

## Nachweis der *p*-O-Methylierung des Catecholaminmetaboliten Protocatechusäure in der isoliert perfundierten Rattenleber

Helmut Thomas\*, Dieter Müller-Enoch und Stephan Roth

(Der Schriftleitung zugegangen am 2. Oktober 1972)

**Zusammenfassung:** Eine isolierte Rattenleber wurde mit dem Catecholaminmetaboliten 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure) als Substrat und mit *S*-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat sowie *S*-Adenosyl-[methyl-<sup>14</sup>C]L-methionin durchströmt. Im Hydrolysat des Perfusatextraktes konnten dünn-schichtchromatographisch 2 radioaktive Metaboliten nachgewiesen werden, deren  $R_F$ -Werte denen von 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure) und 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure) entsprachen. Im Radiochromato-

gramm verhielten sich die Radioaktivitätsmengen wie 4,9:1. Die Identifizierung der isolierten Metaboliten, die mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik erfolgte, führte zu dem Ergebnis, daß in der Rattenleber aus dem Catecholaminmetaboliten neben dem schon bekannten Abbauprodukt Vanillinsäure auch Isovanillinsäure entsteht, so daß also nicht nur die *m*-, sondern auch die *p*-ständige Hydroxylgruppe der Dihydroxyphenylverbindung methyliert wird.

*Demonstration of the p-O-methylation of the catecholamine metabolite, protocatechuic acid, in isolated, perfused rat liver*

**Summary:** The catecholamine metabolite, 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid) acted as the substrate in the perfusion of an isolated rat liver; the perfusate also contained *S*-adenosyl-L-methionine-hydrogen sulphate and *S*-adenosyl-[methyl-<sup>14</sup>C]L-methionine. Two radioactive metabolites with the same  $R_F$  values as 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid (vanillic acid) and 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid (isovanillic acid) were detected by thin-layer chromatography in the per-

fusate. The total counts of the two metabolites on the radiochromatogram were in the ratio 4.9:1. The identity of the two metabolites was confirmed by reversed isotope dilution. Thus, besides vanillic acid, isovanillic acid may be added to the list of known degradation products of the catecholamines, i.e. methylation can occur at the *p*-hydroxyl group as well as at the *m*-hydroxyl group of the dihydroxyphenyl compound.

Am enzymatischen Abbau der Brenzkatechinamine ist neben der Monoamin-Oxidase die Brenzkatechin-Methyltransferase<sup>[1]</sup> beteiligt. Nach bisheriger Ansicht katalysiert dieses Enzym im gesunden

Organismus in vivo eine Methylierung lediglich der *m*-ständigen Hydroxylgruppe der Catecholamine und von Catecholaminmetaboliten, soweit sie als Dihydroxyphenylverbindungen vorliegen<sup>[2]</sup>. Dies

\* *Postanschrift:* Prof. Dr. H. Thomas, Abteilung für Biochemie der Universität, D-79 Ulm/Donau, Neubau Oberer Eselsberg, N 26.

*Enzyme:*

Brenzkatechin-Methyltransferase, *S*-Adenosylmethionin:Brenzkatechin-*O*-Methyltransferase (EC 2.1.1.6)  
Monoamin-Oxidase, Monoamin:Sauerstoff-Oxidoreduktase (desaminierend) (EC 1.4.3.4).

<sup>1</sup> Axelrod, J. & Tomchik, R. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 702–705.

<sup>2</sup> Übersicht s. Thomas, H. & Roth, S. (1972) *diese Z.* **353**, 138–142.

erscheint um so auffälliger, als sich im In-vitro-Versuch beweisen ließ, daß die genannte Methyltransferase auch eine Methylierung der *p*-Hydroxylgruppe von Adrenalin<sup>[3]</sup>, Noradrenalin<sup>[3]</sup> und 2-(3,4-Dihydroxyphenyl)äthylamin (Dopamin)<sup>[4]</sup> bewirken kann. In vivo wurde bei der Ratte eine *p*-O-Methylierung von Adrenalin, Noradrenalin und 3,4-Dihydroxyacetophenon<sup>[3]</sup> – diese Substanzen stellen keine biogenen Substrate dar – nachgewiesen und zwar unter Bedingungen, unter denen eine solche *p*-O-Methylierung von Adrenalin nicht festzustellen war.

