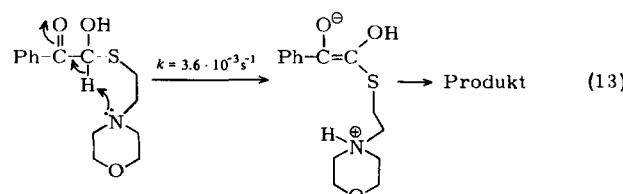
Stelle<sup>[69]</sup>) enthält, doch weiß man, daß das Metallion im aktiven Zentrum der Mn<sup>11</sup>-Glyoxalase I zwei Wassermoleküle bindet. Tatsächlich wurde auch schon ein Mechanismus unter Beteiligung dieser beiden Wassermoleküle vorgeschlagen<sup>[70]</sup>. Es ist jedoch möglich, daß die Komplexbildung der Metallionen durch Glutathion, die die Hemithioacetal-Bildung verhindert, in vivo oder in Gegenwart des Enzymsystems nicht so ins Gewicht fällt wie in den Modellsystemen. Das aktive Zentrum des Enzyms, das das Metallion enthält, bindet ein Diastereomer des Hemithioacetals besser als freies GSH<sup>[95]</sup>. In der Zelle übersteigt die Konzentration an freiem GSH sehr wahrscheinlich die Konzentration an freien zweiwertigen Metallionen bei weitem.

### 3.2.5. Schlußfolgerungen aus den Befunden an Modellsystemen

Während die intramolekulare Cannizzaro-Reaktion der Arylglyoxale mit Natriumhydroxid über einen Hydrid-Transfer erfolgt, verläuft die analoge Umlagerung von Hemithioacetalen aus  $\alpha$ -Ketoaldehyden zu  $\alpha$ -Hydroxythioestern über einen Protonen-Transfer mit Endiolat- und Carbanion-Zwischenprodukt. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt kann die Deprotonierung des Hemithioacetals zum Endiolat oder die Reprotonierung zum  $\alpha$ -Hydroxythioester sein, je nach Art des katalytischen 2-(Dialkylamino)ethanthyols. Katalyse durch Metallionen ist nur in nichtwässrigen Medien bedeutsam. Das Schwefelatom stabilisiert wahrscheinlich das bei der Deprotonierung am C-2 des Hemithioacetals gebildete Carbanion (das Mandeloylimidazol **17** lagert sich z. B. nicht um<sup>[58]</sup>). Diese Deprotonierung wird durch die benachbarte RCO-Gruppe erleichtert.

### 3.3. Die Geschwindigkeit der Glyoxalase-I-Reaktion

Die  $v_{max}$ -Werte der Glyoxalase I sind speziesabhängig; die Art des  $\alpha$ -Ketoaldehyds hat keinen Einfluß. Für Methylglyoxal liegt der  $k_3$ -Wert (die Wechselzahl) der Glyoxalase I aus Rattenleber bei  $2 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ <sup>[71]</sup> und für das Enzym aus menschlichen Erythrocyten bei  $1 \cdot 10^3 \text{ s}^{-1}$ <sup>[72]</sup>. In einem Modellsystem, in dem das Hemithioacetal aus Phenylglyoxal und *N*-(2-Mercaptoethyl)morpholin gemäß Gleichung (13) zum entsprechenden Thioester der Mandelsäure umgelagert wurde, betrug  $k_3 3.6 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .



Auch wenn sich die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte unterscheiden, ist die enzymatische Reaktion im unimolekularen Schritt mindestens  $10^6$ mal schneller als die Modellreaktion. Der Vergleich ist nur dann sinnvoll, wenn sowohl die Enzym- als auch die Modellreaktion über das Endiolat verlaufen, was jedoch wahrscheinlich ist. Vergleicht man die Geschwindigkeitskonstanten der bimolekularen Schritte der Glyoxalase-I-Reaktion ( $k_{cat}/K_m$  für

Glyoxalase I<sup>[71]</sup> ( $4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) und der *N*-Methylmorpholin-katalysierten Umlagerung<sup>[48]</sup> des Hemithioacetals aus Phenylglyoxal und 2-Mercaptoethanol zum Mandelsäurethiolester ( $k_B = 4.5 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ), dann ist die Geschwindigkeit der Glyoxalase I  $10^{10}$ mal höher – sie ist also ein enorm wirkungsvoller Katalysator.

## 4. Mechanismus der Enzymreaktion

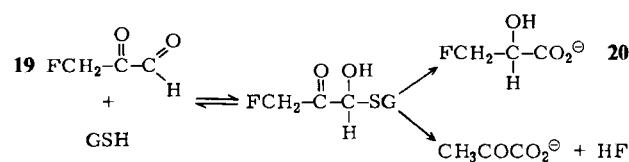
### 4.1. Protonenaustausch

Ist das Hemithioacetal das Substrat für das Enzym, so verläuft die Reaktion entweder über eine Hydrid- oder eine Protonenübertragung. In der Organischen Chemie wird normalerweise durch einfache Markierungsexperimente zwischen diesen beiden Möglichkeiten unterschieden: Liegt eine Hydridübertragung vor, so wird kein Wasserstoffisotop aus einem markierten Lösungsmittel in das Reaktionsprodukt eingebaut, andernfalls ist das Produkt isotopenmarkiert. Bei Enzymreaktionen ist die Situation komplizierter: Enzyme können im Innern kryptische Basen enthalten, die vor einem Protonenaustausch mit dem Lösungsmittel entweder durch das fest gebundene Substrat oder aufgrund der Enzymkonformation vollständig geschützt sind. Zusätzliche Schwierigkeiten ergeben sich für nur schwach saure Substrate wie C–H-Säuren. Die Austauschgeschwindigkeit kann dann am Neutralpunkt sehr gering sein. Findet also bei Enzymkatalyse kein Protonenaustausch statt, so ist das allein noch kein Beweis für eine Hydridübertragung.

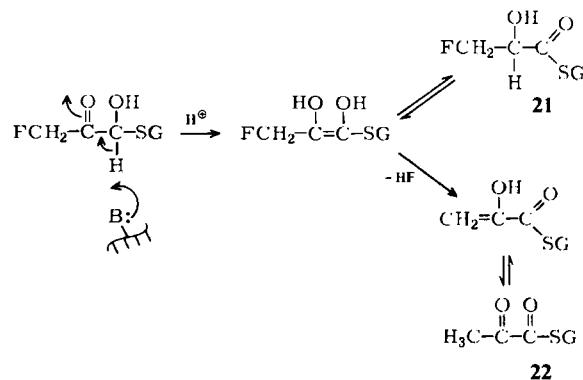
Bis vor kurzem vermutete man, daß die Glyoxalase-I-Reaktion unter Hydridübertragung verläuft, da fast kein Deuterium (maximal 3%)<sup>[55]</sup> oder Tritium (4%)<sup>[73]</sup> in das Produkt Lactat eingebaut wurde. Nach Zusatz von Glyoxalase II, die das anfangs gebildete *S*-Lactoylglutathion spaltet<sup>[74]</sup>, konnte vor kurzem bei hohen Temperaturen eingebautes Deuterium durch NMR-Messungen gefunden werden (ca. 15% bei 25°C und 22% bei 35°C). Weder Milchsäure noch *S*-Lactoylglutathion baut unter diesen Bedingungen Deuterium ein. Auch Rose<sup>[73]</sup> fand keinen Deuteriumeinbau aus dem Lösungsmittel in *S*-Lactoylglutathion. Mittlerweile wurde jedoch berichtet, daß Glyoxalase I aus menschlichem Erthrocyten einen H/D-Austausch an der C–H-Gruppe in *S*-Lactoylglutathion effektiv katalysiert<sup>[78]</sup>. Auch für Glyoxalase I aus Hefe wurde bei Verwendung von Phenylglyoxal/D<sub>2</sub>O oder [1-D]-Phenylglyoxal/H<sub>2</sub>O ein H/D-Austausch festgestellt<sup>[74]</sup>. Falls bei der Glyoxalase-I-Reaktion wirklich ein Isotopeneinbau – besonders bei hohen Temperaturen<sup>[75]</sup> – stattfindet, muß das Enzym eine geschützte Base enthalten und eine Protonenübertragung vorliegen<sup>[9]</sup>. Bei der Glyoxalase-I-katalysierten Bildung von Fluorlactat aus Fluormethylglyoxal (sowohl [1-H] als auch [1-D]) fand nahezu kein H/D-Austausch statt<sup>[77]</sup>.

