

Eine fluorometrische Bestimmungsmethode für mikrosomale Monooxygenase-Aktivität der Rattenleber mit Scoparon als Substrat

A Fluorometric Test for Microsomal Monooxygenase Activity in the Rat Liver with Scoparone as Substrate

Dieter Müller-Enoch, Helmut Thomas und Heinrich Ockenfels

Abteilung Biochemie I der Universität Ulm, Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm

Z. Naturforsch. **34 c**, 481–482 (1979);
eingegangen am 27. Februar 1979

Fluorometric Test, Monooxygenases, Liver Microsomes, Rats

A sensitive fluorometric test for the determination of monooxygenase activity in liver microsomes from rats is described. The assay is based on the O-demethylation of 6,7-dimethoxycoumarin (scoparone) to 7-hydroxy-6-methoxycoumarin and 6-hydroxy-7-methoxycoumarin. Pretreatment of rats with phenobarbital or polycyclic hydrocarbons (benzo[a]pyrene, 3-methylcholanthrene) causes a significant increase in the amount of microsomal dealkylation activity.

Das mikrosomale Hydroxylierungssystem der Leber katalysiert nicht nur den Umsatz von endogenen Substraten wie Steroiden und Fettsäuren, sondern metabolisiert auch eine Vielzahl exogener Substanzen einschließlich Arzneimitteln, Insektiziden und Carcinogenen [1, 2]. Für die Untersuchung von Monooxygenase-Systemen sind empfindliche Verfahren zur Aktivitätsbestimmung erforderlich. Von den beschriebenen fluorometrischen Bestimmungsmethoden beruht eine auf der Umwandlung des Carcinogens Benz[a]pyren in 3-Hydroxybenz[a]pyren [3], eine zweite auf der Überführung von Coumarin zu 7-Hydroxycoumarin (Umbelliferon) [4]. Bei beiden Monooxygenase-Reaktionen scheinen jedoch spezifische Cytochrom-P-450-abhängige Enzymsysteme beteiligt zu sein: Die Benz[a]pyren hydroxylierende Aryl-Hydroxylase ist durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, nicht jedoch durch Corticosteroide oder Phenobarbital induzierbar [5]; die Coumarin-7-Hydroxylase, die weder durch Benz[a]pyren noch durch Phenobarbital induziert werden kann, zeigt bei verschiedenen Tierspezies starke Aktivitätsunterschiede und ist im übrigen in der Rattenleber nicht nachweisbar [4, 6]. Ein von Ullrich und Weber [7] unter Verwendung von Mäuselebermikro-

somen ausgearbeiteter fluorometrischer Test für die Barbiturat-induzierbare Monooxygenase-Aktivität beruht auf der O-Desalkylierung von 7-Äthoxycoumarin zu Umbelliferon; in Lebermikrosomen unbehandelter Ratten konnten die Autoren keine O-Desalkylierung des Substrates feststellen [8].

Zum Aufbau einer empfindlichen Methode zur Aktivitätsbestimmung von O-desalkylierenden Enzymsystemen in Lebermikrosomen unbehandelter Ratten wurde von uns das intensiv fluoreszierende 6,7-Dimethoxycoumarin (Scoparon) auf seine Verwendbarkeit als Substrat geprüft: Nach Inkubation von Rattenlebermikrosomen mit einem 1 : 1-Gemisch von [6-O-Methyl-¹⁴C]6,7-Dimethoxycoumarin und [7-O-Methyl-¹⁴C]6,7-Dimethoxycoumarin (gleicher spezifischer Aktivität) sowie reduziertem NADP ließen sich nach dünnsschichtchromatographischer Auftrennung zwei radioaktive Produkte isolieren, die mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik als die beiden Demethylierungsprodukte 7-Hydroxy-6-methoxycoumarin (Scopoletin) und 6-Hydroxy-7-methoxycoumarin (Isoscooletin) identifiziert werden konnten (Abb. 1). (Das Verhältnis von radioaktivem Scopoletin zu radioaktivem Isoscooletin betrug bei 8 Ansätzen, die den unten angegebenen Testbedingungen entsprachen- im Mittel 1 : 1,8 ± 0,1.)

Ausgehend von diesen Befunden wurde eine fluorometrische Bestimmungsmethode ausgearbeitet, bei der auf die chromatographische Abtrennung von Scopoletin und Isoscooletin verzichtet werden kann; denn unter bestimmten Versuchsbedingungen ist es möglich, das Substrat Scoparon fluorometrisch zu bestimmen, ohne daß die Fluoreszenz der Demethylierungsprodukte die Messung stört. Dies wird erreicht durch eine Erhöhung des pH-Wertes im Anschluß an die Inkubation, wodurch die Emissionsspektren der

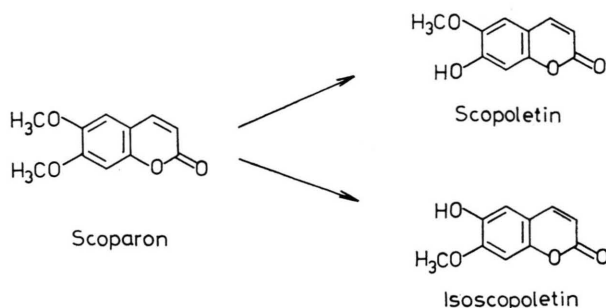


Abb. 1. Enzymatische O-Demethylierung von Scoparon (6,7-Dimethoxycoumarin) zu Scopoletin (7-Hydroxy-6-methoxycoumarin) und Isoscooletin (6-Hydroxy-7-methoxycoumarin) durch Mikrosomen der Rattenleber.