Eine Reihe von Untersuchern hat sich mit der Frage beschäftigt, ob im Organismus von Schizophrenen eine „abnorme“ Methylierung der *p*-ständigen Hydroxylgruppe des Dopamins erfolgen könne<sup>[5]</sup>. In einer vorausgehenden Arbeit<sup>[2]</sup> wurde gezeigt, daß in der isoliert perfundierten Rattenleber der 3,4-Dihydroxybenzaldehyd (Protocatechualdehyd), ein Abbauprodukt von Adrenalin und Noradrenalin<sup>[6–8]</sup>, zur 4-Methoxy-Verbindung Isovanillin methyliert werden kann. Durch die vorliegende Untersuchung wird dieser Befund insofern ergänzt, als bewiesen wird, daß während der Rattenleberperfusion aus dem Catecholamin-Abbauprodukt 3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure)<sup>[8]</sup> nicht nur, wie bereits bekannt, die entsprechende 3-Methoxy-Verbindung Vanillinsäure<sup>[9–12]</sup>, sondern auch – durch Methylierung der *p*-ständigen Hydroxylgruppe – 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure) entsteht.

## Material und Methoden

### Substanzen

3,4-Dihydroxybenzoesäure (Protocatechusäure) (Fluka AG, Buchs), 4-Hydroxy-3-methoxybenzoesäure (Vanillinsäure) (Dr. T. Schuchardt, München), *S*-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat (Boehringer, Mannheim GmbH) und *S*-Adenosyl-[methyl-<sup>14</sup>C]-L-methionin mit einer spezifischen Aktivität von 60 mCi/mMol (Radiochemical Centre Amersham) wurden in Form von Handelspräparaten verwendet. 3-Hydroxy-4-methoxybenzoesäure (Isovanillinsäure) ließ sich aus Isovanillin in Analogie zur Darstellung von Vanillinsäure aus Vanillin<sup>[13]</sup> synthetisieren. Der Schmp. lag bei 255 bis 256°C (Lit.<sup>[14]</sup> (256–257°C)). Der Isovanillinsäuremethylester<sup>[15]</sup> schmolz nach Umkristallisation aus Essigsäure-äthylester/Petroläther bei 66–67°C (Lit.<sup>[15]</sup>: 68°C).

Für die Szintillationsmessungen wurde eine Lösung von 3 g 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,1 g 1,4-Bis-(5-phenyl-2-oxazolyl)benzol (POPOP) (E. Merck AG, Darmstadt) in 1 l Toluol verwendet.

### Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 12 Wochen alte, 300 g schwere männliche Sprague-Dawley-Ratten, die mit dem Standardfutter Altromin und Wasser ad libitum ernährt worden waren. 30 min vor der Dekapitation wurde den Tieren 0,5 ml Liquemin injiziert.

### Leberperfusion

Die Perfusion der isolierten Leber erfolgte retrograd von der Lebervene her<sup>[16]</sup> mittels einer von Staib und Mitarbeitern<sup>[17]</sup> angegebenen Apparatur. Das Perfusionsmedium war eine wäßrige Salzlösung<sup>[18,19]</sup> folgender Zusammensetzung: 137mm NaCl, 3mm KCl, 0,7mm NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5mm CaCl<sub>2</sub>, 0,5mm MgCl<sub>2</sub> und

13 Rabjohn, N. (1963) *Organic Synthesis, Collective Volume IV*, S. 972–973, John Wiley & Sons Inc., New York, London.

14 Fischer, E., Bergmann, M. & Lipschitz, W. (1918) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **51**, 45–79.

15 Weizmann, Ch. & Haskelberg, L. (1944) *J. Org. Chem.* **9**, 121–124.

16 Schriefers, H. & Korus, W. (1960) *diese Z.* **318**, 239–250.

17 Staib, W., Staib, R., Herrmann, J. & Meiers, H. G. (1968) in *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*, 3. Konf. Ges. Biol. Chem., April 1967 (Staib, W. & Scholz, R., Hrsg.) S. 155–167, Springer Verlag, Berlin.

18 Schimassek, H. (1962) *Life Sci.* **11**, 629–634.

19 Scholz, R. (1968) in *Stoffwechsel der isoliert perfundierten Leber*, 3. Konf. Ges. Biol. Chem., April 1967, (Staib, W. & Scholz, R., Hrsg.) S. 25–52, Springer Verlag, Berlin.

<sup>3</sup> Daly, J. W., Axelrod, J. & Witkop, B. (1960) *J. Biol. Chem.* **235**, 1155–1159.

<sup>4</sup> Senoh, Š., Daly, J., Axelrod, J. & Witkop, B. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 6240–6245.