Kozarich et al.<sup>[78]</sup> verwendeten Fluormethylglyoxal 19 als Substrat für Glyoxalase I aus Hefe; neben dem norma-

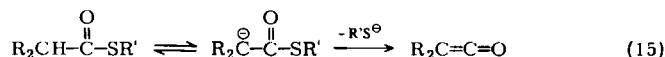
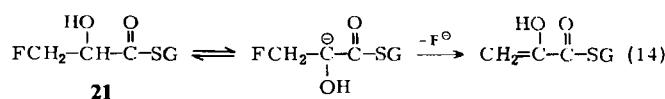
len Produkt Fluorlactat 20 entsteht durch Eliminierung von HF auch Pyruvat.



Ein Teil des enzymatisch gebildeten Endiolats wird normal an C-2 reprotoniert, ein anderer Teil wird durch Eliminierung von Fluorid in das Enol von *S*-Pyruvoylglutathion<sup>[78]</sup> umgewandelt. Übereinstimmend damit entstehen gleiche Anteile Fluorid-Ionen und Pyruvat.



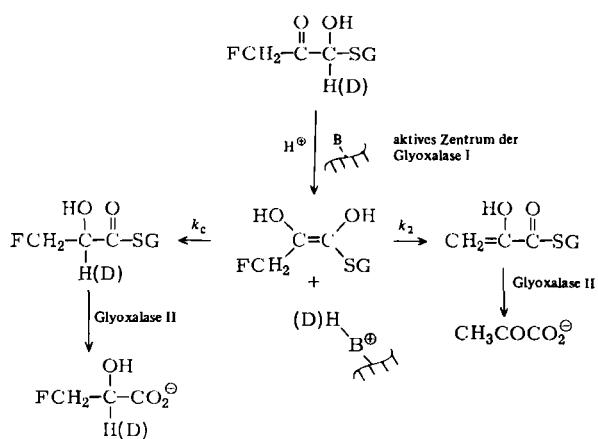
Schwerer zu erklären ist die Beobachtung, daß die Thioesterbildung (Nachweis bei 240 nm) lange vor der HF-Eliminierung abgeschlossen ist. Während die Bildung von 21 von der HF-Eliminierung unabhängig sein könnte, müßte die von 22 damit einhergehen (oder gar langsamer sein, wenn die Keto-Enol-Umwandlung langsam ist). In einer Fußnote weisen die Autoren auf die Möglichkeit hin<sup>[78]</sup>, daß *S*-Pyruvoylglutathion zufällig durch eine Enzym-katalysierte HF-Eliminierung auch aus 21 erhalten werden könnte (nicht unbedingt über ein Endiol). Die Reversibilität<sup>[72]</sup> der Glyoxalase-I-Reaktion und der Austausch des Lactat-Wasserstoffatoms<sup>[76]</sup> (der beim Fluorlactat 20 leichter erfolgen sollte) im *S*-Lactoylglutathion durch Glyoxalase I sprechen für diese Möglichkeit. Dieser „zufällige“ Base-Effekt der Glyoxalase I würde auch den geringen Isotopeneinbau erklären. Es ist möglich<sup>[77]</sup>, daß *S*-(Fluorlactoyl)glutathion 21 in einer nicht-enzymatischen β-Eliminierung regiert [Gl. (14)]. Das α-Wasserstoffatom von Thioestern ist acid; Deprotonierungen sind bekannt, führen jedoch meistens zu Thioleliminierung<sup>[79-82]</sup> [Gl. (15)].



Chari und Kozarich<sup>[77]</sup> schlugen vor, daß der enzymatische Prozeß aus einer Hydridübertragung und einer Folgereaktion mit der „zufälligen“ Base im aktiven Zentrum be-

[\*] Wie W. P. Jencks betonte, paßt der Austausch bei höheren Temperaturen auch in das Konzept einer langsam austauschenden Base, die nicht besonders gut von ihrer Umgebung abgeschirmt ist. Siehe W. P. Jencks: *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, London 1969.

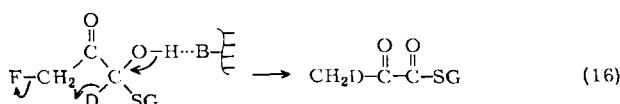
stunde. Die „zufällig“ vorhandene Base könnte sich auf den Protonenaustausch des *S*-Lactoylglutathions mit dem Lösungsmittel oder die Eliminierung des Fluorid-Ions aus dem *S*-(Fluorlactoyl)glutathion auswirken. In jedem Fall wäre die Freisetzung des Produktes durch das Enzym die konkurrierende Reaktion. Die Autoren definierten als „Gesamtfluor“ die aus dem System Fluormethylglyoxal/GSH durch Glyoxalase I und II freigesetzten Fluorid-Ionen<sup>[77]</sup>. Sie untersuchten dann die Auswirkungen einer Deuteriummarkierung an C-1 des Fluormethylglyoxals: Wenn statt [1-H]-[1-D]-Fluormethylglyoxal eingesetzt wurde, stieg der Gesamtfluor-Wert (für Glyoxalase aus einer Vielzahl von Spezies) signifikant an. Die Beobachtung lässt sich nach *Chari* und *Kozarich* nur durch einen Endiol-Mechanismus erklären, wie er in Schema 3 skizziert ist<sup>[77]</sup>.



Schema 3.

Ein primärer Isotopeneffekt bei der Bildung des Endiols würde eine Verzweigung der Reaktion zu *S*-(Fluorlactoyl)glutathion und *S*-Pyruvylglutathion nicht beeinflussen. Der H/D-Austausch zwischen dem Lösungsmittel und der Base im aktiven Zentrum verläuft langsam; die Geschwindigkeit der Fluorid-Eliminierung  $k_e$  sollte unabhängig davon sein, ob sich Deuterium oder Wasserstoff an der Base des aktiven Zentrums befindet. Die normale Substratumbwandlung zu *S*-(Fluorlactoyl)glutathion ( $k_c$ ) verlangt eine Reprotonierung an C-2 durch die protonierte Base; bei diesem Schritt würde sich der primäre Isotopeneffekt auswirken. Eine Erhöhung des Anteils an Fluorid-Eliminierung für das Deutero-Substrat wäre die Folge. Hydridübertragung<sup>[77]</sup> ließe den umgekehrten Effekt erwarten.

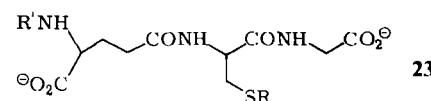
Beschreibt man wie in Gleichung (16) die Fluorid-Eliminierung als Hydrid(oder Deuterid)übertragung, dann wird sowohl die normale Substratumbwandlung (Hydridübertragung auf C-2) als auch die Fluorid-Eliminierung (Hydridübertragung auf C-3) von einem wenn auch anderen primären Isotopeneffekt beeinflusst. Bei diesem Mechanismus müsste jedoch bei Deuteriummarkierung des Substrats die Methylgruppe des Pyruvats Deuterium enthalten, vorausgesetzt, Pyruvylglutathion und Pyruvat erfahren unter den Reaktionsbedingungen keinen H/D-Austausch an C-3.



