

Kompetitive Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase durch die Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide Salsolidin und 1-Carboxysalsolin

Competitive Inhibition of Catechol-O-Methyltransferase by the Tetrahydroisoquinoline Alkaloids Salsolidine and 1-Carboxysalsoline

Konstanze Sanft und Helmut Thomas

Abteilung Physiologische Chemie der Universität Ulm,
Oberer Eselsberg, D-7900 Ulm,
Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **44c**, 173–176 (1989);
eingegangen am 3. August/30. September 1988

Competitive Inhibition, Catechol-O-Methyltransferase, Tetrahydroisoquinolines, Catecholamines

The tetrahydroisoquinoline alkaloids salsolidine (1-methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline) and 1-carboxysalsoline (1-carboxy-1-methyl-6-hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline), which are themselves not substrates for the enzyme catechol-O-methyltransferase, are – contrary to a hitherto existing view – able to inhibit competitively the methylation of the catecholamine metabolite 3,4-dihydroxybenzoic acid by the enzyme enriched from rat liver. The inhibitor constants were determined to be $K_i = 0.19 \text{ mm}$ for salsolidine and $K_i = 0.44 \text{ mm}$ for 1-carboxysalsoline.

Durch Reaktion des Neurotransmitters Dopamin mit Aldehyden oder α -Ketosäuren können im Säugertierorganismus Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide wie Salsolinol (1-Methyl-6,7-dihydroxytetrahydroisoquinolin) [1], Tetrahydropapaverolin (Norlaudanosolin, 1-(3',4'-Dihydroxybenzyl)-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin) [1, 2], Norlaudanosolin-1-carbonsäure [3, 4] sowie 3',4'-Desoxynorlaudanosolin-1-carbonsäure [5, 6] entstehen.

Ein möglicher Weg der Metabolisierung von Tetrahydroisoquinolinen führt, da es sich um Substanzen mit Catechol-Struktur handelt, über eine O-Methylierung, die durch die Catechol-O-Methyltransferase (S-Adenosyl-L-methionin: Catechol-O-methyltransferase, EC 2.1.1.6) katalysiert wird, also durch ein Enzym, das auch im Stoffwechsel der Catecholamine eine bedeutende Rolle spielt. Es überträgt eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf eine der beiden Hydroxylgruppen von Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und anderen Substraten, die einen aromatischen Ring mit zwei vicinalen

Hydroxylgruppen aufweisen [7, 8]. So ließ sich nachweisen, daß Salsolinol und Tetrahydropapaverolin durch eine aus Rattenleber angereicherte Catechol-O-Methyltransferase mit S-Adenosylmethionin als Methyldonor methyliert werden können [9]. Eine O-Methylierung dieser beiden Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide ließ sich auch mittels einer Catechol-O-Methyltransferase-Präparation aus Rattengehirn zeigen [10]. Aus Salsolinol können *in vivo* – im Rattengehirn nach intraventrikulärer Applikation – 7-Methylsalsolinol sowie 6-Methylsalsolinol entstehen [11, 12].

Die Entdeckung der körpereigenen Alkaloide hat eine Reihe von Fragen nicht nur zum Stoffwechsel dieser Substanzen, sondern auch zu ihrer Wirkungsweise aufgeworfen: Inzwischen weiß man, daß die Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide nicht nur die Transmitterfunktion der Catecholamine beeinflussen, sondern auch deren Biosynthese- und Abbaurate. Was den Einfluß auf den Abbau anbetrifft, so ist durch Inkubationsversuche mit Catechol-O-Methyltransferase aus verschiedenen Geweben gezeigt worden, daß bestimmte Tetrahydroisoquinoline (Salsolinol, 3-Carboxysalsolinol, Tetrahydropapaverolin, 3'-O-Methylnorlaudanosolinacbonsäure) die Methylierung verschiedener Substrate mit Catechol-Struktur wie Dopamin, Noradrenalin, Adrenalin und 3,4-Dihydroxybenzoësäure kompetitiv hemmen [9, 10, 13, 14]. Alle diese Tetrahydroisoquinoline weisen vicinale Hydroxylgruppen auf und sind – darauf wird von den Autoren ausdrücklich hingewiesen – selbst Substrate für die Catechol-O-Methyltransferase. Es handelt sich also um konkurrierende Substrate.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß auch die Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide Salsolidin (1-Methyl-6,7-dimethoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin) und 1-Carboxysalsolin (1-Carboxy-1-methyl-6-hydroxy-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin), die selbst keine Substrate für die Catechol-O-Methyltransferase darstellen, einen hemmenden Einfluß auf die Methylierung des Catecholamin-Metaboliten 3,4-Dihydroxybenzoësäure [15] durch die Catechol-O-Methyltransferase aus Rattenleber ausüben.

