

BBA 66168

## REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINER S-ADENOSYL-METHIONIN:CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE DER MENSCHLICHEN PLACENTA\*

ROLAND GUGLER, RUDOLF KNUPPEN UND HEINZ BREUER

*Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität Bonn, Bonn (Germany)*

(Eingegangen am 15 Juni 1970)

---

### SUMMARY

#### *Purification and characterization of human placenta S-adenosylmethionine:catechol-O-methyltransferase*

An S-adenosylmethionine:catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) is localised in the  $150\,000 \times g$  supernatant of human placenta. The enzyme was purified 66-fold by  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitation and by repeated filtration of the  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  precipitate through a Sephadex G-100 column. After incubation of epinephrine and S-[Me- $^{14}\text{C}$ ]-adenosylmethionine, the main metabolite was identified as metanephrine (3-O-methyl-adrenalin). In the pH range of 6–8, the activity of the enzyme increased steadily. The Michaelis-Menten constants were found to be  $43.5 \cdot 10^{-5}$  M for epinephrine and  $7.8 \cdot 10^{-5}$  M for S-adenosylmethionine. The purified catechol O-methyltransferase was active for more than 3 months when stored at  $-20^\circ$ . The enzyme shows a temperature optimum at  $50^\circ$  and an activation energy of 17.3 kcal/mole within the range of  $24$ – $42^\circ$ . By gel filtration, using Sephadex G-100, the molecular weight of the placental catechol O-methyltransferase was found to be 52 000. The purified enzyme preparation was only active in the presence of cysteine (20–80 mM). In addition to epinephrine, other catechols were also methylated. When 2-hydroxyoestradiol-17 $\beta$  was used as substrate, 2-methoxyoestradiol-17 $\beta$  as well as 2-hydroxyoestradiol-17 $\beta$  3-methyl ether were formed as metabolites. The methylation of epinephrine to metanephrine was inhibited competitively by 2-hydroxyoestradiol-17 $\beta$ .

---

### EINLEITUNG

1958 beschrieben AXELROD UND TOMCHICK<sup>1</sup> ein Enzym, das die Methylgruppe von S-Adenosyl-methionin auf die 3-Hydroxygruppe von Adrenalin und anderen Catecholen überträgt. Diese S-Adenosyl-methionin:Catechol-O-Methyltransferase (im folgenden als Catechol-O-Methyltransferase bezeichnet), die aus Rattenleber von AXELROD UND TOMCHICK<sup>1</sup> auf das 30-fache angereichert wurde, katalysiert auch die enzymatische Methylierung von 2-Hydroxy-östrogenen<sup>2–4</sup>, die als Metaboliten des

---

\* Herrn Professor Dr. Rudolf Tschische zum 65. Geburtstag gewidmet.

Östrogenstoffwechsels während der Schwangerschaft eine quantitativ nicht unerhebliche Rolle spielen<sup>5-7</sup>. Wie in jüngerer Zeit nachgewiesen werden konnte, wird die enzymatische Methylierung von Catecholaminen bereits durch geringe Konzentrationen von 2-Hydroxy-östrogenen gehemmt<sup>8-10</sup>. In diesem Zusammenhang erschien die Frage von Interesse, ob in der Placenta des Menschen eine Catechol-O-Methyltransferase vorkommt. Anhaltspunkte für die Anwesenheit eines solchen Enzyms hatten sich schon früher aus dem Nachweis von 2-Methoxy-östron nach Perfusion von Östradiol-17 $\beta$  durch menschliche Placenta<sup>11</sup> sowie aus der Bildung von 2-Methoxy-östron und 2-Methoxy-östradiol-17 $\beta$  nach Inkubation von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  mit Gewebepreparationen der menschlichen Placenta ergeben<sup>12</sup>.

## METHODIK

### *Substrate und Cofaktoren*

L-Epinephrin-bitartrat, DL-3,4-Dihydroxy-Mandelsäure und DL-Metanephrin-hydrochlorid wurden von der Firma Calbiochem AG, Luzern, Schweiz, bezogen. DL-Norepinephrin-hydrochlorid und 3,4-Dihydroxy-benzaldehyd waren Handelspräparate der Firma Fluka AG, Buchs SG, Schweiz; Östradiol-17 $\beta$  und 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  wurden von der Firma Schering AG, Berlin, L-Tyrosin von Serva Entwicklungslabor, Heidelberg, und DL-Thyroxin von Deutsche Hoffmann-LaRoche, Grenzach, bezogen. Alle Substrate wurden papierchromatographisch auf Reinheit geprüft.

S-[Me-<sup>14</sup>C]Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 55  $\mu$ C/ $\mu$ Mol) wurde von der Firma NEN Chemicals GmbH, Dreieichenhain bei Frankfurt, bezogen; das entsprechende nichtradioaktive Nukleotid sowie alle übrigen Nukleotide wurden von der Firma Biochemica Boehringer, Mannheim, erhalten.

### *Reagenzien und Lösungen*

Alle verwendeten Lösungen waren von p.a. Reinheitsgrad (E. Merck, Darmstadt); die organischen Lösungsmittel wurden vor dem Gebrauch destilliert. Folgende Enzyme und Eiweisse dienten als Standardsubstanzen: Cytochrom *c* aus Pferdeherz, Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.37) aus Schweineherz, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (EC 2.6.1.1) aus Schweineherz (Firma Biochemica Boehringer, Mannheim) und Rinderserumalbumin (Behringwerke AG, Marburg). Jodacetamid (Schuchardt, München), *o*-Jodosobenzoessäure (Fluka AG, Buchs SG, Schweiz) und *p*-Chlormercuribenzoessäure (C. Roth, Karlsruhe) waren Handelspräparate.

