

6.7-Dihydroxycumarin (Aesculetin) als Substrat der Catechol-O-Methyltransferase

6,7-Dihydroxycoumarin (Aesculetin) as a Substrate for Catechol-O-methyltransferase

D. Müller-Enoch, E. Seidl und H. Thomas

Abteilung für Biochemie I, Universität Ulm

(Z. Naturforsch. 31 c, 280–284 [1976]; eingegangen am 27. Februar/18. März 1976)

Catechol-O-methyltransferase, Methylation of 6,7-Dihydroxycoumarin, Aesculetin

6,7-Dihydroxycoumarin (Aesculetin) was found to be a substrate of rat liver Catechol-O-methyltransferase (COMT) (EC 2.1.1.6).

Incubation of this substrate with S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine and/or S-Adenosyl-methionin-hydrogensulfate in the presence of COMT yields the highly fluorescent compounds 7-hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) and 6-hydroxy-7-methoxycoumarin (Isoscopoletin) in the ration of about 2:1. The O-methylated products obtained from Aesculetin were identified after separation by thin layer chromatography mainly by the reversed isotope dilution technique.

The fluorescence of the isolated methylethers was proportional to concentration within the range from 10^{-5} – 10^{-7} M. A reciprocal plot of activity versus substrate concentration gives a K_m of 1×10^{-6} M.

Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) gehört zu den wichtigsten Enzymen des Stoffwechsels der Catecholamine. Das Enzym überträgt eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin auf eine der beiden Hydroxylgruppen von Adrenalin¹, Noradrenalin², Dopamin² und anderen Brenzkatechinderivaten^{2–5}. In einer Untersuchung über neue potentielle Substrate für das Enzym wurde auch 6,7-Dihydroxycumarin (Aesculetin) getestet.

Es wurde gefunden, daß aus Aesculetin in Gegenwart von S-Adenosylmethionin durch die katalytische Wirksamkeit der COMT die Methylierungsprodukte 7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin) und 6-Hydroxy-7-methoxycumarin (Isoscopoletin) entstehen. Bei diesen Methylierungsprodukten handelt es sich um stark fluoreszierende Substanzen, die nach dünnenschichtchromatographischer Auftrennung fluorometrisch bestimmt werden können.

Material und Methoden

Substanzen und Enzympräparation

Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycumarin) (Fluka AG, Buchs), Isoscopoletin (6-Hydroxy-7-methoxycumarin) (C. Roth, Karlsruhe), S-Adenosyl-methionin-hydrogensulfat (Boehringer Mannheim GmbH) und S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionin

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Thomas, Abteilung für Biochemie I, Universität Ulm, Oberer Eselsberg N 26, D-7900 Ulm-Donau.

(Radiochemical Center, Amersham) mit einer spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol wurden in Form von Handelsprodukten verwendet. Aesculetin (6,7-Dihydroxycumarin) (C. Roth, Karlsruhe) wurde aus Aceton/Methylenchlorid umkristallisiert. Catechol-O-Methyltransferase wurde nach Axelrod und Tomchick² aus Rattenleber (männliche Sprague-Dawley-Ratten) bis einschließlich des Dialyse-Schritts auf das 11-fache angereichert, die dialysierte Lösung mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH = 6,9) bis zu einer Konzentration von 1 mg Protein/ml verdünnt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry⁶.

Lösungen

0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,6); 0,001 M Aesculetin in 0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,6); 0,5 M MgCl₂; 0,001 M S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat in 0,1 M Tris/HCl (pH = 7,6); S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionin, spez. Aktivität 60 mCi/mmol; 0,83 μmol/ml H₂SO₄ (pH = 2,5), Enzympräparation (s. o.).

Zur Identifizierung der Methylierungsprodukte dienten die folgenden Versuchsansätze:

Ansatz I: 0,1 μmol Aesculetin; 0,2 μmol S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat; 10 μmol MgCl₂; 70 μmol Tris/HCl und COMT-Präparation (entsprechend 0,4 mg Protein). Gesamtvolumen: 1,5 ml.