Die Flavin-Abfangreaktion des Endiolats bei der nicht-enzymatischen Umlagerung von Hemithioacetalen zu  $\alpha$ -Hydroxythioestern konnte vor kurzem auch bei der Glyoxalase-I-katalysierten Umsetzung angewendet werden<sup>[83]</sup>. Flavine reagieren nicht mit Hydrid-Ionen; die wahrscheinlichste Erklärung für die Flavin-Reduktion ist deshalb ein Endiolat-Zwischenprodukt. Unklar bleibt jedoch, ob dieses am Enzym gebunden oder frei reagiert.

## 4.2. Die Funktion des Metallions im aktiven Zentrum und die Enzymflexibilität

Früher nahm man an, daß Glyoxalase I  $Mg^{2+}$ -abhängig sei<sup>[84]</sup>; heute ist klar<sup>[85,86]</sup>, daß es sich bei den Enzymen aus Hefe und Säugern um Zn-Metalloenzyme handelt. Glyoxalase I aus Hefe ist – im Gegensatz zum Säger-Enzym – für Metallaustausch-Untersuchungen ungeeignet<sup>[84–90]</sup>. Das  $Zn^{2+}$ , das sich im aktiven Zentrum befindet, wurde für spektroskopische Untersuchungen gegen  $Mn^{2+}$  und  $Co^{2+}$  ausgetauscht<sup>[70,76,91]</sup>. Durch Hochauflösungs-NMR-Untersuchungen des  $Mn^{2+}$ -Enzyms mit dem gebundenen Produkt *S*-Lactoylglutathion und dem kompetitiven Inhibitor *S*-Acetonylglutathion konnte gezeigt werden, daß in diesen Komplexen das Sauerstoffatom der Lactoyl- und Acetonylgruppe nicht in der ersten Koordinationssphäre des Metallions liegen<sup>[76]</sup>. Die Struktur des Enzym/Produkt- oder Enzym/Inhibitor-Komplexes muß jedoch der des Enzym/Substrat-Komplexes oder des Komplexes irgendeines energiereichen Zwischenproduktes (z. B. Endiol) mit dem Enzym nicht unbedingt ähnlich sein. Glyoxalase I hat eine flexible Konformation. Fluoreszenzuntersuchungen ergaben, daß das native Enzym bei Bindung des starken kompetitiven Inhibitors *S*-(*p*-Brombenzyl)glutathion die Konformation ändert<sup>[89]</sup>; auch das EPR-Spektrum des  $Co^{2+}$ -Enzyms ist nach Bindung des Inhibitors leicht verändert<sup>[91]</sup>. Andere Befunde sprechen ebenfalls für die Flexibilität<sup>[92]</sup>. Mit den Glutathion-analogen Inhibitoren 23 wurde gleichfalls die Flexibilität der Glyoxalase I (und des Inhibitorgerüsts) nachgewiesen.

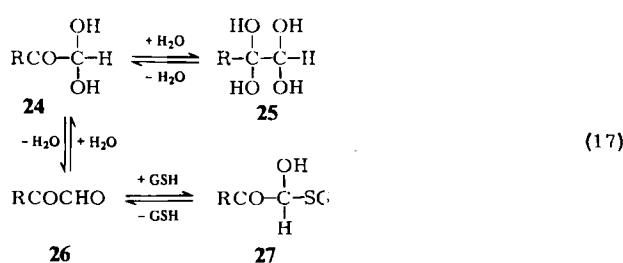


Alle untersuchten Derivate erwiesen sich als kompetitive Inhibitoren, aber das Ausmaß der Erniedrigung von  $K_i$  bei verschiedenen *N*-Acetylierungen (von  $-\text{NH}_3^+$  über  $-\text{COCH}_3$  zu  $-\text{COPh}$ ) hing vom Rest am Schwefel ab ( $\text{SCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Br}(p)$  verglichen mit  $\text{SCH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CF}_3(m)$ ). Weitere Hinweise auf die Proteinflexibilität erhielt man durch Vergleiche der „steady state“- und der Gleichgewichts-Bindungsparameter<sup>[93,94]</sup>. Die  $K_i$ -Werte von *S*-(*m*-Trifluormethylbenzyl)glutathion<sup>[66]</sup> und *S*-(*p*-Brombenzyl)glutathion<sup>[33]</sup> sind für Glyoxalase I aus Hefe pH-abhängig. Angesichts der starken Auswirkung<sup>[67]</sup> des pH-Wertes auf  $v_{max}/K_m$  und auf  $K_m$  ist die Unempfindlichkeit der  $K_i$ -Werte überraschend und deutet an, daß das Enzym konformativ beweglich ist. Nach NMR-Untersuchungen unterscheiden sich auch die Konformationen von gebundenem *S*-Lactoyl- und *S*-Acetonylglutathion<sup>[76]</sup>.

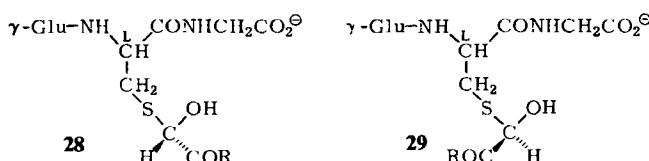
Angesichts einer möglichen Konformationsflexibilität muß die Rolle des Metallions in Glyoxalase I näher betrachtet werden. Ist das Metallion direkt an die Sauerstoffatome des Substrats an der S-Stelle gebunden oder bilden sie die zweite Koordinationssphäre? Man weiß, daß sich das Metallion im aktiven Zentrum in der Nähe der S-Stelle befindet<sup>[89-91]</sup>. Es komplexiert höchstwahrscheinlich nicht den N-Terminus des Glutathions (NMR-Untersuchungen schließen auch die Glu- $\alpha$ -CO<sub>2</sub>-Stelle aus); hierfür spricht auch die geringe Auswirkung der N-Acetylierung von Inhibitoren und Substraten auf den  $K_i$ -Wert<sup>[67, 69]</sup>. Es ist möglich, daß das Gly-CO<sub>2</sub><sup>0</sup> im Enzym-Substrat-Komplex metallgebunden vorliegt, da Glutathion-Derivate, die am Glycin-CO<sub>2</sub>H methyliert sind, nicht an das Enzym binden<sup>[67]</sup>.

### 4.3. Stereochemische Aspekte

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Natur des Substrats der Glyoxalase I noch nicht endgültig geklärt ist. Die  $\alpha$ -Ketoaldehyde liegen hauptsächlich als Hydrate (24, 25) und nicht als freie Aldehyde (26) vor. Die Bildung des Hemithioacetals wird deshalb mit Gleichung (17) besser beschrieben als mit Gleichung (1). Nach  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten liegt Phenylglyoxal nur als Monohydrat 24.