Material und Methoden

Die folgenden Substanzen wurden als Handelsprodukte verwendet: S-Adenosyl-L-[methyl- ^{14}C]methionin (spez. Aktivität: 59 mCi/mmol) (Radiochemical

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Thomas.
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen
0341-0382/89/0100-0173 \$ 01.30/0



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 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.

Centre, Amersham); S-Adenosyl-L-methionin (Boehringer, Mannheim); 3,4-Dihydroxybenzoësäure, 6,7-Dihydroxycumarin (Esculetin) (Sigma); Salsolidin (ICN Pharmaceuticals); 2,5-Diphenyloxazol (PPO), 2,2'-*p*-Phenylbis(5-phenyloxazol) (POPOP) (Merck); Rinderserumalbumin (Serva). Alle anderen verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. 1-Carboxysalsolin wurde aus [3-Hydroxy-4-methoxyphenyl]-ethylaminchlorhydrat synthetisiert [16].

Die Anreicherung der Catechol-O-Methyltransferase aus Leber (100 bis 150 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten) erfolgte nach Axelrod und Tomchick [8]. Die Aktivität wurde nach einem fluorometrischen Verfahren mit Esculetin als Substrat bestimmt [17]. Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry [18]. Das Enzym wurde gegenüber dem Leberhomogenat auf das 10–12fache angereichert. Die Enzympräparation wies eine spezifische Aktivität von 2,7 nmol Scopoletin/min · mg Protein auf.

Für die enzymkinetischen Untersuchungen wurden die Aktivitätsbestimmungen in Anlehnung an ein von McCaman [19] beschriebenes Verfahren durchgeführt. Die Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt: 50 µl Kaliumphosphat-Puffer, pH 8,0 (0,5 M), 50 µl MgCl₂ (12 mM), 50 µl 3,4-Dihydroxybenzoësäure (0,1–5,0 mM), 50 µl S-Adenosyl-L-methionin (6 mM), 100 µl S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionin (0,25 µCi) (spez. Aktivität: 59 mCi/mmol), 400 µl Enzympräparation (entsprechend 0,4 mg Protein, spez. Aktivität: 1,3 nmol Scopoletin/min · mg Protein). Bei Einsatz der Tetrahydroisoquinoline wurden je 50 µl 1-Carboxysalsolin bzw. Salsolidin (5,0 mM) vor Zugabe der Enzympräparation in den Ansatz gegeben. Alle Ansätze wurden mit Kaliumphosphat-Puffer auf ein Endvolumen von 800 µl aufgefüllt. In den Leerwerten wurde die Enzympräparation durch 400 µl Kaliumphosphat-Puffer ersetzt.

Die Ansätze wurden in Schliffzentrifugengläsern 5 min im Wasserbad bei 37,5 °C inkubiert und anschließend mit je 1 ml 1 N HCl versetzt. Die Extraktion der bei der enzymatischen Reaktion entstandenen radioaktiven Methylether (4-Hydroxy-3-methoxy- und 3-Hydroxy-4-methoxybenzoësäure) [20] erfolgte 3 mal mit je 5 ml Ethylacetat. Die Extraktionsrate lag bei 92–94%. Je 2 ml des Extrakts wurden in Szintillationsgefäß mit je 10 ml Szintillationsflüssigkeit (3 g PPO und 0,1 g POPOP in 1 l Toluol) gemischt. Die Radioaktivität der Proben wurde im

Tri-Carb-Szintillationsszähler (Model 2425, Packard) ermittelt. Die Enzymaktivität wurde auf der Basis der spezifischen Aktivität des verwendeten S-Adenosyl-L-[methyl-¹⁴C]-methionins bestimmt und in nmol Substrat, die pro min und mg Protein umgesetzt wurden, ausgedrückt.

