

Elektrochemische Aktivitätsbestimmung der humanen Monoaminoxidase B durch selektive Bindung

S. Höfs¹, T. Greiner¹, G. Göbel¹, A. Talke², U. Ahnert², F. Lisdat¹

¹ Biosystems Technology, Technical University Wildau, Wildau, Germany

² Biotex GmbH, Berlin, Germany

Kontakt: ggoebel@th-wildau.de

Einleitung

Morbus Parkinson gehört zu den weltweit häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen [1]. Der Verlust von Neuronen in der Substantia nigra führt zu einem Dopaminmangel im Gehirn [2], der die Signalleitung beeinträchtigt und damit die Parkinson-typischen Bewegungsstörungen verursacht. Kommt als weiteres Merkmal die intrazelluläre Akkumulation von α -Synuclein hinzu, gilt die Diagnose von Parkinson als gesichert [3].

Derzeit gibt es keine Therapie, die Morbus Parkinson verhindern bzw. deren Fortschreiten aufhalten kann. Um die Lebensqualität der betroffenen Patienten zu verbessern, werden die Symptome durch das Einstellen des Dopaminspiegels behandelt. Die Gabe der Dopaminvorstufe L-Dopa in Verbindung mit Inhibitoren Dopamin-abbauender Enzyme führt im frühen Stadium der Erkrankung zu einer deutlichen Besserung [4]. Infolge der fortschreitenden Degeneration der dopaminergen Zellen verstärken sich allerdings im Laufe der Zeit die motorischen Störungen wieder. Um die Dosierung der Medikamente zu optimieren, ist eine Messung der Aktivität der betreffenden Enzyme wünschenswert.

Diese Studie konzentriert sich auf die Aktivitätsbestimmung der Monoaminoxidase B (Mao B), die die Desaminierung von primären und sekundären aromatischen Aminen katalysiert [5].

In der Literatur sind verschiedene Methoden zur Aktivitätsbestimmung der Mao B beschrieben. In komplexen Medien wird häufig die Markierung mit C-14 eingesetzt [6], deren Anwendung jedoch besondere Vorsichtsmaßnahmen erfordert. Fluorometrische Assays detektieren das enzymatisch gebildete Wasserstoffperoxid. In komplexen biologischen Proben ist ihre Selektivität jedoch eingeschränkt.

Die elektrochemische Quantifizierung der Mao B-Aktivität ist Gegenstand nur weniger Publikationen. Reyes-Parada bestimmt die Aktivität der Mao B mittels HPLC und anschließender amperometrischer Detektion des aus 4-Dimethylaminophenethylamin gebildeten Reaktionsproduktes 4-Dimethylaminophenylelessigsäure [7].

Des Weiteren kann die Aktivitätsbestimmung der Mao B durch die selektive Detektion von Edukt oder Produkt an

PEDOT:NAFION modifizierten Kohlefaser-Elektroden erfolgen⁸. Obwohl die Detektion von Catecholaminen in der Literatur intensiv bearbeitet wird, wird der selektiven Detektion dieser Botenstoffe in Gegenwart ihrer Metabolite allerdings wenig Beachtung geschenkt. So erlaubt fluor-dotiertes Zinnoxid die selektive Detektion von Dopamin nach der Umsetzung zu Methoxytyramin durch die Catechol-O-Methyltransferase [8].

Schließlich erlaubt auch das bei der enzymatischen Substratumsetzung entstehende Wasserstoffperoxid eine Quantifizierung der Aktivität. Hierfür eignen sich insbesondere auf Preußisch Blau-basierende Elektroden, die bereits bei geringen Überpotentialen die Reduktion des Wasserstoffperoxids erlauben [9]. Die polykristalline Struktur des Preußisch Blau ermöglicht kleinen Molekülen wie Wasserstoffperoxid das selektive Eindringen in die Gitterstruktur [10]. Diese vorteilhafte Eigenschaft soll hier mit der Fähigkeit von spezifischen Antikörpern zur selektiven Bindung der Mao B kombiniert werden.

Methoden und Materialien

Wasserstoffperoxid-Messungen

Die elektrochemischen Messungen erfolgten an dem Potentiostaten CHI 800.

Vor der Kalibrierung der H₂O₂ Elektroden (Rusens, Russland), erfolgte eine elektrochemische Vorbehandlung mit 100 μ M H₂O₂ in 100 mM Phosphatpuffer (pH 7,2) mit 100 mM KCl und 1 mM Benzylamin. Dafür wurden die Elektroden in einer Wall-Jet-Durchflusszelle von Rusens platziert, die in ein Fließsystem integriert war. Eine Peristaltikpumpe sorgte für eine Flussrate von 310 μ l/min. Zum Austausch der Lösungen wurde die Pumpe abgeschaltet, um Luftblasen im Fließsystem zu vermeiden.

Zunächst wurde ein Potential von -100 mV vs. Ag/AgCl angelegt, welches die Reduktion des H₂O₂ erlaubt. Anschließend wurde der Puffer (100 mM Phosphat (pH 7,2), 100 mM KCl und 1 mM Benzylamin) durch das Fließsystem gepumpt bis sich der Basisstrom stabilisiert hatte. Danach wurden für 5 min 100 μ M H₂O₂ durch die Zelle geleitet und

schließlich wurde das Fließsystem mit Puffer gespült, bis sich ein stabiler Basisstrom einstellte.

