

O-Methylierung von Adrenalin, 3,4-Dihydroxybenzoesäure und 6,7-Dihydroxycoumarin in Sproßpilzen

O-Methylation of Epinephrine, 3,4-Dihydroxybenzoic Acid and 6,7-Dihydroxycoumarin in Yeasts

D. Müller-Enoch, H. Thomas, W. Streng

Abteilung für Biochemie I, Universität Ulm

und W. Wildfeuer und O. Haferkamp

Abteilung Pathologie, Universität Ulm

(Z. Naturforsch. 31 c, 509–513 [1976]; eingegangen am 16. Juni/26. Juli, 1976)

O-Methylation, Catechols, Yeasts

In the yeasts *C. albicans*, *C. tropicalis*, and *C. stellatoidea* but not in *C. krusei*, *R. rubra*, and *S. cerevisiae* enzyme activity was found by which — as by the catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) found in the liver — the O-methylation of epinephrine to metanephrine and paranephrine, of 3,4-dihydroxybenzoic acid to 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid and 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid, and of 6,7-dihydroxycoumarin to 7-hydroxy-6-methoxycoumarin and 6-hydroxy-7-methoxycoumarin is catalysed.

When the substrates 3,4-dihydroxybenzoic acid, or 6,7-dihydroxycoumarin or epinephrine were incubated in the presence of S-adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]methionine and S-adenosylmethionine hydrogensulfate with a 100 000×g supernatant of *C. albicans*, *C. tropicalis* or *C. stellatoidea* the corresponding O-methylethers were detected in the extracts of the incubation medium by thin-layer chromatography.

Final identification of the isomeric radioactive O-methylethers obtained from 3,4-dihydroxybenzoic acid and 6,7-dihydroxycoumarin was performed after thin-layer chromatographic separation by the reversed isotope dilution technique.

The radioactive *m*- and *p*-O-methyl derivatives from epinephrine were separated by thin-layer chromatography and then cleaved with periodate to the corresponding aldehydes which were also identified mainly by the reversed isotope dilution technique.

Ein wichtiger Stoffwechselweg von Adrenalin und Noradrenalin, der praktisch eine pharmakologische Inaktivierung der Hormone bedeutet, führt über eine enzymatische O-Methylierung. Das Enzym, das diese Methylierung katalysiert, die Catechol-O-Methyltransferase (EC 2.1.1.6)¹ wurde 1958 von Axelrod und Tomchick² aus Rattenleber (auf das 30-fache) angereichert. Das Enzym überträgt eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin auf eine der beiden Hydroxylgruppen von Adrenalin¹, Noradrenalin², Dopamin² und anderen 3,4-Dihydroxyphenylderivaten^{2–6}, wie z. B. 3,4-Dihydroxybenzoesäure⁵. Es katalysiert auch die Methylierung von 2-Hydroxyöstrogenen^{7,8} sowie von 6,7-Dihydroxycoumarin (Aesculetin)⁹.

Das Enzym kommt in verschiedenen Organen aller bisher untersuchten Tierarten vor. Eine Catechol-O-Methyltransferase, die wie die aus Rattenleber eine Methylierung vornehmlich der *meta*-stän-

digen OH-Gruppe von Brenzkatechin-Derivaten bewirkt, wurde auch in Pflanzen gefunden¹⁰. Durch unsere Untersuchungen wird nachgewiesen, daß in den Sproßpilzen *Candida albicans*, *Candida tropicalis* CBS 94 und *Candida stellatoidea* CBS 1905 enzymatische Aktivität existiert, mittels der, wie durch die Catechol-O-Methyltransferase der Rattenleber, eine Methylgruppe vom S-Adenosylmethionin auf die *meta*- bzw. *para*-ständige Hydroxylgruppe von Adrenalin und 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure) übertragen wird. In den genannten Sproßpilzen kann ebenfalls eine Methylierung von 6,7-Dihydroxycoumarin (Aesculetin) zu 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) und 6-Hydroxy-7-methoxycoumarin (Isoscapoletin) erfolgen.