Ergebnisse und Diskussion

Abb. 1 zeigt in der doppelt reziproken Darstellung nach Lineweaver und Burk die Kinetik der ungehemmten O-Methylierung des Substrats 3,4-Dihydroxybenzoësäure sowie den Einfluß von 1-Carboxysalsolin und Salsolidin auf diese Reaktion. Es zeigt sich, daß die beiden Tetrahydroisoquinolin-Alkaloiden eine Hemmung vom kompetitiven Typ bewirken, wobei sich Salsolidin als der stärkere Hemmstoff erweist. Die Maximalgeschwindigkeit für die O-Methylierung lag bei 8,9 nmol Substrat/min · mg Protein, der *K_m*-Wert der ungehemmten Reaktion bei 0,03 mM. Der *K_m*-Wert wurde unter den angegebenen Versuchsbedingungen unter dem Einfluß von 1-Carboxysalsolin bzw. Salsolidin scheinbar auf 0,05 mM bzw. 0,08 mM erhöht. Die aus den Lineeweaver-Burk-Diagrammen rechnerisch ermittelten Inhibitorkonstanten betragen für 1-Carboxysalsolin *K_i* = 0,44 mM, für Salsolidin *K_i* = 0,19 mM.

Die bisher von anderen Autoren untersuchten Hemmstoffe des Enzyms, die den Tetrahydroisoquinolin-Alkaloiden zuzuordnen sind, rufen, wie schon erwähnt, ebenfalls eine kompetitive Hemmung der jeweiligen von der Catechol-O-Methyltransferase katalysierten Reaktionen hervor. So konnten Collins und Mitarbeiter [9] zeigen, daß – bei Verwendung von Dopamin als Substrat – die Tetrahydroisoquinoline Salsolinol und Tetrahydropapaverolin kompetitive Hemmstoffe der Catechol-O-Methyltransferase aus Rattenleber sind. Die von den Autoren in ihren Inkubationsversuchen eingesetzten Konzentrationen von Salsolinol (0,05, 0,1 und 0,2 mM) und Substrat (0,03 bis 0,59 mM) lagen in der Größenordnung der von uns verwendeten Konzentrationen von 1-Carboxysalsolin und Salsolidin (0,31 mM) bzw. des Substrats (0,006 mM bis 0,31 mM). Die Befunde von Collins und Mitarbeitern wurden von Giovine und Mitarbeitern [10] in Versuchen mit Catechol-O-Methyltransferase aus Rattengehirn bestätigt. Tunnicliff und Ngo [13] wiesen – ebenfalls durch *In-vitro*-Versuche mit einer aus Rattengehirn angereicherten Catechol-O-Methyltransferase – eine kompetitive

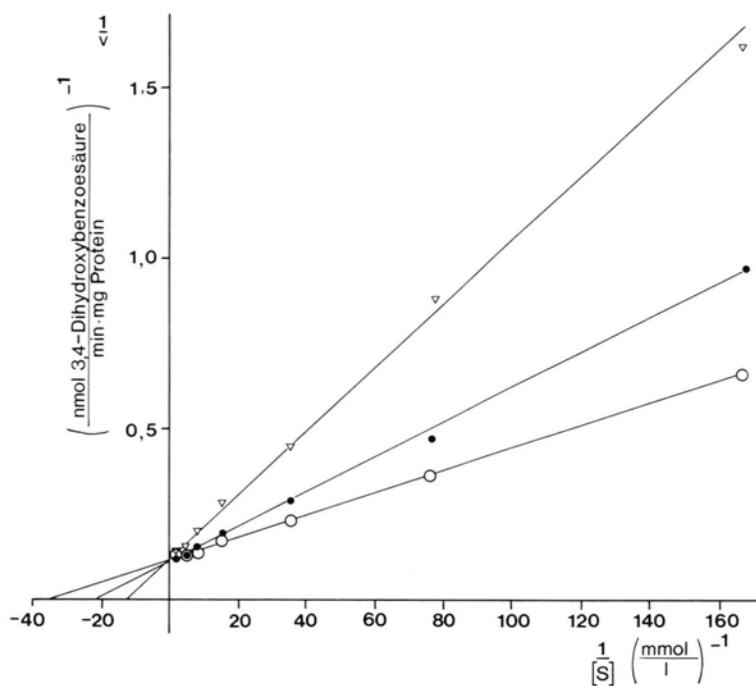


Abb. 1. Hemmung der durch Catechol-O-Methyltransferase aus Rattenleber katalysierten Methylierungsreaktion durch Salsolidin (0,31 mM) (∇) und 1-Carboxysalsolin (0,31 mM) (\bullet) im Lineweaver-Burk-Diagramm. Substrat: 3,4-Dihydroxybenzoësäure; Konzentrationsbereich: 0,006 mM bis 0,31 mM. Ungehemmte Reaktion: \circ . Salsolidin: K_i : 0,19 mM; 1-Carboxysalsolin: K_i : 0,44 mM. Einzelheiten s. Text.