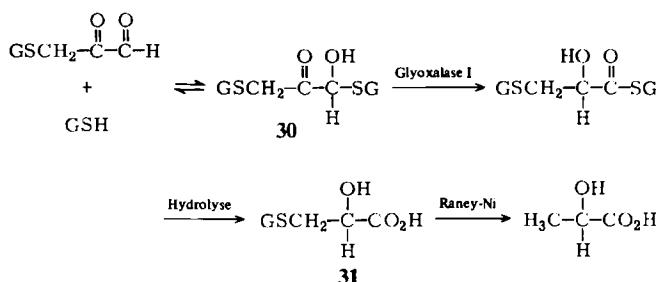


R = Ph, vor<sup>[95]</sup>. Für die Glyoxalase-I-Reaktion wurden in der Vergangenheit drei Mechanismen vorgeschlagen: Im Zwei-Substrat-Mechanismus<sup>[18]</sup> sind der freie  $\alpha$ -Ketoaldehyd und GSH die Substrate; im Ein-Substrat-Mechanismus<sup>[19]</sup> ist das Hemithioacetal das Substrat<sup>[19]</sup>. Die dritte Möglichkeit ist ein Hybridmechanismus<sup>[96]</sup>, bei dem alternativ die beiden genannten Mechanismen eingeschlagen werden; beim Ein-Substrat-Weg ist das Hemithioacetal das Substrat, der Zwei-Substrat-Weg beginnt mit GSH. Vom Hemithioacetal aus GSH und Phenylglyoxal existieren zwei Diastereomere (**28**, **29**, R = Ph), die durch hochauflösende  $^1\text{H-NMR}$ -Spektroskopie unterschieden werden können<sup>[95]</sup>. Durch Zugabe von Glyoxalase I bei pH 4.4 verschwand das Signal des diastereotopen Methinprotons bei niedrigerer Feldstärke. Dies ist ein Beweis dafür, daß die Stereospezifität der Glyoxalase-I-Reaktion – in der *S*-D-Mandelyloylglutathion<sup>[97]</sup> und *S*-D-Lactoylglutathion<sup>[98]</sup> gebildet werden – durch die asymmetrische Bindung der Hemithioacetalregion hervorgerufen wird. Verläuft die Reaktion über ein *cis*-Endiol-Zwischenprodukt (oder einen *cis*-Endiol-Übergangszustand), dann deprotoniert die Base

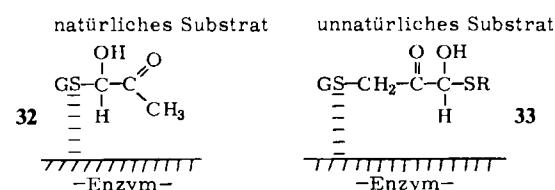


des aktiven Zentrums (*S*)-konfiguriertes **28**. Würde ein *trans*-Endiol gebildet werden, wäre (*R*)-konfiguriertes **29** das Substrat. Eine solche Zuordnung wäre bei einem Hydridübertragungsmechanismus nicht möglich.

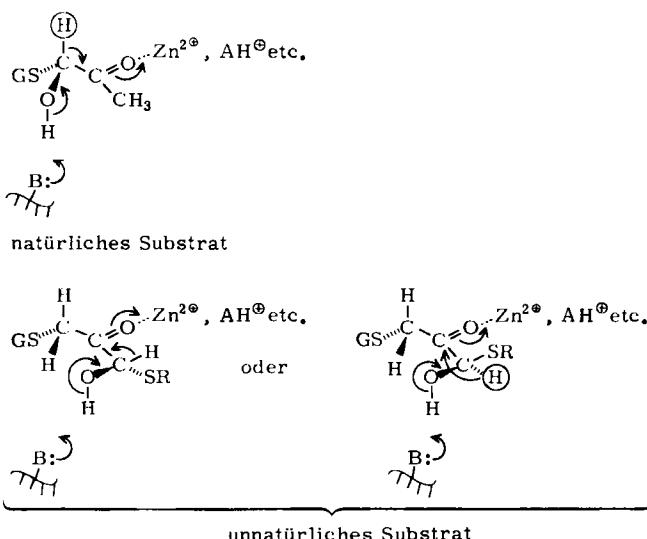
Kozarich und Chari führten weitere pfiffige stereochemische Experimente mit Glyoxalase I durch<sup>[99]</sup>. Das normale Produkt aus Methylglyoxal<sup>[48]</sup> oder Phenylglyoxal<sup>[97]</sup> ist das D-Isomer von S-Lactoylglutathion oder S-Mandelyoylglutathion. Das aus GSH und (Glutathionylmethyl)glyoxal gebildete Hemithioacetal **30** ist für Glyoxalase I aus Hefe ebenfalls ein gutes Substrat; es entsteht ein Thiolester, der zur Glutathionmilchsäure **31** hydrolysiert wird. Nach Raney-Nickel-Desulfurierung wurden die relativen Anteile an D- und L-Milchsäure mittels D- und L-Lactat-Dehydrogenase bestimmt.



Verbindung **30** lieferte – wie erwartet – hauptsächlich D-Milchsäure, während die zu **30** analogen Hemithioacetale von Ethanithiol und  $\beta$ -Mercaptoethanol vorwiegend ( $\approx 4:1$ ) L-Milchsäure ergaben. Die Bindungsspezifität wird also bei **30** vom Hemithioacetalglutathionrest bestimmt, in den beiden anderen Fällen ist es die Glutathionylmethylgruppe (siehe **32** und **33**)<sup>[99]</sup>.



Die Autoren erklärten diese Ergebnisse mit dem Endiol-Mechanismus<sup>[99]</sup>, doch wäre auch eine Hydridübertragung möglich (Schema 4).



**Schema 4.  $\text{AH}^\oplus = \text{Säure}$**

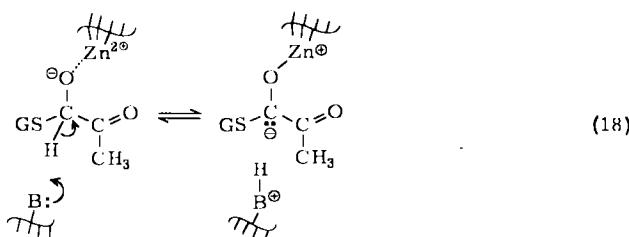
Immobilisierte Glyoxalase I und II wurde zur Synthese optisch aktiver  $\alpha$ -Hydroxysäuren aus  $\alpha$ -Ketoaldehyden verwendet; es wurden hohe Enantiomerenüberschüsse erreicht<sup>[100]</sup>.

#### 4.4. Mögliche Mechanismen der Glyoxalase-I-Reaktion

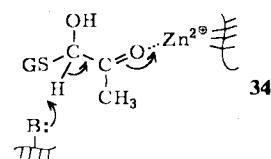
Viele Befunde sprechen für eine Protonenübertragung mit Endiol-Zwischenprodukt, und die folgende Diskussion basiert darauf. Dabei sind im Detail zwei Mechanismen zu unterscheiden: 1. Das Substrat ist direkt an das Metallion ( $Zn^{2+}$ ) des aktiven Zentrums gebunden und 2. das Substrat befindet sich in der zweiten Koordinationssphäre.

##### 4.4.1. Substrat in der ersten Koordinationssphäre von $Zn^{2+}$

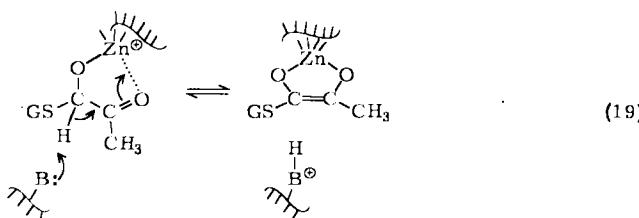
$Zn^{2+}$  kann an das Substrat entweder über das Sauerstoffatom an C-1 oder das an C-2 gebunden werden. Im ersten Fall würde das durch Deprotonierung gebildete Carbanion (und auch der Übergangszustand dieser Reaktion) stabilisiert werden [Gl. (18)].



Im zweiten Fall würde die Ionisierung zu einem Endiolat-Zwischenprodukt durch Polarisierung des Grundzustands und Stabilisierung des Übergangszustands unterstützt werden (siehe 34).