Material und Methoden

Substanzen

Folgende Substanzen wurden als Handelsprodukte verwendet: L-Adrenalin-bitartrat (Calbiochem, Los Angeles „B Grade“), D,L-Metanephrin-hydro-

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



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 digitalized 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.

chlorid (Calbiochem, Los Angeles „B Grade“), 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure) (Fluka AG, Buchs), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure) (Dr. T. Schuchardt, München), 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) (Merck AG, Darmstadt), 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (Isovanillin) (C. Roth, Karlsruhe), 7-Hydroxy-6-methoxycumarin (Scopoletin) (Fluka AG, Buchs) und 6-Hydroxy-7-methoxycumarin (Isoscapoletin) (C. Roth, Karlsruhe), S-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat (Boehringer Mannheim GmbH) und S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin (Radiochemical Center, Amersham) mit einer spezifischen Aktivität von 60 mCi/mmol. 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure) wurde aus Isovanillin in Analogie zur Darstellung von Vanillinsäure aus Vanillin¹¹ synthetisiert. 6,7-Dihydroxycumarin (Aesculetin) (C. Roth, Karlsruhe) wurde aus Aceton/Methylenchlorid umkristallisiert.

Sproßpilze

Sechs verschiedene Sproßpilzarten wurden in die Untersuchungen einbezogen: *Candida albicans*, *Candida tropicalis* CBS 94, *Candida stellatoidea* CBS 1905, *Candida krusei* CBS 537, *Rhodotorula rubra* 49 und *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. Die Pilzstämme wurden 3 Tage auf Sabouraud-Glucose 4% Agar (Merck AG, Darmstadt) angezüchtet, in physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert, die Dichte der Suspension wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Je 1 ml der eingestellten Keimsuspension wurde in einen Erlenmeyer-Kolben mit 50 ml Sabouraud-Glucose 2%-Bouillon (Merck AG, Darmstadt) gegeben. Die Dichte der Pilze betrug schließlich 1×10^3 Zellen/ml Medium. Nach Zugabe von Aesculetin sowie S-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat (Ansatz III, s. u.) wurden die Kolben mit Aluminiumfolie verschlossen und im Schüttelwasserbad bei 37 °C über 72 Stunden inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten (1, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72 Stunden) wurden Proben von 0,5 ml entnommen und die Zahl der Pilzzellen auf Sabouraud-Agar ermittelt. Gleichzeitig wurden 1,0-ml-Proben zur Bestimmung der Methylierungsrate entnommen (s. u.).

Von den Spezies *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. stellatoidea* wurde — für Inkubationsansätze mit Adrenalinbitartrat oder Protocatechusäure — außerdem das Zytoplasma (Ansatz II, s. u.) gewonnen. Für diese Präparation wurden die Pilze in jeweils 3 l Sabouraud-Bouillon 2 Tage bei 37 °C im Schüttelwasserbad angezüchtet, anschließend 30 min bei $2500 \times g$ (4 °C) abzentrifugiert und mit kaltem 0,2 M Saccharose-Puffer (pH 7,4) gewaschen. Das Zellsediment ließ sich im 3-fachen Volumen Puffer aufnehmen, je 10 ml wurden auf Flaschen mit 10 g

sterilen Glasperlen (ϕ 0,17 mm, Braun Melsungen) verteilt. Diese Pilzzellen-Glasperlen-Suspension wurde unter ständiger CO_2 -Kühlung 21 min im Desintegrator (Braun Melsungen) behandelt. Innerhalb dieser Zeit ließen sich etwa 90% der Pilzzellen desintegrieren. Durch Zentrifugation dieses Homogenates (30 min, $2000 \times g$, 4 °C) wurde das Zytoplasma im Überstand angereichert und schließlich das Supernat durch Ultrazentrifugation (2 Stunden, $100\,000 \times g$, 4 °C) von Zellmembranen und klein-korpuskulären Zellbestandteilen gereinigt.

Inkubationsansätze

Lösungen

0,1 M Tris/HCl-Puffer (pH = 7,6), 0,1 M MgCl_2 , 0,5 M Phosphatpuffer nach Sørensen (pH = 7,9), S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin, spez. Aktivität 60 mCi/mmol, 0,83 $\mu\text{mol/ml}$ H_2SO_4 (pH = 2,5), 10^{-3} M S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat.