Hemmung der O-Methylierung von 3,4-Dihydroxybenzoësäure durch Salsolinol und 3-Carboxysalsolin nach. Tetrahydropapaverolin (Norlaudanosolin) und 3'-O-Methylnorlaudanosolincarbonsäure erwiesen sich als kompetitive Hemmstoffe der durch die Catechol-O-Methyltransferase aus Schweineleber katalysierten O-Methylierung von Noradrenalin [14]. Allen bisher als Hemmstoffe der Catechol-O-Methyltransferase beschriebenen Tetrahydroisochinolinen ist, wie schon erwähnt, gemeinsam, daß sie über vicinale Hydroxylgruppen an einem Benzolring verfügen. Sie sind selbst Substrate des Enzyms. Es handelt sich also um eine Substratkonzurrenz, deren Kinetik sich als kompetitive Hemmung darstellt. Collins und Mitarbeiter [9] weisen darauf hin, daß der von ihnen festgestellte K_m -Wert für Salsolinol mit 0,29 mM in der Größenordnung des ermittelten K_i -Wertes (0,13 mM) liegt. Die Autoren stellten fest, daß Isochinolin und Tetrahydroisochinolin als Substanzen ohne Hydroxylgruppen sowie Tetrahydroisochinolin-Alkaloide, deren Hydroxylgruppen vollständig methyliert sind (Salsolidin, Norlaudanosin und Laudanosin), in ihren *In-vitro*-Versuchen keinen Effekt auf die O-Methylierung von Dopamin zeigten und vertreten die Ansicht, daß die untersuchten Substanzen nur dann als kompetitive Inhibitoren auf die

O-Methylierung von Catecholaminen einwirken, wenn sie freie vicinale Hydroxylgruppen aufweisen. Durch enzymatische Methylierung, die als der erste Schritt im Stoffwechsel der Tetrahydroisochinolin-Alkaloide angesehen wird [10], entstandene O-Methylether sollten demnach keine inhibitorische Wirkung mehr ausüben.

Aus den vorliegenden Untersuchungen geht jedoch hervor, daß auch die Tetrahydroisochinoline 1-Carboxysalsolin und Salsolidin, die selbst keine Substrate der Catechol-O-Methyltransferase darstellen, als kompetitive Hemmstoffe einen Einfluß auf die Aktivität des Enzyms nehmen.

Eine Biogenese der beiden Tetrahydroisochinolin-Alkaloide, deren inhibitorische Wirkung auf die Catechol-O-Methyltransferase untersucht wurde, liegt im Säugetierorganismus durchaus im Bereich des Möglichen. Salsolidin könnte durch Reaktion von 3,4-Dimethoxyphenylethylamin, das im menschlichen Organismus als Dopamin-Metabolit entsteht [21], mit Acetaldehyd gebildet werden. (Eine von der Catechol-O-Methyltransferase katalysierte Methylierung von 7-Methylsalsolinol oder 6-Methylsalsolinol zu Salsolidin ist nicht möglich.) 1-Carboxysalsolin könnte durch Reaktion von 3-Hydroxy-4-methoxyphenylethylamin mit Pyruvat oder durch en-

zymatische Methylierung von 1-Carboxysalsolinol entstehen.

Collins und Mitarbeiter [9] machen darauf aufmerksam, daß Tetrahydropapaverolin, das nach ihren Untersuchungen eine stärkere kompetitive Hemmung auf die Catechol-O-Methyltransferase ausübt als Salsolinol, ein vergleichsweise starkes direkt wirkendes β -Sympathomimetikum ist. Es wäre in diesem Zusammenhang von Interesse, zu untersuchen, ob Salsolidin und 1-Carboxysalsolin eine direkte sympathomimetische Wirkung ausüben. Möglicherweise sind die pharmakologischen Wirkungen von Tetrahydroisoquinolin-Alkaloiden jedoch in erster Linie Ausdruck einer erhöhten Konzentration von Catecholamin-Neurotransmittern im synaptischen Spalt [9], die dadurch zustande kommen kann, daß

die Catechol-O-Methyltransferase als das wichtigste Enzym des inaktivierenden Abbaus gehemmt wird.