### *Gewebe und Zellfraktionierung*

Alle Untersuchungen wurden mit menschlicher Placenta durchgeführt. Die Zeit zwischen Ausstossung und Beginn der Gewebeaufarbeitung betrug nicht länger als 20 min. Das Placentagewebe wurde mit der Schere zerkleinert und in 0.25 M Sucrose-Lösung in einem Starmix 1 min lang homogenisiert. Durch Zentrifugation des 30%igen Homogenats bei  $150\,000 \times g$  für 120 min wurde die Cytosol-Fraktion gewonnen. Die Cytosol-Fraktion wurde in Portionen von 25–30 ml bei  $-20^\circ$  aufbewahrt.

### *Fällung mit (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

Der Cytosol-Fraktion ( $150\,000 \times g$ -Überstand) wurde fein gepulvertes (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

bis zu einer Sättigung von 30% zugegeben. Der Überstand wurde mit Ammoniumsulfat bis zur 60%igen Sättigung versetzt; das nunmehr nach Zentrifugation erhaltene Sediment wurde in 2 ml eines 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) aufgenommen und bei 3° aufbewahrt.

#### *Gelfiltration mit Sephadex*

Sephadex G-100 (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt) wurde 24 Std in destilliertem Wasser zum Quellen aufbewahrt und danach zuerst mit destilliertem Wasser, dann mit 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffer gewaschen. Die im gleichen Puffer aufgeschlemmte Suspension wurde in eine Säule (1.2 cm × 90 cm) über ein Bett von Glaswolle luftblasenfrei eingefüllt, über Nacht äquilibriert und mit gequollenem Sephadex G-25 (coarse) abgedeckt. Die Enzymlösung (30–60%ige Ammoniumsulfatfällung) oder die Standardproteine wurden in einem Volumen von jeweils 2 ml durch Unterschichtung der über dem Gelbett befindlichen Pufferlösung aufgegeben. Die Elution der Proteine erfolgte mit 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffer. Der Eiweißgehalt wurde über eine Durchflussküvette (LKB-Uvicord II) bei 278 mμ ermittelt.

#### *Messung der Enzymaktivität*

Durch Zugabe von kristallinem S-Adenosyl-L-methionin-jodid wurde das in verdünnter Schwefelsäure (pH 3.5) gelöste S-[Me-<sup>14</sup>C]Adenosyl-methionin auf eine spezifische Aktivität von 0.33 μC/μMol gebracht. Wenn nicht anders vermerkt, wurden 20 μl dieser Lösung, enthaltend 0.1 μMol S-[Me-<sup>14</sup>C]-Adenosyl-methionin, mit 100 μl der jeweiligen Enzympräparation (20–80 μg Eiweiß), 20 μl L-Epinephrinbitartrat (0.5 μMol in verdünnter Essigsäure, pH 3.5), 10 μl Cystein-hydrochlorid (entsprechend 10 μMol, mit 2 M NaOH frisch neutralisiert) und 100 μl eines 0.5 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7), der eine 10 mM Konzentration an MgSO<sub>4</sub> aufwies, 30 Min bei 37° in einem Schüttelthermostaten inkubiert. Das Endvolumen der Inkubation betrug 0.25 ml.

Nach Beendigung der Inkubation wurden die Inkubationsröhrchen in Eiswasser gekühlt. Nach Zugabe von 0.4 ml eines 1 M Borat-Puffers (pH 10) wurde die Inkubationslösung mit NaCl gesättigt. Das gebildete Metanephrin wurde aus dem wässrigen Milieu (0.65 ml) durch 1 min Ausschütteln mit 1 ml wassergesättigtem *n*-Butanol extrahiert. Aus der organischen Phase wurden 0.5 ml in ein Szintillationsgläschen pipettiert und mit Hilfe von 1 ml Methanol in 15 ml Szintillator gelöst. Bei einer 10-fach-Bestimmung wurden unter den oben beschriebenen Bedingungen 65% vom eingesetzten Metanephrin (10 000 Impulse/min) wiedergefunden; der Variationskoeffizient betrug 1.3%. Eine bei jeder Inkubationsreihe durchgeführte Kontrollinkubation hatte die gleiche Zusammensetzung wie die Testinkubation, jedoch keinen Zusatz von Epinephrin.

#### *Enzymeinheit*

Eine Einheit der Enzymaktivität wurde definiert als diejenige Enzymmenge, welche die Methylierung von 1 nMol Epinephrin in 30 min unter den gewählten Bedingungen katalysiert.

#### *Messung der Radioaktivität*

Die Radioaktivität wurde in einem Packard Tri-Carb Flüssigkeits-Szintillations-

Spektrometer (Modell 3003) gemessen. Die Szintillationslösung bestand aus 4 g/l 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0.3 g/l 1,4-bis-(4-Methyl-5-phenyloxazolyl)-benzol (POPOP) in Toluol. Die Messung der Radioaktivität auf den Papierchromatogrammen erfolgte mit einem Packard-Radiopapierchromatographen, Modell 7201.

#### *Eiweissbestimmung*

Der Eiweissgehalt der Enzympräparationen wurde nach der Methode von LOWRY *et al.*<sup>13</sup> gemessen; dabei diente Rinderserumalbumin als Standardeiweiss.