<sup>5</sup> Übersicht s. Boulton, A. A. (1971) *Nature (London)* **231**, 22–28.

<sup>6</sup> Karlson, P., Sekeris, C. E. & Herrlich, P. (1963) *Deut. Med. Wochenschr.* **88**, 1873–1878.

<sup>7</sup> Herrlich, P. & Sekeris, C. E. (1963) *Biochim. Biophys. Acta* **78**, 750.

<sup>8</sup> Thomas, H. (1967) *diese Z.* **348**, 963–969.

<sup>9</sup> Dirscherl, W., Thomas, H. & Schriefers, H. (1961) *Symp. Deut. Ges. Endokrinol.* **8**, 18–22.

<sup>10</sup> Dirscherl, W., Thomas, H. & Schriefers, H. (1962) *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* **39**, 385–394.

<sup>11</sup> Rosen, L. & Goodall, M. C. (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **110**, 767–769.

<sup>12</sup> Dirscherl, W. & Brisse, B. (1964) *Acta Endocrinol. (Copenhagen)* **45**, 641–646.

24mM NaHCO<sub>3</sub>. Nach Perfusion der Leber mit 400 ml dieses Mediums (Vorlauf) wurde das Organ mit 500 ml der Salzlösung, in der 50 mg Protocatechusäure als Substrat und 80,5 mg *S*-Adenosyl-L-methionin-hydrogensulfat sowie 50 µCi *S*-Adenosyl-[methyl-<sup>14</sup>C]-L-methionin gelöst waren, in zwei Durchgängen durchströmt. Die mittlere Durchflußgeschwindigkeit betrug 1,1 ml × min<sup>-1</sup> × g<sup>-1</sup>.

#### Aufarbeitung des Perfusates

Das Perfusat wurde mit 2 ml konz. HCl angesäuert, mit 50 g NaCl versetzt und 8mal mit 500 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Der Eindampfrückstand wurde mit Aceton in ein Reagenzglas überführt, zur Trockne gebracht und mit 3 ml 6*N* HCl versetzt, das zugeschmolzene Reagenzglas 18 h bei 105°C aufbewahrt. Das so erhaltene Hydrolysat wurde mit 100 ml Wasser versetzt und im Liquid-Liquid-Extraktor mit 250 ml Äther 24 h kontinuierlich extrahiert. Der Extrakt-trockenrückstand ließ sich in 10 ml Aceton lösen („Ausgangslösung“).

#### Chromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden DC-Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub> (20 × 20 cm, 0,25 mm) der Firma Merck verwendet. Als Fließmittel dienten die folgenden Systeme: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase) (System I), Benzol/Methanol/Eisessig 45:8:4 (System II) und Toluol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 5:4:1 (System III). Die Chromatographie erfolgte jeweils zweifach über eine Strecke von 15 cm. Die Substanzen ließen sich visuell unter UV-Licht lokalisieren. Außerdem wurden zur Lokalisation von radioaktiven Metaboliten nach erfolgter Chromatographie auf einer 2 cm breiten Bahn längs der Laufrichtung kontinuierlich 1,4 mm schmale Zonen von der Platte geschabt, die einzelnen Proben mit 1 ml Methanol, 1 ml Toluol und 10 ml Szintillator-Lösung versetzt. Die Messung der am Kieselgel anhaftenden <sup>14</sup>C-Aktivität der einzelnen Zonen erfolgte im Flüssigkeitsszintillationszähler (Packard, Tri-Carb Spektrometer, Modell 2420). Die Zählausbeute bestimmte man mit einem Toluol-<sup>14</sup>C-Standard.

#### Identifizierung

Sie erfolgte außer durch Dünnschichtchromatographie in den verschiedenen Systemen mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik<sup>[20]</sup>. Hierzu wurde auf 4 Dünnschichtplatten je ein aliquoter Teil (0,2 ml) des in 10 ml Aceton gelösten Ätherextrakt-trockenrückstandes („Ausgangslösung“) aufgetragen und chro-

matographisch aufgetrennt. Die Zonen, die in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit Vanillinsäure bzw. Isovanillinsäure entsprachen (Metaboliten I und II), wurden von der Platte geschabt und je 5mal mit 10 ml Aceton extrahiert, die filtrierten Extrakte (Glasfritte) eingedampft, die Trockenrückstände in je 5 ml Methanol gelöst. Je 0,5 ml dieser Lösungen wurden zur Bestimmung der <sup>14</sup>C-Aktivität verwendet, der Rest wurde eingedampft. Den Eindampfrückständen setzte man 50 mg der jeweils authentischen Substanz (Vanillinsäure bzw. Isovanillinsäure) als „carrier“ zu.