Ansatz II: 0,1 μmol Aesculetin; 0,1 μmol S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat; 0,1 μmol S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionin; 10 μmol



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

$MgCl_2$; 70 μmol Tris/HCl und COMT-Präparation (entsprechend 0,4 mg Protein).
Gesamtvolume: 1,5 ml.

Die Ansätze wurden 30 min in Schliffzentrifugen- gläsern bei 37 °C im Schüttelthermostaten inkubiert, die Reaktion durch Zusatz von je 0,5 ml 0,5 M HCl unterbrochen. Die Extraktion erfolgte dreimal mit 5 ml Chloroform.

Dünnschichtchromatographie

Die dünnschichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 (20×20 cm, 0,25 mm; Merck AG, Darmstadt). Im Falle von Ansatz I wurde je 1/3 des in Aceton gelösten Extrakttrockenrückstandes strichförmig (1 cm) aufgetragen und dreifach über eine Strecke von 15 cm in den Fließmittelsystemen Benzol/Eisessig/Wasser (2:2:1) (obere Phase) (A), Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure (5:4:1) (B) und Benzol/Dioxan/Eisessig (90:25:4) (C) chromatographiert. Die Lokalisation der getrennten Substanzen erfolgte visuell unter UV-Licht.

Im Falle von Ansatz II wurde der gesamte Extrakttrockenrückstand strichförmig (3 cm) aufgetragen und durch dreimalige Chromatographie in System A aufgetrennt.

Identifizierung

Im Radiodünnschichtchromatogramm (Dünnschichtscanner der Firma Berthold, LB 2723) zeigte sich ein Gipfel (Substanz I) in Höhe des authentischen Scopoletins und ein weiterer (Substanz II) in Höhe des Isoscopoletins. Die den Substanzen I und II entsprechenden Areale wurden mit Chloroform getrennt eluiert, die jeweiligen Eindampfrückstände wie oben beschrieben in System A rechromatographiert.

Die radioaktiven Zonen (Substanz I, Substanz II) wurden erneut von der Platte geschabt und mit Chloroform eluiert. Im Falle von Substanz I wurde 1/10 des Eluat-trockenrückstandes mit 13 mg authentischem Scopoletin, im Falle von Substanz II 1/5 des Eluat-trockenrückstandes mit 14 mg authentischem Isoscopoletin als „carrier“ versetzt. Die spezifische Aktivität ($\text{dpm}/\mu\text{mol}$) wurde jeweils berechnet und nach Umkristallisation des Produkts „carrier“-Gemisches aus Aceton/Petroläther neu bestimmt.

Die Fluoreszenzspektren wurden mit einem Fluoreszenz-Spektrophotometer Fluorispec Modell SF-100 (Baird-Atomic) gemessen. Zur Messung der Anregungs- und Fluoreszenzmaxima von Scopoletin und Isoscopoletin wurden 10^{-5} M Lösungen in Äthanol (Uvasol®), zur Messung von Metanephrihydrochlorid eine 10^{-5} M Lösung in 0,1 N HCl eingesetzt. Die angegebenen Fluoreszenzintensitäten

der authentischen Substanzen stellen relative Werte dar: die Fluoreszenzintensität der Scopoletin-Lösung wurde gleich 100 gesetzt. Die Anregung der Substanzen erfolgte im jeweiligen Anregungsmaximum.

Kinetische Untersuchungen

Zur Messung der Methylierungsrate des Substrates in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dienten Ansätze folgender Zusammensetzung: 0,2 μmol Aesculetin, 0,2 μmol S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat, 10 μmol $MgCl_2$, 40 μmol Tris/HCl und COMT-Präparation entsprechend 0,1 mg Protein; Gesamtvolume: 1 ml. Die Reaktionen wurden nach bestimmten Zeitabständen (s. Abb. 3) durch Zugabe von je 0,5 ml 0,5 M HCl unterbrochen. Die Extraktion erfolgte wie oben beschrieben mit Chloroform. Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung der Eluat-trockenrückstände in System A ließen sich die Methylierungsprodukte eluieren und fluorometrisch bestimmen.