#### *Papierchromatographie*

Die Rückstände der in einem Rotationsverdampfer bei 50° zur Trockene eingedampften butanolischen Lösungen wurden auf Chromatographiepapier der Firma Schleicher und Schüll (2043b Mgl) aufgetragen und in folgenden Lösungsmittelsystemen entwickelt. (A) *n*-Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5, v/v/v), (B) Isopropylalkohol-5% NH<sub>3</sub> (8:2, v/v), (C) Cyclohexan auf Formamid-imprägniertem Papier. Zur Lokalisierung der Methyläther wurden die jeweiligen authentischen Referenzsubstanzen durch Anfärben mit FOLIN-CIOCALTEU<sup>14</sup> Reagenz sichtbar gemacht. Zur weiteren Identifizierung wurden die Catechol-O-Methyläther von den Chromatogrammen mit Methanol eluiert.

#### *Mikrochemische Reaktionen zur Identifizierung von Metanephrin*

Die nach Papierchromatographie gewonnenen Eluate wurden eingedampft und die Rückstände im System A rechromatographiert. Zur weiteren Reinigung wurden die Metanephrin-Fractionen eluiert und die eingengten Eluate über eine Säule mit Sephadex G-25 (0.8 cm × 25 cm) chromatographiert. Als Elutionsmittel diente demineralisiertes Wasser. Die radioaktive Substanz befand sich in den Fractionen 10–12 (1.5 ml/Fraktion). Die wässrige Phase wurde unter Stickstoff abgedampft, der Rückstand mit authentischem Metanephrin versetzt und aus Methanol-Benzol bis zur konstanten spezifischen Aktivität umkristallisiert.

Die chemische Umwandlung von Metanephrin (3-O-Methyladrenalin) bzw. Paraneprhin (4-O-Methyladrenalin) zu Vanillin bzw. Isovanillin erfolgte nach DALY *et al.*<sup>15</sup>. 20 nMol der radioaktiven Metanephrin-Fraktion wurden in 10 ml 0.1 M HCl aufgenommen und mit 1 ml konz. Ammoniak sowie 0.4 ml 2%iger Perjodsäure versetzt. Nach 5 min wurde die Reaktionslösung auf pH 2 angesäuert. Die gebildeten Reaktionsprodukte wurden mit Äthylacetat extrahiert; bei der dünnenschichtchromatographischen Untersuchung im System Isopropylalkohol-Äthylacetat-Ammoniak-Wasser (45:30:17:8, v/v/v/v) konnten zwei Verbindungen nachgewiesen werden, die sich wie authentisches Vanillin und Isovanillin verhielten.

Die enzymatische Umwandlung von Metanephrin und Paraneprhin zur 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure und 3-Hydroxy-4-methoxy-mandelsäure erfolgte durch Inkubation von 0.25 µC der Metanephrin-Fraktion (spezifische Aktivität 55 µC/µMol) mit 0.5 ml einer im Verhältnis 1:3 (Gew./Vol.) in 0.25 M Sucrose homogenisierten Rattenleberpräparation, in welcher beide zur oxydativen Desaminierung erforderlichen Enzyme (Monoaminoxydase und Aldehyddehydrogenase) enthalten sind; weitere Bestandteile der Inkubation waren 2 mg NAD<sup>+</sup> und 4 ml eines 0.2 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.4). Nach 120 min Inkubation bei 37° wurde die Lösung angesäuert, das Reaktionsprodukt mit *n*-Butanol extrahiert und der einge-

TABELLE I

## ANREICHERUNG DER CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE AUS DER PLACENTA DES MENSCHEN

0.5  $\mu$ Mol L-Epinephrin-bitartrat wurden mit den einzelnen Enzympräparationen in Gegenwart von S-[Me- $^{14}$ C]Adenosyl-methionin unter Standardbedingungen inkubiert (Einzelheiten vgl. METHODIK)

Enzympräparation	Vol. (ml)	Protein (mg)	Gesamt-Aktivität		Spezifische Aktivität (nMol Metane- phrin gebildet pro 30 min pro mg)	Anreicherung (n-fach)
			nMol Metane- phrin gebildet pro 30 min	%		
150 000 $\times$ g-Überstand	30	462	2860	100	6.2	—
30–60% (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ - Fällung	4	138	2565	89	18.6	3
(1) Filtration durch Sephadex G-100	24	7.2	1560	55	217	35
(2) Filtration durch Sephadex G-100	18	2.8	1140	40	409	66

dampfte Rückstand im System A chromatographiert. Das Reaktionsprodukt zeigte das gleiche Verhalten wie authentische 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure.

## ERGEBNISSE

*Intrazelluläre Verteilung des Enzyms*

Inkubationen mit den Mikrosomen- und Cytosol-Fractionen der menschlichen Placenta zeigten, dass die Catechol-O-Methyltransferase ausschliesslich in der Cytosol-Fraktion (150 000  $\times$  g-Überstand) lokalisiert ist. In Abwesenheit des Enzyms oder bei Verwendung einer bei 100° denaturierten Enzympräparation erfolgte keine Methylierung.

*Reinigung des Enzyms*

Wie aus Tabelle I hervorgeht, fand sich die höchste spezifische Aktivität der Catechol-O-Methyltransferase in der 30–60%igen Ammoniumsulfat-Fällung; durch diese erste Fällung wurde eine 3-fache Anreicherung gegenüber der Cytosol-Fraktion erreicht. Der zweite Reinigungsschritt erbrachte mit der Filtration durch eine Säule mit Sephadex G-100 (vgl. METHODIK) eine Anreicherung auf das 35-fache (Elutions- und Aktivitätsverhalten siehe Fig. 1). Die so gewonnene Enzympräparation (24 ml des Sephadex-Eluates) wurde mit (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$  (60% Sättigung) behandelt und der Niederschlag in 2 ml 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.7) aufgenommen. Mit dieser Eiweisspräparation wurde eine zweite Gel-Filtration über Sephadex G-100 durchgeführt, die zu einer 66fachen Gesamtanreicherung gegenüber der Cytosol-Fraktion führte. Die Enzymausbeute betrug nach diesem Reinigungsschritt 40%. Alle weiteren Versuche zur Charakterisierung der Catechol-O-Methyltransferase der menschlichen Placenta wurden mit der 35-fach angereicherten Enzympräparation durchgeführt, die nach einmaliger Gel-Filtration durch Sephadex G-100 erhalten worden war.