Zur Identifizierung der Methylierungsprodukte dienten Inkubationsansätze folgender Zusammensetzung:

Ansatz I

Je 50 ml Pilzsuspension von *C. albicans*, *C. tropicalis* bzw. *C. stellatoidea* (1×10^3 Zellen/ml Medium) wurden 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Zahl der Sproßpilze erhöhte sich dabei auf $8,5 \times 10^5$ (*C. stellatoidea*), $8,2 \times 10^6$ (*C. tropicalis*) bzw. 9×10^6 (*C. albicans*) Zellen/ml Medium. Sodann wurden hinzugefügt: 4,45 mg (25 μmol) Aesculetin, 12,4 mg (25 μmol) S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat, 0,28 μmol S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin, 100 μmol MgCl_2 .

Ansatz II

10 ml $100\,000 \times g$ Überstand von *C. albicans*, *C. tropicalis* bzw. *C. stellatoidea* (entsprechend 17,8 bzw. 49,9 bzw. 14,7 mg Protein/ml) wurden mit 3,33 mg (10 μmol) Adrenalin-bitartrat bzw. 1,54 mg (10 μmol) Protocatechusäure, 4,96 mg (10 μmol) S-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat, 0,84 μmol S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin (50 μCi) und 2,5 mmol Phosphatpuffer inkubiert. Gesamtvolumen 16 ml.

Die Methylierung von Aesculetin sowie das Wachstum der Pilze in Abhängigkeit von der Zeit wurde in Ansätzen folgender Zusammensetzung bestimmt:

Ansatz III

50 ml Pilzsuspensionskulturen, die *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. krusei*, *R. rubra* oder *S. cerevisiae* (1×10^3 Zellen/ml Medium) enthiel-

ten, wurden mit folgenden Zusätzen inkubiert: 4,45 mg (25 μ mol) Aesculetin, 12,4 mg (25 μ mol) S-Adenosylmethionin-hydrogensulfat, 100 μ mol $MgCl_2$.

Aufarbeitung

Die mit Aesculetin inkubierten Pilzsuspensionskulturen (Ansatz I) wurden nach 24 Stunden Reaktionszeit mit 2 ml konz. HCl und 5 g NaCl versetzt. Die Extraktion der Methylierungsprodukte erfolgte 3-mal mit 30 ml Chloroform. Die Eindampfrückstände wurden dünn-schichtchromatographisch in System A (s. u.) aufgetrennt.

Die mit Protocatechusäure inkubierten Ansätze (s. Ansatz II) wurden nach 1-stündiger Reaktionszeit mit 1 ml konz. HCl und 2 g NaCl versetzt. Die Extraktion erfolgte 3-mal mit 15 ml Essigsäureäthylester. Die Eindampfrückstände wurden dünn-schichtchromatographisch in System A (s. u.) aufgetrennt. Die mit Adrenalin inkubierten Ansätze (s. Ansatz II) wurden nach 1-stündiger Reaktionszeit mit 10 ml 0,5 M Boratpuffer (pH = 10) versetzt und 2-mal mit 20 ml gereinigtem Isopentylalkohol extrahiert. Die vereinigten Extrakte wurden mit 7 ml 0,1 N HCl re-extrahiert. Der Eindampfrückstand wurde dünn-schichtchromatographisch in System B (s. u.) aufgetrennt. Den mit Aesculetin inkubierten Pilzsuspensionskulturen der 6 verschiedenen Spezies (Ansatz III) wurden nach 1, 3, 6, 8, 12, 24, 48, 72 Stunden außer den 0,5 ml-Proben zur Bestimmung der Zahl der Pilzzellen Proben von 1 ml entnommen. Nach Zusatz von 0,5 ml 1 N HCl extrahierte man mit 5 ml Chloroform. Die Eindampfrückstände wurden dünn-schichtchromatographisch in System A (s. u.) aufgetrennt. Die unter UV-Licht lokalisierten Zonen von Scopoletin und Isoscopoletin wurden von der Platte geschabt und mit je 5 ml Chloroform extrahiert, die Eindampfrückstände mit je 3 ml Äthanol aufgenommen und fluorometrisch (Scopoletin: $\lambda_A = 355$ nm, $\lambda_F = 440$ nm; Isoscopoletin: $\lambda_A = 355$ nm, $\lambda_F = 445$ nm) bestimmt⁹ (Fluoreszenz-Spektrophotometer Fluorispec Modell SF-100 (Baird-Atomic)).