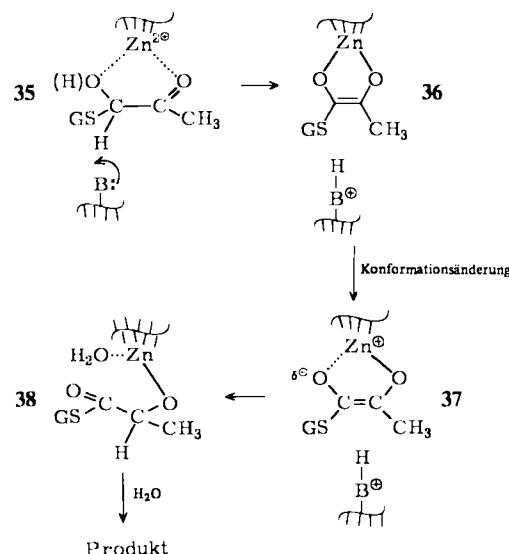


Schließlich ist auch noch die Chelatbindung über beide Sauerstoffatome möglich. Wie aus Gleichung (19) ersichtlich, würde dadurch die entscheidende C–H-Bindung aktiviert und zusätzlich der Übergangszustand stabilisiert.



Von Endiolen sind in der Tat stabile Metallkomplexe bekannt<sup>[101]</sup>, so daß eine solche Reaktion möglich erscheint. Die Bildung eines symmetrischen  $Zn^{2+}$ -Endiolats bringt jedoch Probleme mit sich: Für die Reprotonierung wäre eine geringe Konformationsänderung des aktiven

Zentrums notwendig, um die Chelatstruktur zu stören und die protonierte Base auszurichten. Schema 5 zeigt einen solchen Mechanismus.

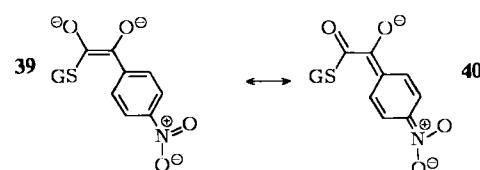


Schema 5.

Das Substrat bindet über eines der beiden Sauerstoffatome an  $Zn^{2+}$  unter Bildung von 35, wodurch eine Protonenübertragung von C-1 zur kryptischen Base B des aktiven Zentrums erleichtert wird. Durch die Protonenübertragung entsteht das fast symmetrische Chelat 36, das wahrscheinlich an beiden Sauerstoffatomen deprotoniert ist. Aufgrund der Größe des  $Zn^{2+}$ -Ions dürfte das  $Zn^{2+}$ -Chelat sehr gespannt sein, wodurch die nächsten Schritte, die Konformationsänderung zu 37, die die selektive Bindung des Metallions an das Sauerstoffatom von C-2 ermöglicht, und die Reprotonierung durch  $-BH^+$  zu 38, erleichtert würden. Möglicherweise ist B ein Carboxylat-Ion, das das Proton durch einfache Rotation von C-1 auf C-2 überträgt, ein Vorgang, wie er von der Triosephosphat-Isomerase her bekannt ist<sup>[102]</sup>. Der in Schema 5 formulierte Mechanismus setzt ein cis-Endiol voraus, wofür man bis jetzt jedoch noch keinen direkten Beweis hat<sup>[24-26]</sup>.

Prinzipiell sind die beiden Mechanismen mit der Bindung über nur ein Sauerstoffatom auch für ein *trans*-Endiol möglich. Das Problem eines symmetrisch-chelatisierten Endiol- $Zn^{2+}$ -Komplexes, daß die Deprotonierung begünstigt und die Reprotonierung behindert ist, taucht hierbei nicht auf.

Der primäre Deuterium-Isotopeneffekt an C-1 ( $k_{\text{cat}}^{\text{H}}/k_{\text{cat}}^{\text{D}} = 3.2$ )<sup>[67]</sup> ist in Übereinstimmung mit einem Mechanismus, bei dem die Deprotonierung an C-1 zu einem Endiol-Zwischenprodukt geschwindigkeitsbestimmend ist. Ein solcher Mechanismus ist jedoch unwahrscheinlich, da keine Substituenteneffekte<sup>[54]</sup> für Phenylglyoxal-Derivate auftreten ( $k_{\text{cat}}$  ändert sich nur um das 4fache für zehn solcher Verbindungen einschließlich Methylglyoxal). Konjugation wie in 39/40 würde das Endiol-Zwischenprodukt



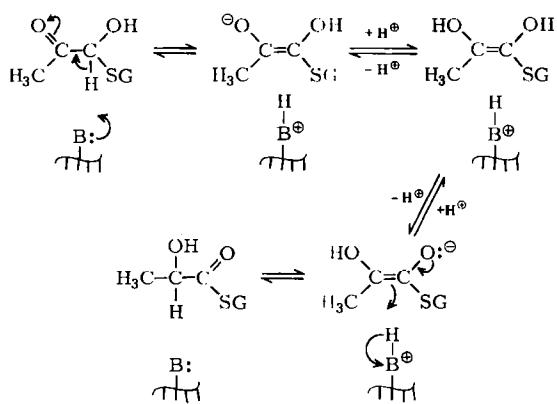
und – nach dem Hammond-Postulat – auch den dazu führenden Übergangszustand durch elektronenziehende Gruppen stabilisieren, besonders wenn C-1 ionisiert wäre. Zusätzlich wäre dann eine Korrelation der Reaktionsgeschwindigkeiten mit den Hammett- $\sigma$ -Konstanten zu erwarten. Es ist jedoch möglich, daß das Endiolat hauptsächlich durch das Metallion stabilisiert wird und dadurch solche Resonanzeffekte nicht zur Geltung kommen. Auch die Reprotonierung des Endiols an C-2 müßte große Substituenteneffekte aufweisen, da die Resonanzstabilisierung verloren ginge. Das Fehlen von Substituenteneffekten weist auf eine Hydrid-Wanderung<sup>[67]</sup>, auf eine geschwindigkeitsbestimmende Konformationsänderung des Enzyms (z. B. beim Binden des Substrates, bei der Änderung der Endiol-Metall-Polarisierung) oder eine geschwindigkeitsbestimmende Produktfreisetzung hin.

#### 4.4.2. Substrat in der zweiten Koordinationssphäre von $Zn^{2+}$

Im vorigen Abschnitt diskutierten wir Mechanismen für den Fall, daß das Metallion der Glyoxalase I direkt mit den Ketoaldehyd-Sauerstoffatomen des Substrats verbunden ist. Neuere NMR-Befunde weisen darauf hin, daß die Sauerstoffatome im Enzym-Produkt<sup>[176]</sup> und im Enzym-S-Acetylglutathion-Komplex<sup>[103]</sup> in der zweiten Koordinationssphäre des Metallions liegen. Mögliche Mechanismen für diesen Fall werden im Folgenden diskutiert.

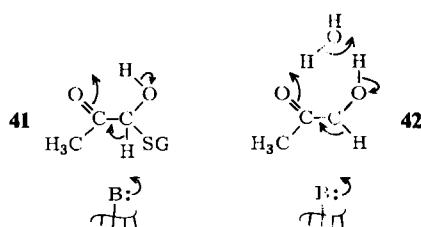
#### Reaktion unter Beteiligung einer Base

Eine Base deprotoniert das durch das benachbarte Schwefelatom (und möglicherweise durch  $Zn^{2+}$ -Fernwechselwirkungen) aktivierte C-1 (Schema 6).



Schema 6.

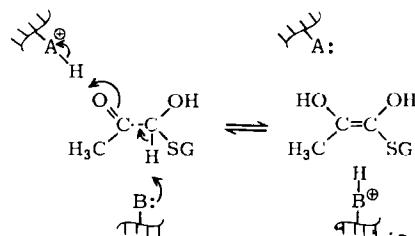
Bei der Gesamtreaktion ist eine Reihe von Protonenübertragungen notwendig: im Falle einer *cis*-Endiol-Zwischenstufe könnte eine Protonenübertragung „intramolekular“ (41) oder vermittelt über Wassermoleküle (42) stattfinden.



Die Base B kann entweder eine Aminosäureseitenkette oder  $[Zn(OH)]^{2+}$  sein. Beim wasservermittelten Protonentransfer könnte das  $H_2O$ -Molekül Zn-gebunden sein; das Zink-Ion müßte dann eventuell zugleich die Hydroxid-Ionen (Base) liefern und die Protonenabgabe aus dem Wasser unterstützen.