Versuche zu einer weiteren Reinigung des Enzyms durch Adsorption an Cal-

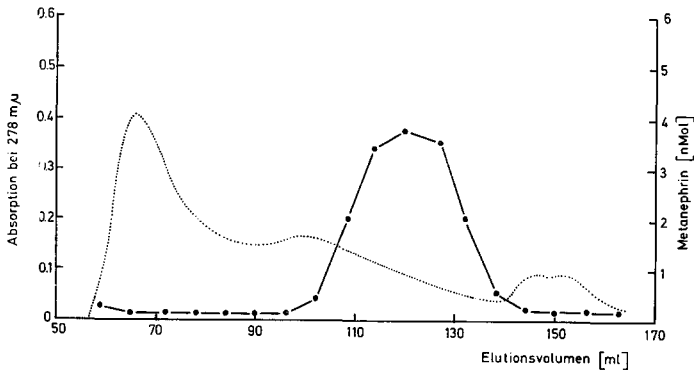


Fig. 1. Verhalten der 30–60%igen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung des  $150\,000 \times g$ -Überstandes der menschliche Placenta bei der Gelfiltration durch Sephadex G-100. Die Enzympräparation (entsprechend 60 mg Eiweiss) wurde in 2.0 ml eines 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) gelöst und auf das 90 cm hohe Gelbett aufgetragen. Es wurde mit 0.02 M Soerensen-Phosphat-Puffer (pH 7.7) eluiert. Die Eluate wurden in 6 ml-Fractionen aufgefangen. Die Enzymaktivität wurde durch Messung von radioaktivem Metanephrin ermittelt; Einzelheiten über den Standard-Inkubationsansatz vgl. METHODIK. Der Eiweissgehalt der Eluate wurde bei 278 mμ in einer Durchflussküvette gemessen. ●—●, Aktivität der placentaren Catechol-O-Methyltransferase; ····, Eiweissgehalt der Eluate.

cium-Phosphat-Gel, CM-Cellulose oder DEAE-Cellulose erbrachten keine weitere Zunahme der spezifischen Aktivität.

#### Stabilität des Enzyms

Die gereinigte Enzympräparation konnte bei  $-20^\circ$  ohne Aktivitätsverlust 3 Monate lang aufbewahrt werden. Bei  $4^\circ$  trat innerhalb von 6 Tagen ein Aktivitätsverlust von 50% ein.

#### Identifizierung des Reaktionsproduktes

2 μMol L-Epinephrin-bitartrat wurden mit 0.8 mg der 35-fach angereicherten placentaren Catechol-O-Methyltransferase des Menschen, 0.2 μMol S-[Me- $^{14}\text{C}$ ]-Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 55 μC/μMol), 2 μMol  $\text{MgSO}_4$ , 20 μMol Cystein und 2 ml eines 0.5 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) 120 min bei  $37^\circ$  inkubiert (Endvolumen 6.25 ml). Nach Zugabe von 3 ml eines 1 M Borat-Puffers (pH 10) wurde dreimal mit 10 ml wassergesättigtem *n*-Butanol extrahiert.

Das Hauptreaktionsprodukt wurde mit Hilfe der Papierchromatographie, der oxydativen Desaminierung, chemischer und enzymatischer Umsetzungen, der Oxydation mit Perjodat (Einzelheiten vgl. METHODIK) sowie durch Kristallisation zur konstanten spezifischen Aktivität als Metanephrin identifiziert.

#### Kinetische Untersuchungen

**pH-Optimum.** In einem Bereich von pH 6.0–8.0 (Soerensen-Phosphat- und Tris-HCl-Puffer) nahm die Aktivität des Enzyms stetig zu. Alle kinetischen Untersuchungen wurden bei pH 7.7 in Soerensen-Phosphat-Puffer durchgeführt, da die Enzymaktivität bei gleichen pH-Werten in Tris-HCl-Puffer geringer war.

**Zeitabhängigkeit und Abhängigkeit von der Enzymmenge.** Die Bildung von Metanephrin stellte bis zu 30 min eine Reaktion nullter Ordnung dar. Zwischen der

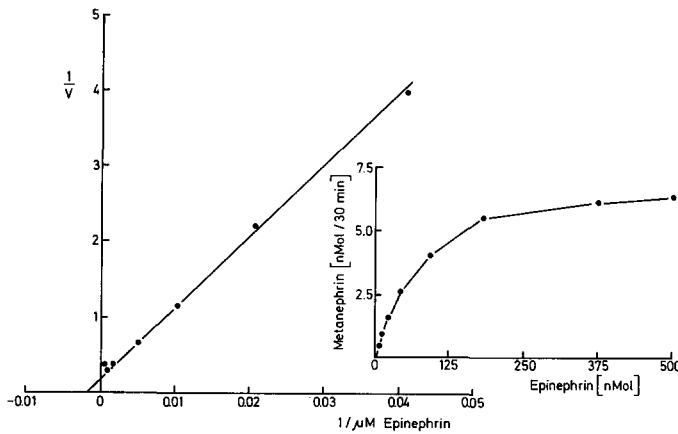


Fig. 2. Bildung von radioaktivem Metanephrin durch die angereicherte placentare Catechol-*O*-Methyltransferase des Menschen in Abhängigkeit von der Konzentration von Epinephrin. Steigende Mengen (3–500  $\mu\text{Mol}$ ) L-Epinephrin-bitartrat wurden mit 0.1 ml der Enzympräparation (entsprechend 30  $\mu\text{g}$  Eiweiss), 0.1  $\mu\text{Mol}$  S-[ $Me\text{-}^{14}\text{C}$ ] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 0.33  $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ), 1  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{Mol}$  Cystein und 0.1 ml eines 0.5 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) 30 min bei 37° inkubiert (Endvolumen 0.25 ml).