Sonderdruckanforderungen an Priv.-Doz. Dr. D. Müller-Enoch.
0431-0382 / 79 / 0500-0481 \$ 01.00/0



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.

Demethylierungsprodukte bathochrom verschoben werden, so daß bei geeigneter Wellenlänge lediglich die Fluoreszenz des Substrates gemessen wird. Die Menge des pro Zeiteinheit umgesetzten Scoparons ist ein Maß für die Monooxygenase-Aktivität der Mikrosomen.

Die Verwendung von Scoparon als Substrat ermöglicht somit die fluorometrische Bestimmung einer O-desalkylierenden Enzymaktivität in Lebermikrosomen unbehandelter Ratten; das mit dieser Methode erfaßte Monooxygenase-System ist sowohl durch Phenobarbital als auch durch die polycyclischen Aromaten Benz[a]pyren und 3-Methylcholanthren induzierbar. Das Verfahren ist von hoher Empfindlichkeit und einfach in der Ausführung.

Experimentelles

Der Testansatz hat folgende Zusammensetzung (in μ l): 460 Tris/HCl (10^{-1} M; pH 7,6), 80 NADPH (10^{-2} M), 40 Scoparon (10^{-3} M in Tris/HCl), 20 MgCl_2 (10^{-1} M) sowie 400 Mikrosomensuspension [9] entsprechend 0,5–2,5 mg Mikrosomenprotein. Man inkubiert 10 min bei 30°C im Schüttelthermostaten und unterbricht die Reaktion durch Erhitzen im siedenden Wasserbad. Nach Zugabe von 4,5 ml 0,05 M Tris/HCl (pH 8,5) und anschließender Zentrifugation wird unter Anregung bei 345 nm die Emission des nicht umgesetzten Scoparons bei

410 nm gemessen. (Unter Testbedingungen besteht Linearität für Scoparon im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-6} M; die Zeit-Umsatz-Kurve zeigt bei Inkubationszeiten bis zu 15 min einen linearen Verlauf, die Enzym-Umsatz-Kurve erwies sich bis zu 2,5 mg Mikrosomenprotein als linear.)

Die bei den Voruntersuchungen benötigten radioaktiven Substanzen wurden wie folgt hergestellt: Das Gemisch von 192 mg Scopoletin (1 mmol), 852 mg Methyljodid (6 mmol), 0,5 mCi [^{14}C]Methyljodid (spez. Aktivität 59 mCi/mmol), 400 mg K_2CO_3 und 6 ml Methyläthylketon wurde 20 Stunden unter Rückfluß (Kühlflüssigkeit -5°C) erhitzt. Man filtrierte vom K_2CO_3 ab, dampfte das Filtrat zur Trockne ein und nahm den Rückstand in 15 ml Essigsäureäthylester auf. Nach dem Ausschütteln mit 10 ml 0,5 N Na_2CO_3 -Lösung wurde die organische Phase eingedampft und der Rückstand zweimal aus Benzol/Petroläther (3 : 2) umkristallisiert. Ausbeute an [7-O-Methyl- ^{14}C]6,7-Dimethoxycumarin 124 mg (60% bez. auf Scopoletin) vom Schmelzpunkt 143 bis 144°C .

Die Synthese von [6-O-Methyl- ^{14}C]6,7-Dimethoxycumarin erfolgte analog mit Isoscopoletin als Ausgangsmaterial. Ausbeute: 63%; Schmelzpunkt 143 bis 144°C (Lit. [10] $143 - 143,5^\circ\text{C}$ für Scoparon).

Wir danken Frl. S. Hildenbrand für ihre gewissenhafte Mitarbeit.

- [1] V. Ullrich, *Angew. Chem.* **84**, 689 (1972).
- [2] A. Y. H. Lu u. W. Levin, *Biochim. Biophys. Acta* **344**, 205 (1974).
- [3] D. W. Nebert u. H. V. Gelboin, *J. Biol. Chem.* **243**, 6242 (1968).
- [4] P. J. Creaven, D. V. Parke u. R. T. Williams, *Biochem. J.* **96**, 390 (1965).
- [5] D. W. Nebert u. H. V. Gelboin, *J. Biol. Chem.* **243**, 6250 (1968).
- [6] F. Kratz u. H. Staudinger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 568 (1967).
- [7] V. Ullrich u. P. Weber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **353**, 1171 (1972).
- [8] V. Ullrich, U. Frommer u. P. Weber, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **354**, 514 (1973).
- [9] H. Schriefers, R. Ghraf, H.-G. Hoff u. H. Ockenfels, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **352**, 1363 (1971).
- [10] F. E. King, J. R. Housley u. T. J. King, *J. Chem. Soc.* **1954**, 1392.