#### Reaktion unter Beteiligung einer Säure und einer Base

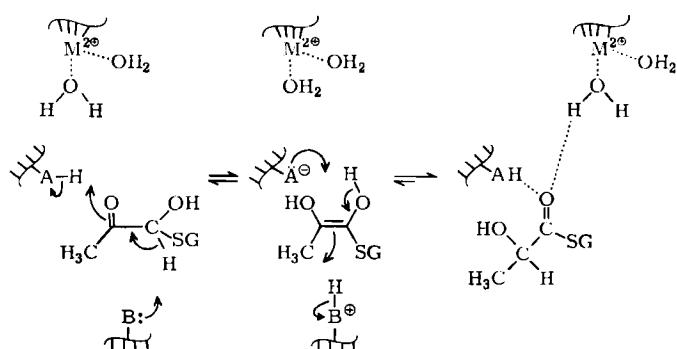
Auch die konzertierte Aktion einer Säure und einer Base ist denkbar, wobei es keine Rolle spielt, ob ein *cis*- oder ein *trans*-Endiol-Zwischenprodukt entsteht (Schema 7). Das Zn-gebundene Wassermolekül ist wahrscheinlich ein Spezialfall von  $AH^+$ .



Schema 7.

Die Deprotonierung an C-1 hing dann auch von der Acidität der OH-Gruppe ab; von Bedeutung wären geringe Konformationsänderungen, die B zur Reprotonierung an C-2 und vielleicht auch A zur Deprotonierung von C-1-OH positionieren. Wäre  $[Zn(H_2O)]^{2+} AH^+$  von Schema 7, so könnte es nicht nur als Brønsted-Säure-Base-Katalysator die Protonenübertragung initiieren, sondern auch als Lewis-Säure das Substrat für die C–H-Spaltung aktivieren.

Ein derartiger Mechanismus, bei dem sich das Substrat in der zweiten Koordinationssphäre des Metallions befindet –  $H_2O$ - und  $OH^-$ -Liganden bildeten die erste Koordinationssphäre –, wurde für andere Metalloenzyme schon vorgeschlagen<sup>[104]</sup>.



Schema 8.

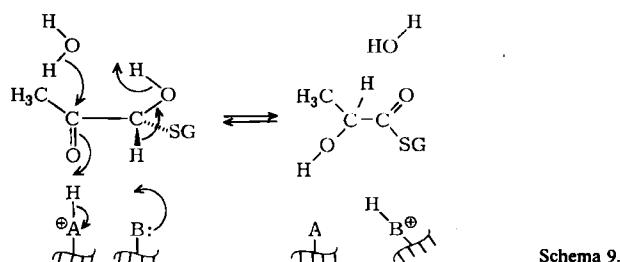
Sellin et al.<sup>[76]</sup> postulierte den in Schema 8 skizzierten Mechanismus, bei dem das Substrat ebenfalls in der zweiten Koordinationssphäre des Metallions gebunden ist. Zusätzlich zur Protonenübertragung von C-1 auf C-2 wird ein Proton auf die Ketogruppe des Hemithioacetals übertragen. Ein als Ligand gebundenes Wassermolekül kann zwar eine Carbonylgruppe polarisieren, das auf das Sauerstoffatom der Ketogruppe des Substrats übertragenen Proton stammt dennoch nicht daher, da die Protonenabgabe ( $pK_a$

Werte) aus  $\text{H}_2\text{O}$ -Liganden von  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  um Größenordnungen langsamer ist als  $v_{\text{max}}$  der Glyoxalase-I-Reaktion<sup>[76]</sup>. Der Protonentransfer von einer Säure im aktiven Zentrum auf eine benachbarte Base ist im Prinzip eine intramolekulare Reaktion, die weder diffusionskontrolliert ist noch andere Nachteile bimolekularer Reaktionen hat. Die obere Grenze für Geschwindigkeitskonstanten unimolekularer Reaktionen liegt bei etwa  $10^{-13} \text{ s}^{-1}$ ; sie ist durch die Schwingungsfrequenz der Molekülbindungen limitiert. Intramolekulare Protonenübertragungen zwischen benachbarten elektronegativen Atomen können – verglichen mit  $v_{\text{max}}$  enzymatischer Reaktionen – sehr schnell verlaufen. AH in Schema 8 kann ein unter dem Substrat verborgener Wasserligand oder die OH-Gruppe des Substrats sein<sup>[76]</sup> (vgl. 41).

Sellin et al.<sup>[70]</sup> schlugen noch einen alternativen Mechanismus vor, bei dem das Substrat über die zweite Koordinationsphäre gebunden ist. In diesem Fall nehmen zwei Ligand-Wassermoleküle an der Reaktion teil; zusätzlich findet eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum statt. Aus Fluoreszenzuntersuchungen weiß man, daß das Hemithioacetal, Glutathion oder der kompetitive Inhibitor *S*-(*p*-Brombenzyl)glutathion, aber *nicht* das Produkt *S*-D-Lactoylglutathion die Konformationsänderung bei Bindung an das Enzym induzieren. Durch Circulardichroismus-Messungen konnten wir eine geringe Konformationsänderung eines Tyrosinrestes beim Binden von *S*-(*p*-Brombenzyl)glutathion an Glyoxalase I aus Hefe feststellen<sup>[105]</sup>.

#### Konzertierte Protonenübertragung

Ein Endiol-Zwischenprodukt wäre überflüssig, wenn eine konzertierte Protonenübertragung stattfände wie sie Schema 9 zeigt. Gegen einen solchen Mechanismus sprechen aber das Fehlen von Wasserstoffaustausch mit dem Lösungsmittel und die Befunde der Flavin-Reduktionsexperimente.



Schema 9.

#### 5. Zusammenfassung und Ausblick

Das Substrat der Glyoxalase I ist das von  $\alpha$ -Ketoacetalen abstammende Hemithioacetal des Glutathions; es wird durch Protonen- und nicht durch Hydridübertragung zu *S*-D-Lactoylglutathion umgesetzt. Die Reaktion verläuft wahrscheinlich über ein Endiolat-Zwischenprodukt. Die Kenntnis des Mechanismus ermöglicht es, maßgeschneiderte Inhibitoren zu synthetisieren. Die Inhibition der Glyoxalase I durch Cytotoxine scheint – wenigstens nach Befunden von Experimenten in Zellkultur – ein Weg zur Entwicklung von Cancerostatica zu sein. Inhibition der

Glyoxalase I kann zumindest beim Screening von Verbindungen von Nutzen sein.

Viele Fragen bleiben offen. Sind diese Verbindungen cytotoxisch, weil sie Glyoxalase I inhibieren? Wirken sie allein oder als Cofaktoren? Können hochwirksame spezifische Inhibitoren maßgeschneidert werden? Ferner sind noch einige Aspekte des Wirkungsmechanismus der Glyoxalase I ungeklärt. Handelt es sich beim Endiol um eine *trans*- oder *cis*-Verbindung? Welches Diastereomer ist das Substrat? Sind für die Katalyse ein oder zwei Wassermoleküle (oder keins) notwendig, die laut NMR-Messungen Liganden am Metallion des aktiven Zentrums sind? Welche Bedeutung hat die konformativ Beweglichkeit des Enzyms für den Wirkungsmechanismus? Hat die dimere Struktur des Enzyms aus Säugetieren (das Enzym aus Hefe ist ein Monomer) eine Funktion? Moderne physikalische Untersuchungsmethoden, besonders die NMR-Spektroskopie, sollten helfen, schon bald Antworten auf diese Fragen zu finden.