eingesetzten Enzymmenge und der Bildung von Metanephrin bestand in einem Bereich bis zu 80  $\mu\text{g}$  Eiweiss Linearität.

*Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstanten für Epinephrin und S-Adenosyl-methionin.* Wie aus den Fig. 2 und 3 hervorgeht, betrugen die nach LINEWEAVER UND BURK<sup>16</sup> graphisch ermittelten Michaelis-Menten-Konstanten für Epinephrin  $43.5 \cdot 10^{-5}$  M und für S-Adenosyl-methionin  $7.8 \cdot 10^{-5}$  M.

*Aktivierungsenergie.* Die Methylierung von Epinephrin erreichte bei 50° ein

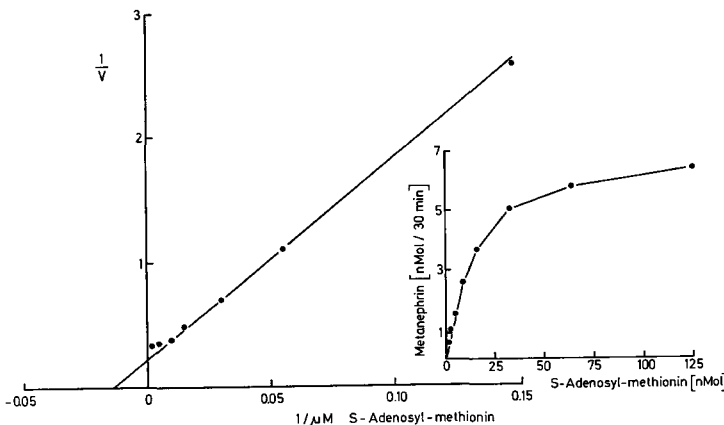


Fig. 3. Bildung von radioaktivem Metanephrin durch die angereicherte placentare Catechol-*O*-Methyltransferase des Menschen in Abhängigkeit von der Konzentration von S-Adenosyl-methionin. 0.5  $\mu\text{Mol}$  L-Epinephrin-bitartrat wurden mit 0.1 ml der Enzympräparation (entsprechend 30  $\mu\text{g}$  Eiweiss), steigenden Mengen S-[ $Me\text{-}^{14}\text{C}$ ] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 0.33  $\mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ; 1.7–128 nMol), 1  $\mu\text{Mol}$   $\text{MgSO}_4$ , 10  $\mu\text{Mol}$  Cystein und 0.1 ml eines 0.5 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) 30 min bei 37° inkubiert (Endvolumen 0.25 ml).

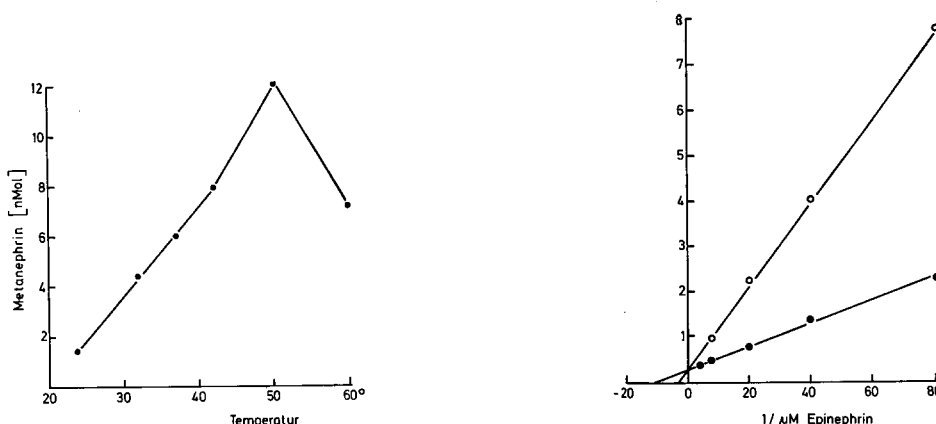


Fig. 4. Bildung von radioaktivem Metanephrin durch die angereicherte placentaire Catechol-O-Methyltransferase des Menschen in Abhängigkeit von der Temperatur.  $0.5 \mu\text{Mol}$  L-Epinephrin-bitartrat wurden mit  $0.1 \text{ ml}$  der Enzympräparation (entsprechend  $30 \mu\text{g}$  Eiweiss),  $0.1 \mu\text{Mol}$  S-[Me- $^{14}\text{C}$ ] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität  $0.33 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ),  $1 \mu\text{Mol}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $10 \mu\text{Mol}$  Cystein und  $0.1 \text{ ml}$  eines  $0.5 \text{ M}$  Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7)  $30 \text{ min}$  bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (Endvolumen  $0.25 \text{ ml}$ ).