Zur Bestimmung des K_m -Wertes dienten Ansätze mit Aesculetin-Mengen von 0,8 – 30 nmol, 0,1 bzw. 0,03 bzw. 0,5 μMol S-Adenosylmethionin-hydrogen-sulfat, 10 μmol $MgCl_2$, 0,2 ml COMT-Lösung (entsprechend 0,2 mg Protein), die mit 0,1 M Tris/HCl-Lösung ad 1 ml Gesamtvolume aufgefüllt wurden. Die Bestimmung der Methylierungsprodukte erfolgte nach einer Inkubationszeit von 2 min wie oben beschrieben.

Zur Messung der Methylierungsrate des Substrats in Abhängigkeit von der Enzymmenge dienten Ansätze mit Enzymmengen entsprechend 0,01 – 0,2 mg Protein, 0,2 μmol Aesculetin, 0,2 μmol S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat, 10 μmol $MgCl_2$, die mit 0,1 M Tris/HCl-Lösung ad 1 ml Gesamtvolume aufgefüllt wurden. Die Reaktionszeit betrug 30 min. Die Methylierungsprodukte wurden nach dünnschichtchromatographischer Isolierung fluorometrisch bestimmt.

Ergebnisse und Diskussion

Nach dünnschichtchromatographischer Auftrennung eines Aliquots des Extrakttrockenrückstandes von Ansatz I in den Systemen A, B und C ließen sich visuell unter UV-Licht jeweils außer dem Substrat zwei Reaktionsprodukte I und II lokalisieren, deren R_F -Werte mit denen von authentischem Scopoletin bzw. Isoscopoletin übereinstimmen (vgl. Tab. I).

Aus Tab. II geht hervor, daß sich mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik⁷ (Ansatz II s. o.) Substanz I als Scopoletin, Substanz II als Isoscopoletin identifizieren ließ, da zwischen den

Tab. I. Dünnschichtchromatographische Identifizierung der nach Inkubation von Aesculetin mit einer COMT-Präparation entstandenen Methylierungsprodukte **I** und **II**. Es wurde jeweils eine dreimalige Chromatographie auf DC-Fertigplatten Kieselgel (20×20 cm, 0,25 mm) durchgeführt. Lösungsmittelsysteme: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase) (System A), Toluol/Äthylformiat/Ameisensäure 5:4:1 (System B), Benzol/Dioxan/Eisessig 90:25:4 (System C).

Lösungs- mittel- system	Substrat Aescu- letin	RF-Werte			
		Authen- tisches Scopoletin	Produkt I	Authen- tisches Isosco- poletin	Pro- dukt II
A	0,05	0,44	0,43	0,28	0,28
B	0,35	0,59	0,59	0,53	0,53
C	0,26	0,63	0,63	0,54	0,54

berechneten und gefundenen Werten für die spezifische Aktivität ($dpm/\mu\text{mol}$) eine gute Übereinstimmung besteht und die spezifische Aktivität nach den