Dünn-schichtchromatographie

Die dünn-schichtchromatographische Auftrennung erfolgte auf DC-Fertigplatten Kieselgel 60 bzw. Kieselgel 60 F₂₅₄ (20 × 20, 0,25 mm; Merck AG, Darmstadt). Die folgenden Fließmittel wurden verwendet: Benzol/Eisessig/Wasser (2:2:1) (obere Phase) (A) (zweimalige Chromatographie über eine Strecke von 15 cm) und *n*-Butanol/Essigsäureäthylester/Amoniaklösung (25%; 0,91) (3:1:1) (B) (einmalige Chromatographie über eine Strecke von 15 cm). Die Lokalisation der Substanzen erfolgte visuell

unter UV-Licht. Radiodünn-schichtchromatogramme wurden mit einem Dünn-schichtscanner der Firma Berthold (LB 2723) aufgenommen.

Identifizierung

Sie erfolgte außer durch Dünn-schichtchromatographie mittels der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Die Eindampfrückstände der mit Aesculetin inkubierten Pilzsuspensionskulturen von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. stellatoidea* (Ansatz I) wurden strichförmig (8 cm) auf Dünn-schichtplatten aufgetragen und 2-mal in System A chromatographiert. Anschließend wurde ein Radiodünn-schichtchromatogramm aufgenommen. Die radioaktiven Zonen, deren R_F -Werte denen von authentischem Scopoletin (1) bzw. Isoscopoletin (2) entsprachen, ließen sich mit Chloroform eluieren. 1/10 des Eluats diente zur ¹⁴C-Aktivitätsbestimmung im Szintillationszähler. Mit den verbleibenden 9/10 wurde die umgekehrte Isotopenverdünnungstechnik¹² durchgeführt. Die Umkristallisationen erfolgten aus Aceton/Petroläther.

Die Eindampfrückstände der mit Protocatechusäure inkubierten Ansätze (100 000 × g-Überstand von *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. stellatoidea*) (Ansatz II) wurden analog behandelt. Allerdings erfolgte die Elution der radioaktiven Zonen, die sich bezüglich der R_F -Werte wie Vanillinsäure (3) bzw. Isovanillinsäure (4) verhielten, mit Methanol.

Der Eindampfrückstand eines mit Adrenalin-bitartrat inkubierten Ansatzes (Ansatz II; *C. albicans*) wurde dünn-schichtchromatographisch in System B aufgetrennt. Die radioaktive Substanzzone, die im Radiodünn-schichtchromatogramm den gleichen R_F -Wert wie authentisches Metanephrin aufwies, wurde in System B rechromatographiert. Die dem Metanephrin (5) entsprechende Substanzzone wurde von der Platte geschabt und mit Methanol eluiert. 1/10 des Eluatrockenrückstandes diente zur ¹⁴C-Aktivitätsbestimmung. Mit den verbleibenden 9/10 wurde nach Zusatz von 22 mg authentischem Metanephrinhydrochlorid die umgekehrte Isotopenverdünnungstechnik durchgeführt. Die Umkristallisationen erfolgten aus Methanol/Essigsäureäthylester.

Daß bei den Inkubationen neben Metanephrin auch Paraneprhin entsteht, wurde wie folgt bewiesen: Die Eindampfrückstände von drei mit Adrenalin-bitartrat inkubierten Ansätzen (Ansatz II; *C. albicans*, *C. tropicalis* oder *C. stellatoidea*) wurden dünn-schichtchromatographisch in System B aufgetrennt. Die radioaktiven Substanzzonen, die im Radiodünn-schichtchromatogramm den gleichen R_F -Wert wie Metanephrin (0,35) aufwiesen sowie jeweils eine weitere radioaktive Substanzzone mit

dem R_F -Wert 0,27 wurden mit Methanol getrennt eluiert. Die Eindampfrückstände wurden nach Pissano *et al.*¹³ mit Natrium-meta-perjodat umgesetzt. Die Oxydationsprodukte ließen sich mit Toluol extrahieren und getrennt in System A chromatographieren. Auf den Radiodünnschichtchromatogrammen zeigten sich Zonen mit dem R_F -Wert von 4-Hydroxy-3-methoxybenzaldehyd (Vanillin) (6) bzw. 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd (Isovanillin) (7). Die radioaktiven Zonen wurden eluiert. Auch hier diente 1/10 des jeweiligen Eluatrockenrückstandes zur ^{14}C -Aktivitätsbestimmung. Die verbleibenden 9/10 versetzte man mit einer definierten Menge Vanillin bzw. Isovanillin als „carrier“. Anschließend wurde die umgekehrte Isotopenverdünnungstechnik durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Aus Tab. I geht hervor, daß sich mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik die Methylierungsprodukte wie folgt identifizieren ließen: 1 als Scopoletin, 2 als Isoscopoletin, 3 als Vanillinsäure, 4 als Isovanillinsäure, 5 als Metanephrin, 6 als Vanillin, 7 als Isovanillin; denn zwischen den berechneten und gefundenen Werten für die spezifische Aktivität (dpm/mg) besteht eine gute Übereinstimmung, und sie bleibt nach den verschiedenen Kristallisationen konstant.