Fig. 5. Bildung von radioaktivem Metanephrin durch die angereicherte placentaire Catechol-O-Methyltransferase des Menschen in Abhängigkeit von der Epinephrin-Konzentration ohne (●—●) und mit (○—○) Zusatz von 2-Hydroxy-östradiol- $17\beta$ . Steigende Mengen ( $18$ – $200 \text{ nMol}$ ) L-Epinephrin-bitartrat wurden mit  $0.1 \text{ ml}$  der Enzympräparation (entsprechend  $30 \mu\text{g}$  Eiweiss),  $0.1 \mu\text{Mol}$  S-[Me- $^{14}\text{C}$ ] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität  $0.33 \mu\text{C}/\mu\text{Mol}$ ),  $1 \mu\text{Mol}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $10 \mu\text{Mol}$  Cystein und  $0.1 \text{ ml}$  eines  $0.5 \text{ M}$  Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) ohne und mit Zusatz von  $10 \text{ nMol}$  2-Hydroxy-östradiol- $17\beta$   $30 \text{ min}$  bei  $37^\circ$  inkubiert (Endvolumen  $0.25 \text{ ml}$ ).

Maximum und fiel bei höheren Temperaturen steil ab (Fig. 4). Die Aktivierungsenergie betrug  $17.3 \text{ kcal/Mol}$  zwischen  $24$  und  $42^\circ$ .

#### *Einfluss von Cystein*

In Abwesenheit von Cystein war jede Enzympräparation mit Ausnahme der Cytosol-Fraktion inaktiv; selbst die Cytosol-Fraktion verlor innerhalb von 4 Tagen bei  $3^\circ$   $90\%$  der Enzymaktivität. Durch Zugabe von Cystein nahm die Aktivität wieder zu. Bei einer Endkonzentration von  $20 \text{ mM}$  Cystein war eine maximale Aktivierung erreicht.

#### *Einfluss von SH-Gruppen blockierenden Reagenzien*

Bei Zusatz von SH-Gruppen blockierenden Reagenzien und Cystein in äquimolaren Konzentrationen ( $20 \text{ mM}$ ) wurde die Aktivität der gereinigten Catechol-O-methyltransferase durch Jodacetamid um  $50\%$ , durch *o*-Jodosobenzoessäure um  $96\%$  und durch *p*-Chlormercuribenzoessäure um  $99\%$  gehemmt.

#### *Einfluss von Kationen*

Eine maximale Enzymaktivität wurde nur in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$  ( $4 \text{ mM}$ ) beobachtet. Wie aus Tabelle II hervorgeht, hatten die übrigen Kationen eine deutlich geringere oder gar keine Wirkung auf die Enzymaktivität. In Abwesenheit zweiwertiger Kationen betrug die Enzymaktivität nur  $5\%$  derjenigen, die bei Zusatz von  $\text{Mg}^{2+}$  beobachtet wurde.



TABELLE II

EINFLUSS VON KATIONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER ANGEREICHERTEN PLACENTAREN CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE DES MENSCHEN

0.5  $\mu$ Mol L-Epinephrin-bitartrat wurden mit 0.1 ml der Enzympräparation (enthaltend 30  $\mu$ g Eiweiss), 0.1  $\mu$ Mol S-[Me-<sup>14</sup>C] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 0.33  $\mu$ C/ $\mu$ Mol), 5  $\mu$ Mol bzw. 20  $\mu$ Mol des jeweiligen Kations, 10  $\mu$ Mol Cystein und 0.1 ml eines 0.5 M Tris-HCl-Puffers (pH 7.7) 30 min bei 37° inkubiert (Endvolumen 0.25 ml).

Zugesetztes Kation	Gebildete Menge Metanephrin			
	Kationenkonzentration : 20 mM		Kationenkonzentration : 80 mM	
	nMol	% *	nMol	% *
Kein	0.14	5	0.14	5
Mg <sup>2+</sup>	2.73	100	2.73	100
Mn <sup>2+</sup>	0.91	33	0.67	25
Fe <sup>2+</sup>	0.40	15	0.40	15
Fe <sup>3+</sup>	0.19	7	0.82	30
Co <sup>2+</sup>	0.49	18	0.18	6.5
Ca <sup>2+</sup>	0.60	22	0.60	22
Hg <sup>2+</sup>	0.32	11	0.13	5
Zn <sup>2+</sup>	0	0	0	0
Ni <sup>2+</sup>	0	0	0	0
Cu <sup>2+</sup>	0	0	0	0

\* Bezogen auf Mg<sup>2+</sup> (= 100%).

### Substratspezifität

Die Inkubationen zur Prüfung der Substratspezifität wurden unter Standardbedingungen—jedoch für 120 min—durchgeführt (Tabelle III). Während bei Inkubation von Epinephrin die Monomethyläther Metanephrin (3-O-Methyladrenalin) und Paraneprhin (4-O-Methyladrenalin) im Verhältnis 60:1 entstanden, wurden die isomeren Monomethyläther von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  (2-Methoxy-östradiol-17 $\beta$  und 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$ -3-methyläther) im Verhältnis 3:2 gebildet.

TABELLE III

SUBSTRATSPEZIFITÄT DER ANGEREICHERTEN PLACENTAREN CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE DES MENSCHEN

0.5  $\mu$ Mol Substrat wurden mit 0.1 ml der Enzympräparation (enthaltend 30  $\mu$ g Eiweiss), 0.1  $\mu$ Mol S-[Me-<sup>14</sup>C] Adenosyl-methionin (spezifische Aktivität 1.2  $\mu$ C/ $\mu$ Mol), 1  $\mu$ Mol MgSO<sub>4</sub>, 10  $\mu$ Mol Cystein und 0.1 ml eines 0.5 M Soerensen-Phosphat-Puffers (pH 7.7) 30 min bei 37° inkubiert (Endvolumen 0.25 ml).

