

DIE HEMMUNG DER KRISTALLISIERTEN D-GLYCERALDEHYD-3-PHOSPHAT DEHYDROGENASE AKTIVITÄT DURCH PHENOTHIAZINE UND AMINOKETONE

M. WOLLEMAN und P. ELÖDI

Institut für Neurochirurgie, und Biochemisches Institut der
Ungarischen Akademie der Wissenschaften, Budapest

(Received 27 October 1960)

Abstract—Various phenothiazine and aminoketone derivatives inhibit the activity of PGAD crystallized from swine muscle at a concentration of between 10^{-8} – 10^{-6} M. The inhibition disappears when incubated with cystein and develops only during illumination.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass Phenothiazine und Aminoketone *in vitro* die oxydative Phosphorylierung Gehirn-, und Lebermitochondrien hemmen.^{1–4} Diese Hemmung ist mit Hilfe von Cystein aufzuheben.⁵ Nach unseren früheren Versuchen beruht die *in vitro* beobachtete Wirkung teilweise wahrscheinlich auf einer Hemmung der SH Gruppen enthaltenden Fermente und Kofenzyme des phosphorylierenden Systems (Hexokinase, Brenztraubensäure-, Ketoglutarisäureoxydase).^{6, 7}

Zur Untersuchung des genaueren Wirkungsmechanismus haben wir unsere Versuche mit kristallisierter D-Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (PGAD) durchgeführt, welche essentielle SH Gruppen enthält.⁸

METHODE

Die Aktivität der aus Schweinemuskel isolierte PGAD wurde mit Hilfe der optischen Methode von Warburg bestimmt.⁸ Der Versuch wurde folgenderweise durchgeführt: Das Fermenteiweiß ($30 \mu\text{g} = 4,8 \times 10^{-10}$ M) wurde 0–30 Min lang mit den untersuchten Substanzen auf Zimmertemperatur inkubiert, deren Konzentration $1,6 \times 10^{-5}$ M war. Aus diesem wurde 0,1 ml dem Reaktionsgemisch zugefügt. In einigen Experimenten wurde das Ferment und die geprüften Präparate in Gegenwart von Cystein inkubiert (Endkonzentration 1×10^{-3} M). In solchen Fällen wurde auch der Kontrollprobe Cystein zugefügt, da Cystein die Aktivität der untersuchten Fermentpräparate um 20–30% hebt. Die Beleuchtung wurde bei Tageslicht in 5 ml Flüssigkeit enthaltenden Proberöhren durchgeführt.

Folgende Phenothiazin- und Aminoketonderivate wurden untersucht:

- (1) Chlorpromazin (Chlor-3-(dimethylamino-3'-propyl)-10-phenothiazin). (a) Largactil (Specia). (b) Hibernál (Egyesült Gyógyszer és Tápszergyár).
- (2) Promethazin(N-(2'-dimethylamino-2'-methyl) (äthyl)-10-phenothiazin). (a) Phenergan (Specia). (b) Pipolphen (Egyesült Gyógyszer és Tápszergyár).
- (3) Diaethazin(N-(2'-diaethylamino-äthyl)-phenothiazin). Latibon (Bayer).

- (4) Promazin-(N-(3'-dimethylamino)-propyl-phenothiazin). Talofen (Pierrel).
 (5) Prochlorpromazin-(Chlor-3(N-methyl-4''-piperaziny)-3'propyl)-10-phenothiazin). Stemetil (Specia).
 (6) NA-86, 2-piperidino-methyl-tetralon-1-HCl.
 (7) N-664, 2-piperidino-methyl-7-aethyl-tetralon-1-HCl.
 (8) N-694, 2-morpholino-methyl-7-aethyl-tetralon-1-HCl.
 (9) N-695, 2-piperidino-methyl-4,6,7-trimethyl-tetralon-1-HCl.
 (10) N-697, 2-piperidino-methyl-7-chlor-tetralon-1-HCl.
 (11) NA-65, 1-piperidino-3-phenylpropan-3-on-HCl.
 (12) NA-127, 1-piperidino-3-phenylpropan-3-ol-HCl.