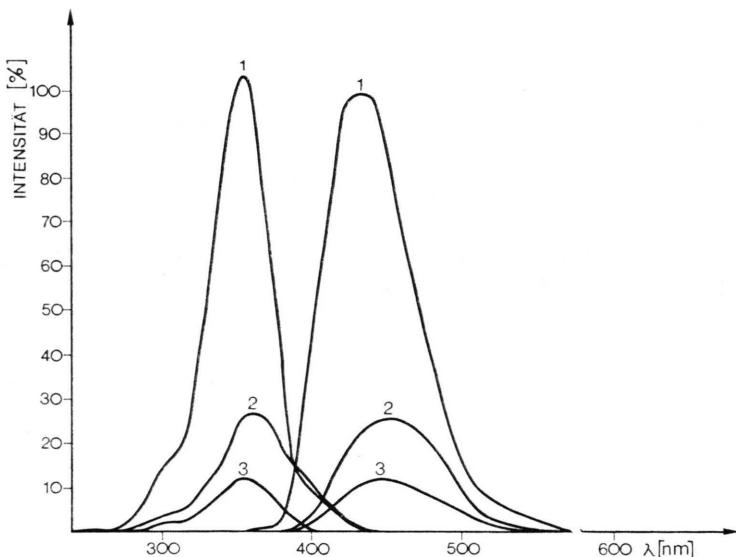


Abb. 1. Anregungs- und Fluoreszenzspektren von Scopoletin (1), Aesculetin (2) und Isoscoletin (3). Baird-Atomic-Spectrophotofluorometer SF-100. Lösungen: 10^{-5} M in Äthanol
Scopoletin (1): $\lambda_A = 355 \text{ nm}$,
 $\lambda_F = 440 \text{ nm}$;
Aesculetin (2): $\lambda_A = 360 \text{ nm}$,
 $\lambda_F = 450 \text{ nm}$;
Isoscoletin (3): $\lambda_A = 355 \text{ nm}$,
 $\lambda_F = 445 \text{ nm}$.

Die Wellenlängenangaben stellen unkorrigierte Instrumentenablesungen dar. Die relativen Fluoreszenzintensitäten betragen, bezogen auf die gleich 100 gesetzte Intensität der Scopoletin-Lösung, für Aesculetin 26,6% und für Isoscoletin 12,5%. (Für eine 10^{-5} M Metanephrin-hydrochlorid-Lösung in 0,1 N HCl ($\lambda_A = 285 \text{ nm}$, $\lambda_F = 330 \text{ nm}$) beträgt die relative Fluoreszenzintensität 0,4%).

Tab. II. Identifizierung der Methylierungsprodukte **I** und **II** mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Einer definierten Menge ^{14}C -Aktivität wurde eine bestimmte Menge (s.u.) der authentischen, nicht markierten Verbindung zugesetzt. Außerdem wurde das Produkt **I** mit Isoscoletin, das Produkt **II** mit Scopoletin versetzt. Die spezifische Aktivität ($dpm/\mu\text{mol}$) wurde berechnet und nach jeder Kristallisation aus dem Lösungsmittelgemisch Aceton/Petroläther im Tri-Carb-Szintillationszähler bestimmt.

^{14}C -Methylierungs- produkt	Zugesetzter „Carrier“	Berechnet	Spez. Aktivität [$dpm/\mu\text{mol}$]				
			1	2	3	4	5
I	13 mg Scopoletin	1595	1501	1421	1430	1434	1445
II	14 mg Isoscoletin	895	879	870	839	827	832
I	14 mg Isoscoletin	1480	112	90	45	24	16
II	13 mg Scopoletin	960	169	63	37	18	14

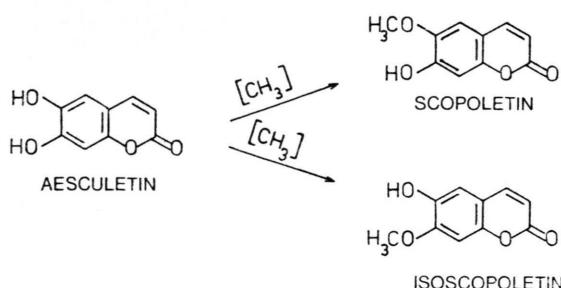


Abb. 2. Catechol-O-Methyltransferase aus Rattenleber katalysiert die Methylierung von Aesculetin (6,7-Dihydroxycumarin) zu Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycumarin) und Isoscopoletin (6-Hydroxy-7-methoxycumarin). Methyldonor: S-Adenosylmethionin.

von der Substanzmenge im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-7} mol/l, so daß eine fluorometrische Bestimmung in diesem Bereich möglich war. Unter den angewandten Versuchsbedingungen entstanden die beiden Isomeren (Scopoletin : Isoscopoletin) im Mittel im Mengenverhältnis von 2:1.

