

CHROM. 10,519

Note

Fluorometrischer Nachweis der Catechol-O-Methyltransferase-Aktivität nach Elektrophorese im Polyacrylamid-Gel

JOSEPH VESER, PETER GEYWITZ und HELMUT THOMAS*

Abteilung Biochemie I der Universität Ulm, Ulm (B.R.D.)

(Eingegangen am 18. August 1977)

Ein wichtiger Stoffwechselweg der Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin führt über eine enzymatische O-Methylierung. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, die Catechol-O-Methyltransferase**¹, wurde 1958 von Axelrod und Tomchick² aus Rattenleber auf das 30-fache angereichert und in der Folgezeit von einer Reihe anderer Autoren³⁻¹⁰ weiter gereinigt. Es überträgt eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin auf eine der beiden Hydroxylgruppen von Adrenalin¹, Noradrenalin², Dopamin² und anderen Brenzkatechinderivaten^{2,10-12}. Als Substrate dienen auch noch weitere Verbindungen, die einen aromatischen Ring mit zwei vicinalen Hydroxylgruppen aufweisen, wie z.B. 2-Hydroxyöstrogene^{13,14}.

Kürzlich konnten wir zeigen, dass auch ein Cumarinderivat, nämlich 6,7-Dihydroxycumarin (Äsculetin) ein Substrat für das Enzym darstellt. Durch Inkubation von Äsculetin mit einer gereinigten Enzym-Präparation aus Rattenleber entstanden in Gegenwart von S-Adenosylmethionin die stark fluoreszierenden Methyläther 7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin) und 6-Hydroxy-7-methoxycumarin (Isoscopoletin)¹⁵. Ausgehend von diesem Befund wurde inzwischen eine Bestimmungsmethode für die Catechol-O-Methyltransferase ausgearbeitet, die auf der fluorometrischen Bestimmung des in Gegenwart von S-Adenosylmethionin aus Äsculetin enzymatisch entstandenen Scopoletins beruht¹⁶.

In dieser Mitteilung wird die Möglichkeit aufgezeigt, das Enzymprotein nach elektrophoretischer Auftrennung im Polyacrylamid-Gel zu lokalisieren und zwar durch den fluorometrischen Nachweis des nach Inkubation mit Äsculetin und S-Adenosylmethionin entstandenen Scopoletins.

EXPERIMENTELLES

Substanzen

Acrylamid, N,N'-Methylen-bis-acrylamid, N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin, Ammoniumpersulfat (Bio-Rad Labs., Richmond, Calif., U.S.A.), S-Adenosylmethioninhydrogensulfat (Boehringer, Mannheim, B.R.D.), Tris(hydroxymethyl)-

* Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Thomas, Abteilung Biochemie I der Universität Ulm, Oberer Eselsberg N 26, D-7900 Ulm, B.R.D.

** S-Adenosyl-L-methionin: Catechol-O-Methyltransferase (E.C. 2.1.1.6).

aminomethan(Tris), 5,5-Diäthylbarbitursäure, 2-Mercaptoäthanol, Bromphenolblau (E. Merck, Darmstadt, B.R.D.) und Aluminiumoxid Woelm neutral, Aktivitätsgrad I (ICN Pharmaceuticals, Eschwege, B.R.D.) wurden in Form von Handelsprodukten verwendet. Äsculetin (6,7-Dihydroxycumarin; C. Roth, Karlsruhe, B.R.D.) wurde aus Aceton-Methylenchlorid umkristallisiert. Als Enzym-Präparation diente eine nach Axelrod und Tomchick² aus Rattenleber (männliche Sprague-Dawley-Ratten) angeereicherte Catechol-O-Methyltransferase-Präparation.

Lösungen

Verwendet wurden 0.5 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7.6), 0.1 M Magnesiumchlorid, 0.01 M L-Cystein, 6.0 mM S-Adenosylmethioninhydrogensulfat, 0.05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8.5), 10^{-5} M Äsculetin.

Ansatz für die Gelelektrophorese (pH 7.5, 7.0%)¹⁷

Drei Lösungen wurden zusammengestellt: Lösung 1 aus 48 ml 1 N HCl, 6.85 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan und 0.46 ml N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin ad 100 ml aqua bidest.; Lösung 2 aus 28 g Acrylamid und 0.8 g N,N'-Methylen-bis-acrylamid ad 100 ml aqua bidest.; Lösung 3 aus 0.1 g Ammoniumsulfat ad 100 ml aqua bidest.

Zur Präparation des Gels wurden die Lösungen 1, 2, 3 und aqua bidest. im Volumenverhältnis 1:2:4:1 gemischt. Als Elektrodenpuffer diente eine Lösung von 5.52 g Diäthylbarbitursäure, 1.0 g Tris und 0.78 g Mercaptoäthanol in 1 l aqua bidest (pH 7.0).