Um zu zeigen, daß die Technik der umgekehrten Isotopenverdünnung auch für die Identifizierung der beiden isomeren Phenolcarbonsäuren, die als Metaboliten erwartet wurden, anwendbar ist, wurden diese nach Chromatographie wie beschrieben erneut isoliert. Es wurde jetzt zusätzlich I mit 50 mg Isovanillinsäure, II mit 50 mg Vanillinsäure versetzt. Die spezifische Aktivität (Zpm/µMol) wurde in allen Fällen berechnet und nach Umkristallisation des Metabolit-„carrier“-Gemisches aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen (Äthanol/Petroläther, Aceton/n-Hexan, Äthanol/n-Hexan, Aceton/Petroläther) jeweils neu bestimmt.

Zur zusätzlichen Sicherung der Identität wurde im Falle der Substanz II die umgekehrte Isotopenverdünnungstechnik auch mit einem Derivat, nämlich dem Methyl ester durchgeführt: Der Metabolit II wurde wie oben beschrieben nach Chromatographie aus 12 DC-Platten isoliert und mit 4*N* methanolischer HCl (7 h, Raumtemperatur) verestert. Nach Ätherextraktion aus wäßriger Lösung wurde eingedampft, der Eindampfrückstand, in 0,5 ml Aceton gelöst, auf 2 DC-Platten verteilt und chromatographiert. Die dem Methyl ester entsprechende radioaktive Zone eluierte man 5mal mit 10 ml Aceton. Der Eluat-trockenrückstand wurde mit authentischem Isovanillinsäure-methyl ester versetzt und aus Essigsäure-äthylester/Petroläther bzw. Aceton/n-Hexan umkristallisiert.

#### Ergebnisse und Diskussion

Wurden aliquote Teile der nach Perfusion erhaltenen „Ausgangslösung“ in den Systemen I, II und III dünnschichtchromatographisch aufgetrennt, so ließen sich außer dem Substrat (Protocatechusäure) jeweils 2 Metaboliten (I und II) lokalisieren, deren R<sub>F</sub>-Werte mit denen von authentischer Vanillinsäure und Isovanillinsäure übereinstimmten (Tab. 1).

Das in der Abbildung gezeigte Radiochromatogramm wurde erhalten, nachdem 1/100 der „Ausgangslösung“ durch 2malige Chromatographie in System I aufgetrennt, ein Teil der „Substanzbahn“ in Zonen von der Platte gekratzt und die <sup>14</sup>C-Aktivität der einzelnen Kieselgelproben bestimmt wor-

<sup>20</sup> Axelrod, L. R., Matthijssen, Ch., Goldzieher, J. W. & Pulliam J. E. (1965) *Acta Endocrinol.* (Copenhagen) Suppl. 99.

Tab. 1. Dünnschichtchromatographische Identifizierung der nach Rattenleberperfusion mit Protocatechusäure nachgewiesenen biogenen Substanzen I und II.

Es wurde jeweils eine zweimalige Chromatographie auf DC-Fertigplatten Kieselgel F<sub>254</sub> (20 × 20 cm, 0,25 mm) durchgeführt. Lösungsmittelsysteme: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase) (System I), Benzol/Methanol/Eisessig 45:8:4 (System II) und Toluol/Ameisensäure-äthylester/Ameisensäure 5:4:1 (System III).

Lösungsmittelsystem	<i>R<sub>F</sub></i> -Werte			
	Authentische Vanillinsäure	Biogene Substanz I	Authentische Isovanillinsäure	Biogene Substanz II
I	0,44	0,45	0,37	0,36
II	0,62	0,62	0,57	0,57
III	0,64	0,63	0,58	0,58

den war. Sie ist in der Abbildung gegen die Laufstrecke aufgetragen. Das Radiochromatogramm weist in Höhe der authentischen Vanillinsäure ( $R_F=0,44$ ) und Isovanillinsäure ( $R_F=0,37$ ) jeweils