Die Aminoketonderivate 6–12 wurden von Dr. K. Nádor (Abteilung für Arzneimittelforschung des Institutes für experimentelle Medizinische Forschung der ungarischen Akademie der Wissenschaften) synthetisiert und zur Verfügung gestellt wofür wir auch an dieser Stelle unseren Dank ausdrücken.

ERGEBNISSE

TABELLE 1. CHLORPROMAZINHemmung der PGAD Aktivität in verschiedenen Konzentrationen, nach verschiedener Inkubationszeit und Beleuchtung

Untersuchte Substanz	Konzentration (M)	Inkubationszeit (Min)	Aktivität nach 30 Sek.	
			ΔE_{340}	in % der Kontrolle
Kontrollprobe	—	—	0,210	100
Largactil	$1,6 \times 10^{-5}$	2	0,145	70
Largactil	$1,6 \times 10^{-5}$	10	0,095	46
Largactil	$1,6 \times 10^{-5}$	20	0,020	10
Largactil	$1,6 \times 10^{-5}$	30	0,000	0
Largactil	$3,15 \times 10^{-6}$	25	0,140	70
Largactil	$1,6 \times 10^{-6}$	15	0,150	83
Largactil	$1,6 \times 10^{-6}$	60	0,085	40
Chlorpromazin	$1,6 \times 10^{-5}$	30 beleuchtet	0,080	38
Chlorpromazin	$1,6 \times 10^{-5}$	30 in Dunkeln	0,215	102
Chlorpromazin	$1,6 \times 10^{-5}$	30 beleuchtet, nachher im Dunkeln mit PGAD 30' inkubiert	0,220	105

Aus Tabelle 1 ist es sichtbar, dass $1,6 \times 10^{-5}$ M Largactil die Fermentaktivität nach 30 Min vollkommen hemmt. Aus den Versuchen mit Chlorpromazin geht hervor, dass die Chlorpromazinhemmung im Dunkeln nicht zu Stande kommt, und dass die Beleuchtung gleichzeitig mit der Inkubation mit PGAD zur Auslösung der hemmenden Wirkung notwendig ist, auf welche Erscheinung wir noch später zurückkehren werden.

In den weiteren Versuchen haben wir die verschiedenen Phenothiazinderivate und Aminoketone unter gleichen Versuchsbedingungen und Konzentrationen ($1,6 \times 10^{-5}$) miteinander verglichen. Das Ferment wurde 20 Min mit den untersuchten Präparaten in Abwesenheit und in Gegenwart von Cystein (1×10^{-3} M) inkubiert. (Tabelle 2).

Unsere weitere Versuche zeigen, dass die hemmende Wirkung der Phenothiazine und Aminoketone auf die Aktivität der PGAD zwar mit Cystein aufzuheben ist,

aber nicht auf der direkten Blockierung der SH Gruppen beruht. Das Spektrum des Chlorpromazins zeigte im Gegensatz zu anderen Angaben⁹ keine ausgesprochene Abweichung in Gegenwart von Cystein. Dagegen kommt eine Veränderung im Spektrum des Chlorpromazins vor bei Beleuchtung mit Abnahme des Adsorptionsmaximums bei 256 $m\mu$ unter der Bildung eines neuen Adsorptionsmaximums bei 275 $m\mu$. Die Veränderung wird von PGAD katalysiert. DPN freie PGAD übt diese katalysierende Wirkung nicht aus (Tabelle 3).