Die Hydroxylgruppe in Position 6 wird also bevorzugt methyliert. Aesculetin kann als innerer Ester der 3,4,6-Trihydroxyzimtsäure aufgefaßt werden. Die Hydroxylgruppen in Position 6 bzw. 7 des Aesculetins entsprechen somit den OH-Gruppen in Position 3 bzw. 4 der 3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure). Aus Kaffeesäure entsteht durch die katalytische Wirksamkeit der COMT neben 3-Hydroxy-4-methoxyzimtsäure als Hauptmethylierungsprodukt 4-Hydroxy-3-methoxyzimtsäure⁸. Es erfolgt also auch hier eine bevorzugte Methylierung der Hydro-

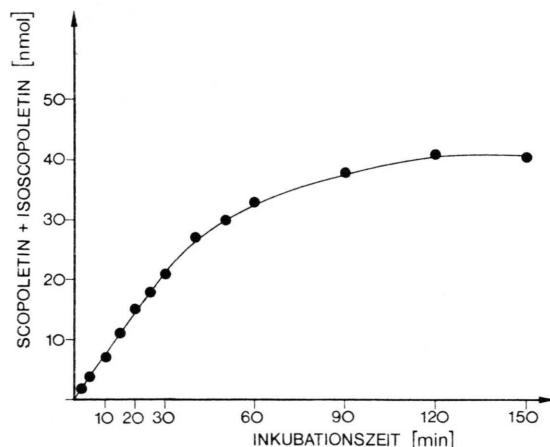


Abb. 3. Zeitkurve der Methylierung von Aesculetin durch die COMT-Präparation. In der Ordinate ist die Summe der gebildeten Mengen von Scopoletin und Isoscopoletin angegeben (Einzelheiten s. Text).

xylgruppe, die der OH-Gruppe in Position 6 des Aesculetins entspricht. In diesem Zusammenhang ist erwähnenswert, daß im Falle von 3,4-Dihydroxyphenyl-Verbindungen das Ausmaß der 3-O-Methylierung in Relation zur 4-O-Methylierung von der Struktur der Seitenkette des jeweiligen Substrats abhängig ist⁹.

Die Zeitkurve für die Methylierung von Aesculetin ist in Abb. 3 wiedergegeben. Unter den angegebenen Bedingungen verläuft die Reaktion linear in den ersten 20 min.

Die Abhängigkeit der Methylierungsrate von der Enzymmenge zeigt Abb. 4. Die Menge der methylierten Produkte (Scopoletin + Isoscopoletin) steigt in dem untersuchten Bereich mit der Enzymmenge linear an.

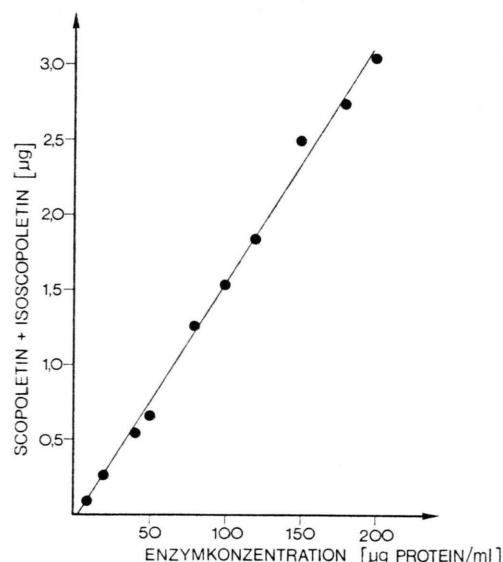


Abb. 4. Abhängigkeit der Methylierungsrate des Substrats von der Enzymkonzentration (μg Protein/ml). In der Ordinate ist die Summe der gebildeten Mengen von Scopoletin und Isoscopoletin angegeben (Einzelheiten s. Text).