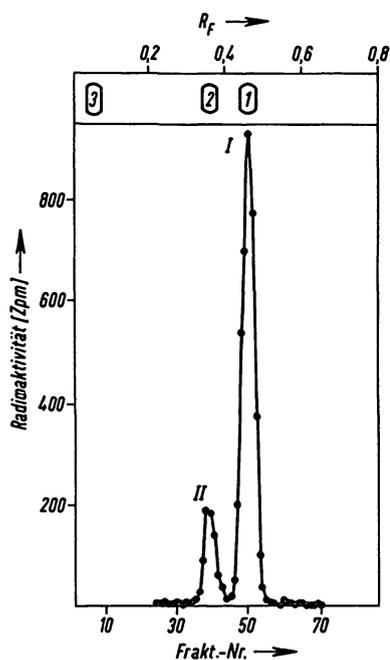


Abbildung. Radiochromatogramm eines aliquoten Teils des nach Perfusion gewonnenen Extraktes (Einzelheiten s. Text).

Zweimalige Dünnschichtchromatographie auf DC-Fertigplatte Kieselgel F<sub>254</sub> (20 × 20 cm, 0,25 mm).

Fließmittel: Benzol/Eisessig/Wasser 2:2:1 (obere Phase). Authentische Substanzen: Vanillinsäure (1), Isovanillinsäure (2), Protocatechusäure (3).

eine radioaktive Substanzzone (Metaboliten I und II) auf. Die Radioaktivitätsmengen verhalten sich wie 4,9:1.

Aus Tab. 2 geht hervor, daß sich mit Hilfe der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik die biogene Substanz I als Vanillinsäure, der Metabolit II als Isovanillinsäure identifizieren ließ: Zwischen den berechneten und gefundenen Werten für die spezifische Aktivität (Zpm/ $\mu$ Mol) besteht eine gute Übereinstimmung. Das gleiche gilt auch für das Derivat von II, den Isovanillinsäure-methylester. Daß das Verfahren zur Identifizierung der beiden Isomeren angewendet werden kann, geht ebenfalls aus Tab. 2 hervor; denn bei Zusatz von Isovanillinsäure als „carrier“ zu I bzw. von Vanillinsäure zu II zeigte sich unter der Rekrystallisation ein schnelles Absinken der spezifischen Aktivität.

Der hiermit erhobene Befund, daß die Rattenleber imstande ist, die Protocatechusäure nicht nur, wie bereits bekannt, in Vanillinsäure, sondern auch in die 4-Methoxy-Verbindung Isovanillinsäure umzuwandeln, ist ein weiterer Beweis dafür, daß sich in diesem Organ eine *p*-*O*-Methylierung von Catecholaminmetaboliten vollziehen kann. Da die Leberperfusion eine der In-vivo-Situation stark angenähertes System darstellt, liegt die Vermutung nahe, daß die Leber der Ratte auch in vivo die Protocatechusäure am *p*-ständigen Hydroxyl zu methylieren vermag, und es gewinnt die Frage, ob nicht auch in der Leber des gesunden Menschen eine *p*-*O*-Methylierung von Catecholamin-Abbauprodukten erfolgen kann, erneut an Aktualität.

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

Tab. 2. Identifizierung der nach Hydrolyse des Perfusatextraktes isolierten Metaboliten I und II sowie des Methyl-esters von II nach der umgekehrten Isotopenverdünnungstechnik.

Bei jedem Metaboliten wurde einer definierten Menge <sup>14</sup>C-Aktivität eine definierte Menge (46–50 mg) der authentischen, nicht markierten Verbindung zugesetzt. Außerdem wurde der Metabolit I mit Isovanillinsäure (4), der Metabolit II mit Vanillinsäure (5) versetzt. Die spezif. Aktivität (Zpm/μMol) wurde berechnet und nach jeder Kristallisation aus verschiedenen Lösungsmittelgemischen (Äthanol/Petroläther, Aceton/n-Hexan, Äthanol/n-Hexan, Aceton/Petrol-äther bzw. Essigsäure-äthylester/Petroläther und Aceton/n-Hexan) im Tri-Carb Szintillationszähler bestimmt.

Nr.	<sup>14</sup> C-Metabolit	Zugesetzter „Carrier“	Berechnet	Spezifische Aktivität [Zpm/μMol] Gefunden nach Kristallisation				
				1.	2.	3.	4.	5.
(1)	II	Isovanillinsäure	429	371	372	369	368	367
(2)	I	Vanillinsäure	226	197	196	196	194	195
(3)	Methylester von II	Isovanillinsäure-methylester	685	658	628	629	632	
(4)	I	Isovanillinsäure	343	26	8	3	2	1,8
(5)	II	Vanillinsäure	111	55	24	20	12	7