Die Frage, ob die kompetitive Hemmung der Catechol-O-Methyltransferase durch Tetrahydroisoquinoline im Säugetierorganismus unter physiologischen oder pathophysiologischen Bedingungen von Bedeutung ist, kann erst beantwortet werden, wenn man weiß, in welchem Ausmaß sie im Organismus entstehen und in welchen Konzentrationen sie in Catecholamin-speichernden Vesikeln – hier können Tetrahydroisoquinolin-Alkaloide gespeichert werden, und hier sind die höchsten Konzentrationen zu erwarten [22, 23] – vorliegen.

Frau H. Schmid danken wir für die gewissenhafte Mitarbeit.

- [1] M. Sandler, S. B. Carter, K. R. Hunter und G. M. Stern, *Nature* **241**, 439 (1973).
- [2] M. A. Collins, W. P. Nijm, G. F. Borge, G. Teas und C. Goldfarb, *Science* **206**, 1184 (1979).
- [3] C. J. Coscia, W. Burke, G. Jamroz, J. M. Lasalla, J. McFarlane, J. Mitchell, M. M. O'Toole und M. L. Wilson, *Nature* **269**, 617 (1977).
- [4] Übersichten s. A. Brossi, *Heterocycles* **11**, 521 (1978); R. Deitrich und V. Erwin, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **20**, 55 (1980); A. Brossi, in: *Beta-Carbolines and Tetrahydroisoquinolines*, S. 125, Alan R. Liss, Inc., New York 1982; M. A. Collins, in: *Mammalian Alkaloids, Volume XXI: The Alkaloids* (A. Brossi, ed.), S. 329, Academic Press, New York 1983.
- [5] J. Lasalla und C. J. Coscia, *Science* **203**, 283 (1979).
- [6] Übersicht s. G. Bringmann, S. Schneider und A. Hille, *Nachr. Chem. Techn. Lab.* **34**, 222 (1986).
- [7] J. Axelrod, *Science* **126**, 400 (1957).
- [8] J. Axelrod und R. Tomchick, *J. Biol. Chem.* **233**, 702 (1958).
- [9] A. C. Collins, J. L. Cashaw und V. E. Davis, *Biochem. Pharmacol.* **22**, 2337 (1973).
- [10] A. Giovine, M. Renis und A. Bertolino, *Pharmacology* **14**, 86 (1976).
- [11] T. C. Origitano und M. A. Collins, *Life Sci.* **26**, 2061 (1980).
- [12] M. Bail, S. Miller und G. Cohen, *Life Sci.* **26**, 2051 (1980).
- [13] G. Tunnicliff und T. T. Ngo, *Int. J. Biochem.* **15**, 733 (1983).
- [14] C. J. Coscia, W. J. Burke, M. P. Galloway, A. H. Kosloff, J. M. Lasalla, J. McFarlane, J. S. Mitchell, M. M. O'Toole und B. L. Roth, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **212**, 91 (1980).
- [15] H. Thomas, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **348**, 963 (1967).
- [16] G. Hahn und F. Rumpf, *Chem. Ber.* **71**, 2141 (1938).
- [17] H. Thomas, J. Veser und D. Müller-Enoch, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **357**, 1347 (1976).
- [18] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- [19] R. E. McCaman, *Life Sci.* **4**, 2353 (1965).
- [20] D. Müller-Enoch, S. Roth und H. Thomas, *Acta Endocr. (Kbh) Suppl.* **173**, 152 (1973).
- [21] E. Knoll, H. Wisser und H. M. Emrich, *Clin. Chim. Acta* **89**, 493 (1978).
- [22] V. M. Tennyson, G. Cohen, C. Mytilineou und R. Heikkila, *Brain Res.* **51**, 161 (1973).
- [23] Übersicht s. G. Bringmann, *Naturwissenschaften* **66**, 22 (1979).