Durchführung der Elektrophorese und Aufarbeitung des Gels

Nach Polymerisation der Lösung (in Glasröhrchen von 100 mm Länge und 9 mm lichter Weite) erfolgte eine einstündige Vorelektrophorese. Dann wurden 200 μ l Catechol-O-Methyltransferase-Präparation (1 mg Protein pro ml), die mit Saccharose ad 10% versetzt waren, auf das Gel aufgetragen. Als Farbstofflösung zur Markierung der Pufferfront diente eine 0.01%-ige Bromphenolblau-Lösung. Die Elektrophorese wurde 1.5–2.5 h bei 4 mA pro Röhrchen (d.c. Power Supply, 3371 E; LKB) durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Rundgel mit einem Gelschneider in 2 mm dicke Scheibchen geschnitten. (Sie können, wenn nötig, über Nacht bei -30° aufbewahrt werden). Die einzelnen Scheibchen wurden mit 0.5 ml Phosphat-Puffer (pH 7.6) versetzt und bei 4° homogenisiert (Homogenisator Potter S; B. Braun, Melsungen, B.R.D.). Je 0.5 ml Homogenat wurden mit 50 μ l 0.1 M $MgCl_2$, 50 μ l 6.0 mM S-Adenosylmethioninhydrogensulfat, 100 μ l 0.01 M Cystein und 200 μ l 10^{-5} M Äsculetin versetzt und 2 h bei 37° im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion liess sich durch 5-minütiges Erhitzen im siedenden Wasserbad unterbrechen. Jede Probe wurde mit 4.0 ml 0.05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8.5) und 400 mg Aluminiumoxid versetzt. Nach 20-minütigem Schütteln wurde vom Aluminiumoxid abzentrifugiert. Die fluorometrische Messung des Überstandes erfolgte bei $\lambda_F = 465$ nm unter Anregung bei $\lambda_A = 390$ nm.

ERGEBNISSE

Wurden nach elektrophoretischer Auftrennung des Enzymproteins die Homogenate von Gelscheibchen mit Äsculetin und S-Adenosylmethioninhydrogensulfat

inkubiert, so liess sich nach entsprechender Aufarbeitung im Überstand Fluoreszenz nur dann einwandfrei nachweisen, wenn dem bei der Elektrophorese verwendeten Elektrodenpuffer Mercaptoäthanol zugesetzt worden war, wobei sich eine Konzentration von 10 mM besonders bewährt hat (Fig. 1). Dadurch, dass darüberhinaus bei der Elektrophorese ein Gel verwendet wurde, das Mercaptoäthanol (0.1 mM bzw. 1.0 mM im Gel) enthielt, wurde das Analysenergebnis nicht verbessert. Hingegen erwies sich eine Vorelektrophorese von 1 h im Hinblick auf den späteren Nachweis der Enzymaktivität als günstig (Fig. 1).

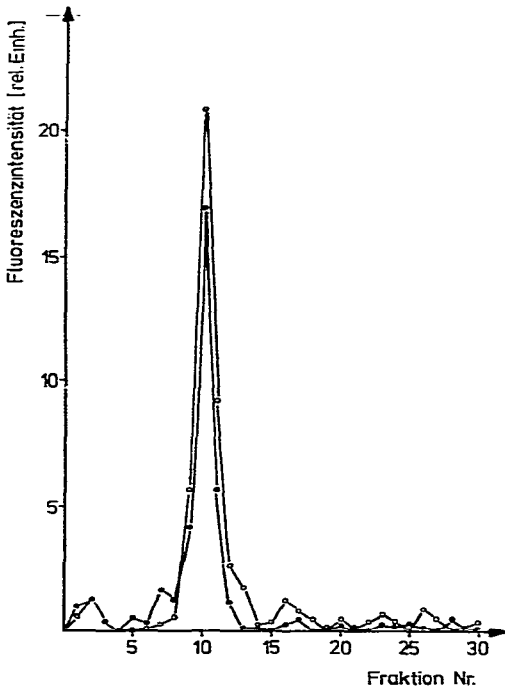


Fig. 1. Aktivitätsprofil der Catechol-O-Methyltransferase nach Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese. Gelsystem: pH 7.5, 7.0%. 10 mM Mercaptoäthanol im Elektrodenpuffer; Aufgetragen: 200 μ l Catechol-O-Methyltransferase-Präparation (200 μ g Protein); Stromstärke: 4 mA pro Röhrchen; Laufzeit: 2 h; Laufstrecke: 60 mm (30 Fraktionen à 2 mm). ●, Ohne Vorelektrophorese; ○, mit einstündiger Vorelektrophorese. Einzelheiten, s. Text.