#### 6. Nachtrag

Nach Fertigstellung des Manuskripts wurden einige Probleme des Mechanismus der Glyoxalase-I-Reaktion geklärt. Mit NMR-Daten wurde die Konformation von vier Glutathion-Derivaten, die am aktiven Zentrum des Enzyms gebunden sind, bestimmt; die Inhibitoren binden in einer gestreckten Y-Form, die an die durch Rechnungen und Röntgenbeugung ermittelte Struktur von Glutathion erinnert. Die Abstände zwischen dem Metallatom im aktiven Zentrum des Enzyms und dem Substrat einerseits sowie dem Produkt andererseits im Enzym-Substrat- bzw. Enzym-Produkt-Komplex unterscheiden sich etwas. Im Gegensatz zu den meisten Inhibitoren, die in der zweiten Koordinationsphäre gebunden werden, wird *S*-Methoxy-carbonylglutathion, eine ionische Verbindung, in der dritten Koordinationsphäre gebunden<sup>[106]</sup>.

Berichtet wurde auch über die nicht-stereospezifische Substratumssetzung durch Glyoxalase I<sup>[107]</sup>; dieser Befund impliziert, daß das Enzym Substratdiastereomere ineinander umwandeln kann, wobei die *cis*-Endiol-Zwischenstufe gebildet wird. Diese Zwischenstufe konnte jetzt auch NMR-spektroskopisch nachgewiesen werden<sup>[108]</sup>. Strukturen von Verbindungen wie Maltol, die den Übergangszustand der Glyoxalase-I-Substrate simulieren, wurden berechnet<sup>[109]</sup>. Durch EXAFS-Studien bestimmte man die Position einiger Liganden am Zinkatom des aktiven Zentrums<sup>[110]</sup>.

Eingegangen am 11. Mai 1984 [A 511]  
Übersetzt von Dipl.-Biol. Christiane Koszka, Wien

- [1] F. A. French, B. L. Freedlander, *Cancer Res.* 18 (1958) 272.
- [2] H. D. Dakin, H. W. Dudley, *J. Biol. Chem.* 14 (1913) 155, 243; C. Neuberg, *Biochem. Z.* 49 (1913) 502.
- [3] E. Racker, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 685.
- [4] C. Walsh: *Enzymatic Reaction Mechanisms*, Freeman, San Francisco 1979, S. 326.
- [5] a) J. I. Harris, M. Waters in P. Boyer: *The Enzymes*, Vol. 13, 3. Aufl., Academic Press, New York 1976, S. 1; b) H. L. Segal, P. D. Boey, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 265.
- [6] P. Strittmatter, E. G. Ball, *J. Biol. Chem.* 213 (1955) 445.
- [7] a) E. Gillespie, *Nature London* 277 (1979) 135; b) *J. Immunol.* 121 (1978) 923.
- [8] A.-C. Aronsson, B. Mannervik, *Biochem. J.* 165 (1977) 503.