Substrat	Gebildete Menge Methyläther	
	nMol	% *
L-Epinephrin-bitartrat	7.20	100
DL-Norepinephrin-hydrochlorid	6.27	87
DL-3,4-Dihydroxy-mandelsäure	6.48	90
DL-3,4-Dihydroxy-benzaldehyd	1.80	25
2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$	6.41	89
L-Tyrosin	0	0
DL-Thyroxin	0	0
Östradiol-17 $\beta$	0	0

\* Bezogen auf die Bildung von Metanephrin (= 100%).

### *Einfluss von 2-Hydroxy-östrogenen auf die Methylierung von Epinephrin durch die Catechol-O-Methyltransferase*

Aus Tabelle III geht hervor, dass 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  durch die placentare Catechol-O-Methyltransferase in etwa gleich grossem Umfange wie Epinephrin methyliert wird. Um den Einfluss von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  auf die Methylierung von Epinephrin zu untersuchen, wurden steigende Mengen Epinephrin (18–200 nMol) unter gleichzeitigem Zusatz von 10 nMol 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  inkubiert. Aus Fig. 5 geht hervor, dass 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  die enzymatische Methylierung von Epinephrin kompetitiv hemmt. Die Inhibitorkonstante  $K_i$  wurde nach DIXON UND WEBB<sup>17</sup> errechnet und betrug  $17.4 \cdot 10^{-6}$  M.

### *Einfluss von Epinephrin auf die Methylierung von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$ durch die Catechol-O-Methyltransferase*

Während die Methylierung von Epinephrin schon durch kleinste Mengen 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  (10% der Epinephrinmenge) zu 50% gehemmt wurde, war umgekehrt ein 10-facher Überschuss an Epinephrin erforderlich, um die Methylierung von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  um etwa 10% zu hemmen.

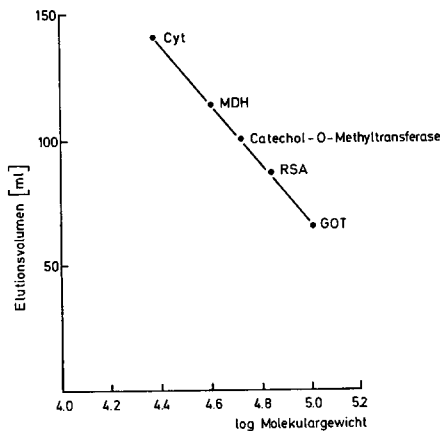


Fig. 6. Beziehungen zwischen Elutionsvolumen und dem Logarithmus des Molekulargewichtes verschiedener Standardproteine sowie der angereicherten placentaren Catechol-O-Methyltransferase des Menschen. Die Bestimmungen wurden mit Hilfe von Sephadex G-100 durchgeführt. Cyt, Cytochrom; MDH, Malatdehydrogenase aus Schweineherzmuskel; RSA, Rinderserumalbumin; GOT, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase aus Schweineherzmuskel.

### *Molekulargewichtsbestimmung*

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde die placentare Catechol-O-Methyltransferase der Gelfiltration an Sephadex G-100 unterworfen. In Fig. 6 wurden die Elutionsvolumina von Standardproteinen gegen die Logarithmen ihrer bekannten Molekulargewichte aufgetragen. Daraus ergibt sich, dass das Molekulargewicht der placentaren Catechol-O-Methyltransferase des Menschen bei etwa 52 000 liegt.

### DISKUSSION

In der Placenta des Menschen kommt eine Catechol-O-Methyltransferase vor,

die Epinephrin zu Metanephrin methyliert. Das Enzym benötigt S-Adenosyl-methionin als Cofaktor und befindet sich in der Cytosol-Fraktion ( $150\,000 \times g$ -Überstand). Durch Behandlung der Cytosol-Fraktion mit  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  und Gelfiltration der 30–60%igen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung durch Sephadex G-100 konnte eine 66-fache Anreicherung des Enzyms erzielt werden. Aus der Tatsache, dass relativ hohe Cystein-Konzentrationen (20 mM) notwendig sind, um die volle Aktivität des angereicherten Enzyms wiederherzustellen, kann auf die Anwesenheit einer grossen Zahl von SH-Gruppen im aktiven Zentrum des Enzyms geschlossen werden. Die höchste Aktivität entfaltet die placentare Catechol-O-Methyltransferase in Gegenwart von  $\text{Mg}^{2+}$ . Auf Grund der Michaelis-Menten-Konstanten kann geschlossen werden, dass der Cofaktor eine höhere Affinität zum Enzym besitzt als das Substrat.

Die angereicherte Catechol-O-Methyltransferase der Placenta des Menschen hat in einigen Punkten ähnliche Eigenschaften wie das von AXELROD UND TOMCHICK<sup>1</sup> beschriebene Enzym aus der Rattenleber. Das Rattenleberenzym befindet sich ebenfalls in der 30–60%igen  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung, wird durch SH-Gruppen-blockierende Substanzen gehemmt und durch zweiwertige Kationen aktiviert. Die Michaelis-Menten-Konstante beträgt  $12 \cdot 10^{-5}$  M für Epinephrin und liegt damit in der gleichen Grössenordnung wie diejenige des Placentaenzyms.