Unter den geschilderten experimentellen Bedingungen (Gelsystem: pH 7.5, 7%) fand sich nur ein Aktivitätspeak. Die Wiederfindung der Enzymaktivität betrug im Mittel 40%.

DISKUSSION

Eine Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese der Catechol-O-Methyltransferase wurde von einer Reihe von Untersuchern durchgeführt. Nur wenige von ihnen konnten die Enzymaktivität im Gel nachweisen. Einige Autoren wandten eine radio-metrische Methode an. Dabei wurden beispielsweise Gel-Scheibchen bzw. Extrakte aus ihnen mit S-Adenosyl-[methyl- 14 C]L-methionin und einem Brenzkatechinderivat

als Substrat (Noradrenalin bitartrat¹⁸ bzw. Dopamin oder 3,4-Dihydroxybenzoesäure^{8,9}) inkubiert. Die Radioaktivität der aus den Ansätzen extrahierten O-Methyläther wurde im Scintillationszähler bestimmt. Frère und Verly⁶ benutzten als Substrat [¹⁴C]Noradrenalin. Das in Überständen aus homogenisierten Gelscheibchen enzymatisch entstandene Normetanephrin und Norparanephrin wurde mit Hilfe von NaJO₄ zu Vanillin bzw. Isovanillin oxydativ abgebaut und deren Radioaktivität bestimmt.

Anderson und D'Iorio³ verwandten zur Bestimmung der Enzymaktivität im Polyacrylamid-Gel eine Technik, die auf der enzymatischen O-Methylierung von Pyrocatecholphtalein beruht. Diese Technik ist nach Angaben anderer Untersucher⁹ relativ unempfindlich und nicht spezifisch.

Unter den in dieser Mitteilung angegebenen Elektrophorese-Bedingungen erwies sich das Aktivitätsprofil des Enzyms als einheitlich. Frère und Verly⁶ beobachteten nach Gel-Elektrophorese bei pH 8.3 zwei Aktivitätspeaks. Axelrod und Vesell¹⁸ fanden nach Stärke-Gel-Elektrophorese bei pH 8.6 ebenfalls zwei Gipfel der Enzymaktivität. Aber auch White und Wu⁹, die eine Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Catechol-O-Methyltransferase bei pH 6.9 und 7.9 durchführten, stellten fest, dass die Enzymaktivität im Gel bei diesen pH-Werten als ein einheitlicher Peak nachweisbar ist und machen darauf aufmerksam, dass zwei Gipfel der Enzymaktivität nur bei hohen pH-Werten gefunden werden, wobei der zweite Aktivitätspeak wohl auf eine oxydierte (möglicherweise dimere) Form des Enzyms zurückzuführen sei.

DANK

Fräulein H. Schmid und Frau S. Oza danken wir für die technische Assistenz.

LITERATUR

- 1 J. Axelrod, *Science*, 126 (1957) 400.
- 2 J. Axelrod und R. Tomchick, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 702.
- 3 P. J. Anderson und A. D'Iorio, *Biochem. Pharmacol.*, 17 (1968) 1943.
- 4 M. Assicot und C. Bohuon, *Eur. J. Biochem.*, 12 (1970) 490.
- 5 L. Flohé und K.-P. Schwabe, *Biochim. Biophys. Acta*, 220 (1970) 469.
- 6 J. M. Frère und W. G. Verly, *Biochim. Biophys. Acta*, 235 (1971) 73.
- 7 R. T. Borchardt, C.-F. Cheng und D. R. Thakker, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 63 (1975) 69.
- 8 G. Marzullo und A. J. Friedhoff, *Life Sciences*, 17 (1975) 933.
- 9 H. L. White und J. C. Wu, *Biochem. J.*, 145 (1975) 135.
- 10 P. J. Anderson und A. D'Iorio, *Can. J. Biochem.*, 44 (1966) 347.
- 11 H. Thomas und S. Roth, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 353 (1972) 138.
- 12 H. Thomas, D. Müller-Enoch und E. R. Lax, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 354 (1973) 1097.
- 13 P. Ball, R. Knuppen und H. Breuer, *Eur. J. Biochem.*, 21 (1971) 517.
- 14 P. Ball, R. Knuppen, M. Haupt und H. Breuer, *Eur. J. Biochem.*, 26 (1972) 560.
- 15 D. Müller-Enoch, E. Seidl und H. Thomas, *Z. Naturforsch.*, 31c (1976) 280.
- 16 H. Thomas, J. Vesper und D. Müller-Enoch, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 (1976) 1347.
- 17 H. R. Maurer und R. C. Allen, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 10 (1972) 220.
- 18 J. Axelrod und E. S. Vesell, *Mol. Pharmacol.*, 6 (1970) 78.