Aus der Tabelle geht ebenfalls hervor, daß auch im Falle von Vanillin und Isovanillin das Verfahren auf die Identifizierung der beiden Isomeren anwendbar ist, da bei Zusatz von Vanillin zu 7 und von Isovanillin zu 6 unter der Kristallisation die spezifische Aktivität schnell absinkt. (Daß das Ver-

fahren auf die Identifizierung der Isomeren Scopoletin und Isoscopoletin bzw. Vanillinsäure und Isovanillinsäure anwendbar ist, wurde in früheren Arbeiten^{6, 9} bewiesen.)

Es ist also festzuhalten, daß die Sproßpilze *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. stellatoidea* über enzymatische Aktivität verfügen, durch die, wie durch die Catechol-O-Methyltransferase der Leber die Methylierung von Aesculetin zu Scopoletin und Isoscopoletin, von Adrenalin zu Metanephrin und Paraneprhin und von Protocatechusäure zu Vanillinsäure und Isovanillinsäure katalysiert wird.

Abb. 1 zeigt die Zeitkurve der Methylierung von Aesculetin in Kulturen von *C. albicans*, *C. tropicalis*

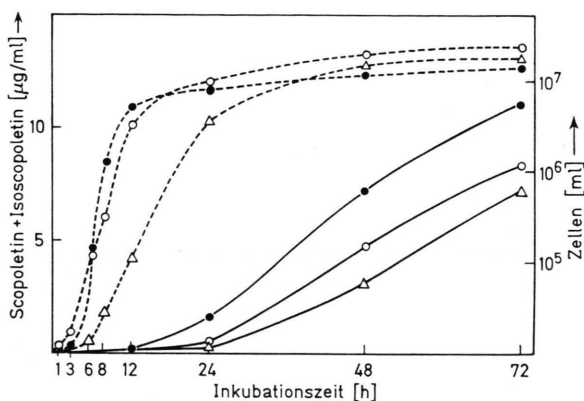


Abb. 1. Zeitkurve der Methylierung von Aesculetin in Kulturen von *C. albicans* (—○—○—), *C. tropicalis* (—●—●—) und *C. stellatoidea* (—△—△—) — in der Ordinate ist die Summe der Methylierungsprodukte Scopoletin und Isoscopoletin aufgetragen — im Vergleich zu den Wachstumskurven von *C. albicans* (---○---), *C. tropicalis* (---●---) und *C. stellatoidea* (---△---).

Tab. I. Identifizierung der Methylierungsprodukte 1 bis 7 (Inkubationen mit *C. albicans*) mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik. Einer definierten Menge ^{14}C -Aktivität wurde eine bestimmte Menge (s. u.) der authentischen, nicht markierten Verbindung zugesetzt. Darüberhinaus wurde das Methylierungsprodukt 6 mit Isovanillin und das Methylierungsprodukt 7 mit Vanillin versetzt. Die spezifische Aktivität (dpm/mg) wurde berechnet und nach jeder Umkristallisation aus den Lösungsmittelgemischen Aceton/Petroläther bzw. Methanol/Essigsäureäthylester (Methylierungsprodukt 5) im Tri-Carb-Szintillationszähler bestimmt.