TABELLE 2. PGAD AKTIVITÄTSHemmUNG VERSCHIEDENER PHENOTHIAZIN UND AMINO-KETONDERIVATE IN GEGENWART UND ABWESEN VON CYSTEIN

Untersuchtes Präparat	Aktivität nach 30 Sek.			
	Ohne Cystein		Mit Cystein	
	ΔE_{340}	in % der Kontrolle	E_{340}	in % der Kontrolle
Kontrollprobe	0,270	100	0,340	100
Chlorpromazin	0,145	54	0,335	98
Largactil	0,081	30	0,323	95
Hibernal	0,030	10	0,290	85
Phenergan	0,081	30	0,335	98
Pipolphen	0,085	35	0,330	96
Latibon	0,140	52	0,310	91
Talofen	0,115	42	0,345	102
Stemetil	0,105	39	0,335	98
Na-86	0,100	37	0,320	94
N-664	0,095	35	0,325	95
N-694	0,130	48	0,330	97
N-695	0,095	35	0,335	98
N-697	0,145	54	0,340	100
NA-65	0,150	55	0,295	87
NA-127	0,270	100	0,350	103

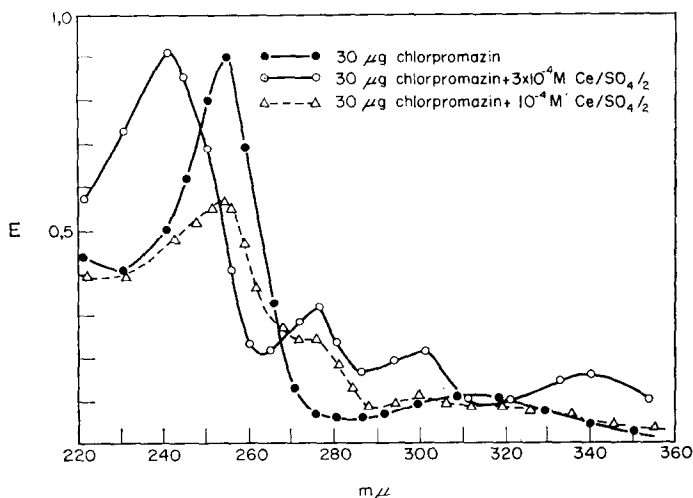


ABB. 1. Adsorptionsspektrum der Oxydation des Chlorpromazins mit Hilfe von $Ce(SO_4)_2$.

Sämtliche spektrophotometrische Proben wurden gegen, Eiweiss bzw. Cystein gemessen. Das beleuchtete Produkt ist nicht mit dem Chlorpromazinsulfoxyd identisch¹⁶ da es kein Maximum bei 240 m μ erweist. Bei der partiellen Oxydation des Chlorpromazins mit Hilfe von Ce(SO₄)₂ haben wir jedoch eine ähnliche intermediäre Verbindung wahrgenommen (Abb. 1).

TABELLE 3. VERÄNDERUNGEN IM ADSORPTIONSSPEKTRUM DES CHLORPROMAZINS WÄHREND BELEUCHTUNG, INKUBATION MIT PGAD UND CYSTEIN

Wellenlänge (m μ)	Chlorpromazin (10 ⁻⁵ M)			Chlorpromazin + PGAD (10 ⁻⁵ M) (10 ⁻⁹ M)		
	Zeit der Beleuchtung (Min)			Zeit der Beleuchtung (Min)		
	0	15	30	0	15	30
256	0,85	0,75	0,65	0,85	0,58	0,45
275	0,02	0,03	0,05	0,025	0,10	0,20
240	0,40	0,38	0,37	0,42	0,42	0,40
Wellenlänge (m μ)	Chlorpromazin + Cystein (10 ⁻⁵ M) (10 ⁻⁴ M)			Chlorpromazin + DPN freie PGAD (10 ⁻⁵ M) (10 ⁻⁹ M)		
	0	15	30	0	15	30
	0	15	30	0	15	30
256	0,84	0,78	0,75	0,87	0,76	0,65
275	0,02	0,02	0,03	0,02	0,03	0,05
240	—	—	—	0,40	0,39	0,40