- [9] W. H. Elliott, *Biochim. Biophys. Acta* 29 (1958) 446; G. Urata, S. Grancic, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 811.
- [10] T. Jerzykowski, R. Winter, W. Matuszewski, *Biochem. J.* 135 (1973) 713.
- [11] R. Vince, W. B. Wadd, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 35 (1969) 593.
- [12] A. Szent-Györgyi, *Science* 161 (1968) 988; A. Szent-Györgyi: *Bioelectronics*, Academic Press, New York 1968, S. 66-76.
- [13] E. Bricas, C. Fromageot, *Adv. Protein Chem.* 8 (1953) 1.
- [14] E. Racker in S. P. Colowick: *Glutathione*, Academic Press, New York 1954, S. 165.
- [15] W. E. Knox in P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrbäck: *The Enzymes*, Vol. 2, 2. Aufl., Academic Press, New York 1960, S. 253.
- [16] H. Stern, *Science* 124 (1956) 1292.
- [17] R. Vince, S. Daluge, W. B. Wadd, *J. Med. Chem.* 14 (1971) 402.
- [18] W. O. Kermack, N. A. Matheson, *Biochem. J.* 65 (1957) 48.
- [19] E. H. Cliffe, S. G. Waley, *Biochem. J.* 79 (1960) 475.
- [20] R. Vince, S. Daluge, *J. Med. Chem.* 14 (1971) 35.
- [21] P. A. Lyon, R. Vince, *J. Med. Chem.* 20 (1977) 77.
- [22] R. Vince, M. Wolf, C. Sanford, *J. Med. Chem.* 16 (1973) 951.
- [23] J.-O. Hoog, K. T. Douglas, C. D'Silva, A. Homgren, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107 (1982) 1475.
- [24] J.-O. Hoog, A. Holmgren, C. D'Silva, K. T. Douglas, A. P. Seddon, *FEBS Lett.* 138 (1982) 59.
- [25] M. Iio, K. Okabe, H. Omura, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 22 (1976) 53.
- [26] K. T. Douglas, I. N. Nadvi, *FEBS Lett.* 106 (1979) 393.
- [27] C. J. Monder, *J. Biol. Chem.* 242 (1967) 4603.
- [28] A. J. Willetts, J. M. Turner, *Biochim. Biophys. Acta* 222 (1970) 668.
- [29] K. T. Douglas, I. N. Nadvi, N. Thakrar, *IRCS Med. Sci.* 10 (1982) 683.
- [30] T. Yamamoto, *Igaku To Seibutsugaku* 94 (1977) 437; *Chem. Abstr.* 89 (1978) 15747.
- [31] T. Yamamoto, *Igaku To Seibutsugaku* 94 (1977) 434; *Chem. Abstr.* 90 (1979) 16078a.
- [32] K. T. Douglas, I. N. Nadvi, J. Ghobt-Sharif, *IRCS Med. Sci.* 10 (1982) 861.
- [33] K. T. Douglas, J. Ghobt-Sharif, *Biochim. Biophys. Acta* 748 (1983) 184.
- [34] H. Kahler, W. B. Robertson, *J. Natl. Cancer Inst.* 3 (1943) 495.
- [35] S. Kurasawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* 40 (1976) 559.
- [36] S. Kurasawa, H. Naganawa, T. Takeuchi, H. Umezawa, *Agric. Biol. Chem.* 39 (1975) 2009.
- [37] Y. Sugimoto, H. Suzuki, H. Yamaki, T. Nishimura, N. Tanaka, *J. Antibiot.* 35 (1982) 1222.
- [38] T. Takeuchi, H. Chimura, N. Hamada, H. Umezawa, O. Yoshioka, N. Oguchi, Y. Takahashi, A. Matsuda, *J. Antibiot.* 28 (1975) 737.
- [39] H. Chimura, H. Nakamura, T. Takita, T. Takeuchi, H. Umezawa, K. Kato, S. Saito, T. Tonisawa, Y. Iitaka, *J. Antibiot.* 28 (1975) 743.
- [40] E. Baumann, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 18 (1885) 258.
- [41] L. Uotila, B. Mannervik, *Biochem. J.* 177 (1979) 869.
- [42] G. Wald, C. Greenblatt, P. K. Brown, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 12 (1953) 285.
- [43] D. Moras, K. W. Olsen, M. N. Sahesan, M. Buehner, G. C. Ford, M. G. Rossmann, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 9137.
- [44] M. S. Kanchuger, L. D. Byers, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 3005.
- [45] G. E. Leinhard, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* 88 (1966) 3982.
- [46] R. E. Barnett, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* 91 (1969) 6758.
- [47] H. F. Gilbert, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 7931.
- [48] T. Okuyama, K. Kimura, T. Fueno, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 55 (1982) 1493.
- [49] M. P. Schubert, *J. Biol. Chem.* 111 (1935) 671.
- [50] B. Holmberg, *Ark. Kemi* 14A (1940) Nr. 9, S. 1.
- [51] K. T. Douglas, N. F. Yaggi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1980, 1037.
- [52] P. C. Jocelyn: *The Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, London 1972.
- [53] Unseres Wissens wurde bisher nicht über die normale Konzentration von Methylglyoxal in Zellen berichtet; es ist jedoch zu erwarten, daß sie einige Zehnerpotenzen geringer ist als die von Glutathion.
- [54] D. L. Vander Jagt, L.-P. B. Han, C. H. Lehman, *Biochemistry* 11 (1972) 3735.
- [55] V. Franzen, *Chem. Ber.* 89 (1956) 1020.
- [56] V. Franzen, *Chem. Ber.* 88 (1955) 1361.
- [57] V. Franzen, *Chem. Ber.* 90 (1957) 623.
- [58] S. S. Hall, A. M. Doweyko, F. Jordan, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 5934.
- [59] S. Shinkai, T. Yamashita, Y. Kusano, O. Manabe, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 2070.
- [60] T. Okuyama, S. Komoguchi, T. Fueno, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2582.
- [61] S. S. Hall, A. Poet, *Tetrahedron Lett.* 1970, 2867.
- [62] J. F. Hine, G. F. Koser, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 3591.
- [63] E. R. Alexander, *J. Am. Chem. Soc.* 69 (1947) 289.
- [64] W. von E. Doering, T. I. Taylor, E. F. Schoenewaldt, *J. Am. Chem. Soc.* 70 (1948) 455.
- [65] D. L. Vander Jagt, L.-P. B. Han, C. H. Lehman, *J. Org. Chem.* 37 (1972) 4100.
- [66] J. Hine, C. D. Fischer, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* 97 (1975) 6513.
- [67] D. L. Vander Jagt, L.-P. B. Han, *Biochemistry* 12 (1973) 5161.
- [68] A. J. Kirby, *Adv. Phys. Org. Chem.* 17 (1980) 183.
- [69] K. T. Douglas, A. Al-Timari, C. D'Silva, D. I. Gohel, *Biochem. J.* 207 (1982) 323.
- [70] S. Sellin, L. E. G. Eriksson, B. Mannervik, *Biochemistry* 21 (1982) 4850.
- [71] L.-P. B. Han, L. M. Davison, D. L. Vander Jagt, *Biochim. Biophys. Acta* 445 (1976) 486.
- [72] S. Sellin, B. Mannervik, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 8872.
- [73] I. A. Rose, *Biochim. Biophys. Acta* 25 (1957) 214.
- [74] S. S. Hall, A. M. Doweyko, F. Jordan, *J. Am. Chem. Soc.* 98 (1976) 7960.
- [75] I. A. Rose, E. L. O'Connell, *J. Biol. Chem.* 236 (1961) 3086.
- [76] S. Sellin, P. R. Rosevear, B. Mannervik, A. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 10023.
- [77] R. V. J. Chari, J. W. Kozarich, *J. Biol. Chem.* 256 (1981) 9785.
- [78] J. W. Kozarich, R. V. J. Chari, J. C. Wu, T. L. Lawrence, *J. Am. Chem. Soc.* 103 (1981) 4593.
- [79] N. F. Yaggi, K. T. Douglas, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 4844; K. T. Douglas, N. F. Yaggi, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1982, 1037.
- [80] K. T. Douglas, M. Alborz, G. R. Rullo, N. F. Yaggi, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1982, 245; *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1982, 1675.
- [81] M. Alborz, K. T. Douglas, F. M. Said, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* 1982, 1467.
- [82] R. F. Pratt, T. C. Bruice, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 5956.
- [83] K. Ueda, S. Shinkai, K. T. Douglas, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1984, 371.
- [84] K. A. Davis, G. R. Williams, *Biochim. Biophys. Acta* 113 (1966) 393.
- [85] L. Uotila, M. Koivusalo, *Eur. J. Biochem.* 52 (1975) 493.
- [86] A.-C. Aronsson, E. Marmstal, B. Mannervik, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81 (1978) 1235.
- [87] L.-P. B. Han, C. M. Schimandle, L. M. Davison, D. L. Vander Jagt, *Biochemistry* 16 (1977) 5478.
- [88] B. Mannervik, L. Lindstrom, T. Bartfai, *Eur. J. Biochem.* 29 (1972) 276.
- [89] A.-C. Aronsson, S. Sellin, G. Tibbelin, B. Mannervik, *Biochem. J.* 197 (1981) 67.
- [90] S. Sellin, A.-C. Aronsson, B. Mannervik, *Acta Chem. Scand. Ser. B Org. Chem. Biochem.* 34 (1980) 541.
- [91] S. Sellin, L. E. Eriksson, A.-C. Aronsson, B. Mannervik, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 2091.
- [92] A. P. Seddon, K. T. Douglas, unveröffentlicht.
- [93] E. Marmstal, B. Mannervik, *FEBS Lett.* 102 (1979) 162.
- [94] E. Marmstal, B. Mannervik, *FEBS Lett.* 131 (1981) 301.
- [95] C. Brown, K. T. Douglas, J. Ghobt-Sharif, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1981, 944.
- [96] B. Mannervik, B. Gorna-Hall, T. Bartfai, *Eur. J. Biochem.* 37 (1973) 270.
- [97] D. L. Vander Jagt, E. Daub, J. A. Krohn, L.-P. B. Han, *Biochemistry* 14 (1975) 3669.
- [98] K. Ekwall, B. Mannervik, *Biochim. Biophys. Acta* 297 (1973) 297.
- [99] J. W. Kozarich, R. V. J. Chari, *J. Am. Chem. Soc.* 104 (1982) 2655.
- [100] M. A. K. Patterson, R. P. Szajewski, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* 46 (1981) 4682.
- [101] C. A. Buehler, *Chem. Rev.* 64 (1964) 7.
- [102] F. C. Hartman, *Biochemistry* 10 (1971) 146.
- [103] S. Sellin, P. R. Rosevear, B. Mannervik, A. S. Mildvan, *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 41 (1982) 1152.
- [104] A. S. Mildvan, *Acc. Chem. Res.* 10 (1977) 246; G. M. Smith, A. S. Mildvan, E. T. Harper, *Biochemistry* 19 (1980) 1248.
- [105] A. P. Seddon, Dissertation, Universität von Essex 1982. In vorläufigen Untersuchungen fanden wir, daß Glyoxalal I aus Hefe empfindlich auf die Nitrierung von Tyrosin durch Tetranitromethan reagiert. Die Geschwindigkeit der Abnahme der Enzymaktivität durch Nitrierung hängt von einer Ionisation ( $K^{PP} \approx 7.5$ ) ab; gegen diese Desaktivierung kann mit dem kompetitiven Inhibitor *S*-*p*-Brombenzylglutathion geschützt werden. Dies deutet darauf hin, daß sich der Tyrosinrest (absorptionspektroskopisch durch eine Bande bei  $\lambda \approx 400$  nm nach Nitrierung und G-25-Gelfiltration nachgewiesen) in einem wichtigen Segment, wahrscheinlich im aktiven Zentrum, des Enzyms befindet (S. Carrington, K. T. Douglas, D. I. Gohel, unveröffentlicht).
- [106] P. R. Rosevear, S. Sellin, M. A. Mannervik, I. D. Kuntz, S. S. Mildvan, *J. Biol. Chem.*, im Druck.
- [107] C. E. F. Griffis, L. H. Ong, L. Buettner, D. J. Creighton, *Biochemistry* 22 (1983) 2945.
- [108] R. V. J. Chari, J. W. Kozarich, *J. Am. Chem. Soc.* 105 (1983) 7169.
- [109] C. Thomson, R. Brandt, *Int. J. Quantum Chem.* 10 (1983) 357.
- [110] L. Garcia-Iniguez, L. Powers, B. Chance, S. Sellin, B. Mannervik, A. S. Mildvan, *Biochemistry* 23 (1984) 685.