^{14}C -Methylierungsprodukt	Zugesetzter „Carrier“	Berechnet	Spezifische Aktivität [dpm/mg] Gefunden nach Kristallisation				
			1	2	3	4	5
1	20 mg Scopoletin	2520	2469	2336	2050	2074	2064
2	20 mg Isoscopoletin	418	361	335	353	365	348
3	20 mg Vanillinsäure	1341	1275	1258	1197	1234	1195
4	20 mg Isovanillinsäure	459	396	358	343	339	337
5	25 mg Metanephrinhydrochlorid	620	575	527	489	488	485
6	16 mg Vanillin	1695	1607	1587	1575	1558	1568
7	16 mg Isovanillin	783	763	737	718	708	712
6	16 mg Isovanillin	1288	436	155	68	50	30
7	16 mg Vanillin	450	38	26	17	10	7

Tab. 2. Verhältnis der nach Inkubation von Adrenalin, Protocatechusäure und Aesculetin mit Enzympräparationen aus *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* und Rattenleber entstandenen stellungsisomeren Methyläther, ermittelt durch ^{14}C -Aktivitätsbestimmung im Scintillationszähler. Im Falle von Metanephrin und Paraneprhin erfolgte die Bestimmung der radioaktiven Oxydationsprodukte Vanillin und Isovanillin (Einzelheiten s. Text).

Enzympräparation (100 000×g Überstand)	Substrate		
	Adrenalin	Protocatechusäure	Aesculetin
	Metanephrin : Paraneprhin	Vanillinsäure : Isovanillinsäure	Scopoletin : Isoscapoletin
<i>C. albicans</i>	2,3 : 1	2,5 : 1	6,5 : 1
<i>C. tropicalis</i>	1,9 : 1	1,6 : 1	8,0 : 1
<i>C. stellatoidea</i>	0,8 : 1	2,7 : 1	6,3 : 1
Rattenleber	11,0 : 1	5,0 : 1	2,0 : 1

und *C. stellatoidea* im Vergleich zu den entsprechenden Wachstumskurven. In wachsenden Kulturen von *C. krusei*, *R. rubra* und *S. cerevisiae* fand keine Methylierung statt.

In Tab. II ist das jeweilige Verhältnis *meta*-O-Methylierung/*para*-O-Methylierung bzw. 6-O-Methylierung/7-O-Methylierung der verschiedenen Substrate für *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. stellatoidea* im Vergleich zu dem jeweiligen mit einer gereinigten Catechol-O-Methyltransferase-Präparation aus Rattenleber erzielten Verhältnis aufgeführt.

Mit Adrenalin als Substrat beträgt dieses *meta/para*-Verhältnis im Falle der Inkubation mit Sproßpilzen etwa 2:1 (*C. albicans*, *C. tropicalis*) bzw. etwa 1:1 (*C. stellatoidea*), im Falle der Inkubation mit einer gereinigten Enzym-Präparation aus Rat-

tenleber jedoch 11:1. Auch nach entsprechenden Inkubationen mit Protocatechusäure als Substrat ergab sich gegenüber der Inkubation mit der Enzym-Präparation eine Verschiebung des *meta/para*-Verhältnisses zugunsten der Methylierung der *para*-ständigen Hydroxylgruppe.

Nach den Inkubationen mit Aesculetin betrug das Verhältnis 6-O-Methylierung/7-O-Methylierung 6,5:1 (*C. albicans*), 8:1 (*C. tropicalis*) und 6,3:1 (*C. stellatoidea*). Auch nach Inkubation einer Catechol-O-Methyltransferase-Präparation mit Aesculetin⁹ zeigte sich eine bevorzugte Methylierung der Hydroxylgruppe in Position 6.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe, Fräulein S. Hildenbrand sei für die gewissenhafte 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, Can. 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 H. Thomas, D. Müller-Enoch u. S. Roth, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. **353**, 1894 [1972].

⁷ P. Ball, R. Knuppen u. H. Breuer, Eur. J. Biochem. **21**, 517 [1971].

⁸ P. Ball, R. Knuppen, M. Haupt u. H. Breuer, Eur. J. Biochem. **26**, 560 [1972].

⁹ D. Müller-Enoch, E. Seidl u. H. Thomas, Z. Naturforsch. **31c**, 280 [1976].

¹⁰ B. J. Finkle u. R. F. Nelson, Biochim. Biophys. Acta **78**, 747 [1963].

¹¹ H. Rabjohn, Organic Synthesis, Collective, Vol. IV, p. 972, John Wiley & Sons Inc., New York, London 1963.

¹² L. R. Axelrod, Ch. Matthijssen, J. W. Goldzieher u. J. E. Pulliam, Acta Endocrinol. (Copenhagen), Suppl. **99** [1965].

¹³ J. J. Pisano, J. R. Crout u. D. Abraham, Clin. Chim. Acta **7**, 285 [1962].