DISKUSSION

Als Mechanismus der PGAD Aktivitätshemmung der Phenothiazine kann also nicht nur die Bindung der SH Gruppen in Frage kommen, sondern auch eine photosensible Redoxveränderung der Phenothiazine, dass durch Cystein gehemmt wird. Eine ähnliche Veränderung hat auch Cavanaugh bemerkt¹⁰ bei der Peroxydase Oxydation der Phenothiazine. Nach Literaturangaben¹¹ und nach unseren Erfahrungen¹² hemmen Phenothiazine auch andere Dehydrogenasen. Bei der Hemmung der PGAD Aktivität konnten wir jedoch nicht Veränderungen in der Zahl der SH Gruppen beweisen.¹³ Diese Angaben und die Versuche japanischer Autoren¹⁴ dass die Phenothiazine die Aminosäureoxydasenaktivität durch kompetitive Hemmung der Flavinnukleotide aufheben, haben uns auf die Annahme des obenerwähnten Mechanismus geführt. Es kann sich also bei der PGAD Hemmung der Phenothiazine um eine Redoxveränderung oder um eine Bildung eines wirksamen Intermediärs handeln. Gegen die letztere Annahme spricht jedoch, dass das beleuchtete Produkt während einer Inkubation im Dunkeln die PGAD Aktivität nicht hemmt. Es konnte aber während der Beleuchtung auch eine Polymerisation des Chlorpromazins stattfinden, welche die reaktiven Gruppen bindet.¹⁵ Die Entscheidung dieser Frage ist noch Aufgabe weiterer Versuche.

“Die zwischen dem Chlorpromazin, Largactil und Hibernal gefundene Differenz in der Hemmung lassen sich dadurch erklären, dass die Präparate Largactil und Hibernal verschiedene, stabilisierende Substanzen enthalten (z.B. Natriumhydrocarbonat, Hydrochinon, Natriumsulfit, Kaliumpyrosulfat u.s.w.) Diese Reduktionsmittel bewahren die Phenothiazine einigermaßen vor frühzeitiger Oxydation und Polymerisation. Dagegen nimmt das Maximum des Adsorptionsspektrums des Chlorpromazins schon nach einigen Minuten nach der Lösung ab, wie es aus

dem Kontrollversuch der Tabelle 3 auch sichtbar ist. Mit Chlorpromazinsulfoxyd beobachteten wir nur eine 10–20%-ige Hemmung in derselben Konzentration.”

ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene Phenothiazin- und Aminoketonderivate hemmen die Aktivität der aus Schweinemuskel kristallisierter PGAD in einer Konzentration zwischen 10^{-5} – 10^{-6} M. Die Hemmung wird in Gegenwart von Cystein aufgehoben, und entsteht nur nach Beleuchtung.

LITERATUR

1. L. G. ABOOD, *Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y.* **88**, 688 (1955).
2. J. BERNSOHN, I. NAMAJUSKA und L. S. G. COCHRANE, *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 274 (1956).
3. A. ANDREJEW, A. J. ROSENBERG, G. DUCET und J. LOUW, *C.R. Soc. Biol., Paris* **150**, 484 (1956).
4. L. DECSI, *Acta Physiol. Hung.* **10**, 380 (1956).
5. L. DECSI, *Acta Physiol. Hung.* **12**, 293 (1957).
6. M. WOLLEMANN und E. CHOLNOKY, *Acta Physiol. Hung.* **16**, Suppl. 72 (1959).
7. F. KATONA und M. WOLLEMANN, *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* **238**, 113 (1960).
8. P. ELÖDI und E. SZÖRÉNYI, *Acta Physiol. Hung.* **9**, 339 (1956).
9. L. DECSI, *Arzneimittelforschung* **8**, 352 (1957).
10. D. J. CAVANAUGH, *Science* **125**, 1041 (1957).
11. L. B. KHOUW, T. N. BURNBRIDGE und A. SIMON, *Fed. Proc.* **19**, 280 (1960).
12. T. KELETI und M. WOLLEMANN, In Vorbereitung.
13. P. ELÖDI und M. WOLLEMANN, *Magyar Kémikusok Lapja* Im Druck (1960).
14. K. YAGI, T. NAGATSU und T. OZAWA, *Nature, Lond.*, 891 (1956).
15. I. FLÖDERER. Persönliche Kommunikation.
16. N. P. SALZMAN und B. P. BRODIE, *J. Pharmacol.* **118**, 46 (1957).