Auch für die Ermittlung der Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von der Substratkonzentration diente als Grundlage die fluorometrische Bestimmung der dünnenschichtchromatographisch getrennten Methylierungsprodukte Scopoletin und Isoscopoletin. Abb. 5 zeigt die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in doppeltreziproker Auftragung nach Lineweaver und Burk. Der aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der Abszisse ermittelte K_m -Wert beträgt

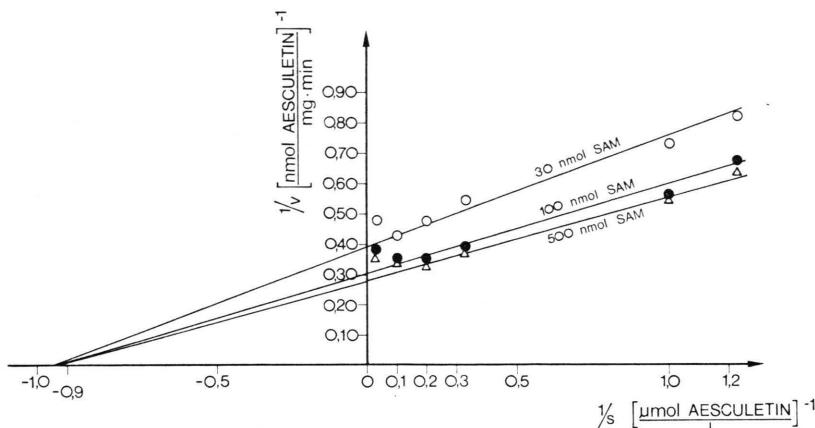


Abb. 5. Abhängigkeit der Geschwindigkeit der Methylierungsreaktion von der Substratkonzentration in Gegenwart verschiedener S-Adenosylmethionin-Konzentrationen: Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk. Jeweils 0.2 ml der Enzympräparation (entsprechend 0,2 mg Protein) wurden mit steigenden Mengen Aesculetin und verschiedenen S-Adenosylmethionin-Konzentrationen inkubiert. ○, 30 nmol; ●, 100 nmol; △, 500 nmol S-Adenosylmethionin (SAM).

1×10^{-6} mol/l. Verschieden hohe Konzentrationen von S-Adenosylmethionin beeinflussen die Geschwindigkeit der Reaktion, nicht jedoch den K_m -Wert für Aesculetin. Dieser Wert ist um 2 Zehnerpotenzen kleiner als der für Adrenalin als Substrat bestimmte

K_m -Wert². Das Enzym weist somit eine größere Affinität zu Aesculetin als zu Adrenalin auf.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Fräulein S. Hildenbrand sei für die gewissenschaftliche Mitarbeit gedankt.

¹ J. Axelrod, Science **126**, 400 [1957].

² J. Axelrod u. R. Tomchick, J. Biol. Chem. **233**, 702 [1958].

³ P. J. Anderson u. A. D'Irio, Canadian J. Biochem. **44**, 347 [1966].

⁴ H. Thomas u. S. Roth, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 138 [1972].

⁵ H. Thomas, D. Müller-Enoch u. E. R. Lax, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **354**, 1097 [1973].

⁶ O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr u. R. J. Randall, J. Biol. Chem. **193**, 265 [1951].

⁷ L. R. Axelrod, Ch. Matthijsse, J. W. Goldzieher u. J. E. Pulliam, Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl. **99** [1965].

⁸ M. S. Masri, A. N. Booth u. F. DeEds, Biochim. Biophys. Acta **65**, 495 [1962].

⁹ C. R. Creveling, N. Dalgard, H. Shimizu u. J. W. Daly, Mol. Pharmacol. **6**, 691 [1970].