In einer früheren Arbeit haben SENOH *et al.*<sup>18</sup> gezeigt, dass nicht nur die 3-ständige (*m*-Stellung), sondern auch die 4-ständige (*p*-Stellung) Hydroxylgruppe von Catecholaminen durch die Catechol-O-Methyltransferase angegriffen wird. Entsprechende Untersuchungen mit der gereinigten Catechol-O-Methyltransferase der menschlichen Placenta ergaben, dass als Hauptreaktionsprodukt (98%) aus Epinephrin zwar Metanephrin (3-O-Methyladrenalin) entstand, daneben aber auch in Spuren (1.6%) Paranephrin (4-O-Methyladrenalin) gebildet wurde. Bei der Verwendung von 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$  als Substrat betrug das Verhältnis von 2-Methoxy-östradiol 17 $\beta$  zum isomeren 2-Hydroxy-östradiol-17 $\beta$ -3-methyläther etwa 3:2. Offenbar üben die Seitenketten der Catecholamine einerseits und der Steroidnucleus der 2-Hydroxy-östrogene andererseits einen unterschiedlichen Einfluss auf den sterischen Verlauf der enzymatischen Methylierung der Catechole aus. Einige der möglichen Ursachen, die für das unterschiedliche Ausmass der Bildung der isomeren Monomethyläther verantwortlich sein könnten, sind sowohl für die Catecholamine<sup>18</sup> als auch für die 2-Hydroxy-östrogene<sup>19,20</sup> an anderer Stelle diskutiert worden.

Von besonderem Interesse ist die Feststellung, dass die im  $150\,000 \times g$ -Überstand der Rattenleber beobachtete kompetitive Hemmung der enzymatischen Methylierung von Epinephrin durch 2-Hydroxy-östrogene<sup>9</sup> auch bei Verwendung der angereicherten Catechol-O-Methyltransferase der menschlichen Placenta stattfindet.

Abschliessend sei kurz auf die mögliche physiologische Bedeutung der placentaren Catechol-O-methyltransferase eingegangen. Es kann angenommen werden, dass das Enzym einen wesentlichen Anteil an der Methylierung der während der Gravidität vermehrt gebildeten 2-Hydroxy-östrogene hat. Darüberhinaus dürfte sich die placentare Catechol-O-Methyltransferase auch an der biologischen Inaktivierung von Catecholaminen beteiligen. Diesem Punkt kommt wahrscheinlich eine entscheidende Bedeutung beim Vorliegen eines Phäochromocytoms bei graviden Frauen zu. Offenbar wird ein erheblicher Teil der vom Tumor gebildeten blutdruckwirksamen Catecholamine während der Schwangerschaft durch die placentare Catechol-O-Methyltransferase inaktiviert (vgl. Lit. 21). Unter der Geburt, die eine erhebliche Stress-

Situation darstellt, und nach Ausstossung der Placenta fehlt dem Organismus diese— auch quantitative bedeutsame—Möglichkeit der Inaktivierung; dadurch erfolgt ein rapider Anstieg der vasopressiven Substanzen, der für die hohe Mortalität bei Phäochromocytom nach Beendigung der Schwangerschaft mitverantwortlich sein dürfte<sup>21</sup>.

## DANK

Die vorliegende Arbeit wurde mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt. Der eine von uns (R.G.) dankt der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Gewährung eines Forschungsstipendiums.

## LITERATUR

- 1 J. AXELROD UND R. TOMCHICK, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 702.
- 2 H. BREUER, W. VOGEL UND R. KNUPPEN, *Z. Physiol. Chem.*, 327 (1962) 217.
- 3 H. BREUER, G. PANGELS UND R. KNUPPEN, *J. Clin. Endocrinol.*, 21 (1961) 1333.
- 4 R. KNUPPEN UND H. BREUER, *Z. Physiol. Chem.*, 346 (1966) 114.
- 5 R. HOBKIRK UND M. NILSEN, *J. Clin. Endocrinol.*, 23 (1963) 274.
- 6 H. BREUER, *Res. Steroids*, 1 (1964) 133.
- 7 J. FISHMAN UND D. DIXON, *Biochemistry*, 6 (1967) 1683.
- 8 H. BREUER, W. LUBRICH UND R. KNUPPEN, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 3.
- 9 R. KNUPPEN, W. LUBRICH, O. HAUPT, U. AMMERLAHN UND H. BREUER, *Z. Physiol. Chem.*, 350 (1969) 1067.
- 10 R. KNUPPEN, M. HÖLLER, D. TILMANN UND H. BREUER, *Z. Physiol. Chem.*, 350 (1969) 1301.
- 11 P. TROEN, *J. Clin. Endocrinol.*, 21 (1961) 895.
- 12 O. J. LUCIS, *Steroids* 5 (1965) 163.
- 13 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBOROUGH, A. L. FARR UND R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 14 O. FOLIN UND V. CIOCALTEU, *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 627.
- 15 J. W. DALY, J. AXELROD UND B. WITKOP, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1155.
- 16 H. LINEWEAVER UND D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- 17 M. DIXON UND E. C. WEBB, *Enzymes*, Longmans, New York, 1967, p. 328.
- 18 S. SENOH, J. DALY, J. AXELROD UND B. WITKOP, *J. Am. Chem. Soc.*, 81 (1959) 6240.
- 19 R. KNUPPEN UND H. BREUER, *Advan. Biosci.*, 3 (1969) 81.
- 20 J. FISHMAN, M. MIYAZAKI UND I. YOSHIZAWA, *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967) 147.
- 21 U. S. BARZEL, Z. BAR-ILAN, G. RUMNEY, Y. LAZEBNIK, B. ECKERLING UND A. DE VRIES, *Am. J. Obstet. Gynaecol.*, 89 (1964) 519.