Im Anschluss erfolgte die Kalibrierung der Preußisch Blau-Elektroden in einem H_2O_2 -Konzentrationsbereich von $0,5 \mu\text{M}$ bis $20 \mu\text{M}$ in dem oben angegebenen Puffer. Nach jeder Messung wurde das System gespült, bis wieder ein konstanter Basisstrom vorlag.

Da Sensitivität der Preußisch Blau-Elektroden variierte, wurde die Kalibrierung für neue jede Elektrode durchgeführt.

Vor den Mao B-Aktivitätsmessungen, wurden das Mao B Substrat Benzylamin sowie die Produkte der enzymatischen Reaktion NH_3 und Benzaldehyd hinsichtlich ihres Einflusses auf das Messsignal untersucht. Dafür wurden $500 \mu\text{l}$ der drei Verbindungen mit Konzentrationen im Bereich von 1 mM bis 15 mM mit $310 \mu\text{l}/\text{min}$ bei -100 mV vs. Ag/AgCl durch die Fließzelle geleitet.

Schließlich erfolgte die Aktivitätsbestimmung durch das Durchleiten von Substrat-Lösungen ($500 \mu\text{l}$), die unterschiedlich lange in Kontakt mit der Mao B waren.

Mao B-Anreicherung

Um die Mao-B aus einer biologischen Probe zu isolieren wurden spezifische Antikörper eingesetzt. Diese wurden an Cellulose-Beads gekoppelt. Zunächst wurden $40 \mu\text{l}$ der Bead-Suspension mit $2000 \mu\text{l}$ 100 mM Phosphatpuffer, $\text{pH } 7,2$ (PP) gewaschen und bei 7400 rpm zentrifugiert. Nach der Resuspendierung in PP wurde die Mao B mit einer Proteinkonzentration von $2,5 \text{ mg}/\text{ml}$ unter Schütteln bei $21 \text{ }^\circ\text{C}$ für eine Stunde inkubiert. Schließlich wurden die Beads jeweils 4-mal abzentrifugiert und resuspendiert, um ungebundene Mao B zu entfernen.

Bestimmung der Enzymaktivität

Um die Detektion unterschiedlicher Mao-B Aktivitäten in biologischen Proben zu simulieren, wurden in den Experimenten verschiedene Volumina der Mao B-gekoppelten Cellulose-Beads ($40 \mu\text{l}$ bis $160 \mu\text{l}$) eingesetzt. Bei allen Ansätzen wurde das Volumen mit PP auf $1000 \mu\text{l}$ aufgefüllt und in 4 Fraktionen zu $250 \mu\text{l}$ aufgeteilt und bei 7400 rpm zentrifugiert. Nach Zugabe von $600 \mu\text{l}$ 1 mM Benzylamin in PP wurden die Ansätze für $0, 10, 20, 30 \text{ min}$ bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ unter Schütteln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Beads abzentrifugiert und $500 \mu\text{l}$ des Überstandes mit $17,3 \mu\text{l}$ 3 M KCl (in PP) hinzugegeben, um eine KCl -Konzentration von 100 mM zu erhalten (wichtig für das Potential der Ag/AgCl Referenz). Danach wurde die H_2O_2 -Konzentration amperometrisch bestimmt (Abb. 1).

Zur Verifizierung der Ergebnisse aus den amperometrischen Messungen wurde die H_2O_2 -Konzentration mittels eines optischen Assays (Monoamine Oxidase Activity Kit, Sigma Aldrich) bestimmt.

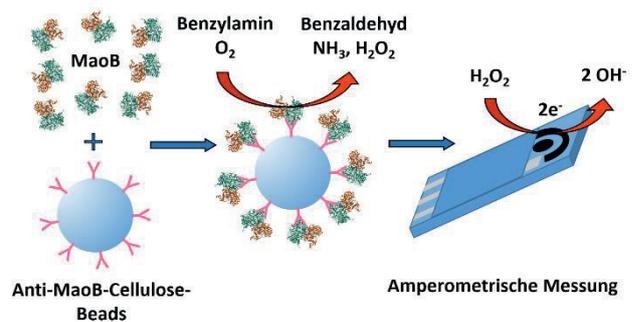


Abb. 1: Prinzip der Aktivitätsbestimmung der Mao B mittels amperometrischer Messung an Preußisch Blau-modifizierten Dickschicht-Elektroden von Rusens.

Ergebnisse

Amperometrische Wasserstoffperoxid-Messungen

Die amperometrische H_2O_2 -Bestimmung wurde mit kommerziell erhältlichen Dickschichtelektroden durchgeführt, wobei eine Preußisch Blau-modifizierte Kohlenstoffelektrode mit einer Kohlenstoff-Gegenelektrode und einer Silber-Referenzelektrode kombiniert wird. Ein stabiles Referenzpotential ist dabei erst ab einer KCl -Konzentration von 100 mM gewährleistet und wurde für alle amperometrischen Messungen verwendet. Für eine gute Reproduzierbarkeit war eine elektrochemische Vorbehandlung der Elektroden mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 erforderlich.

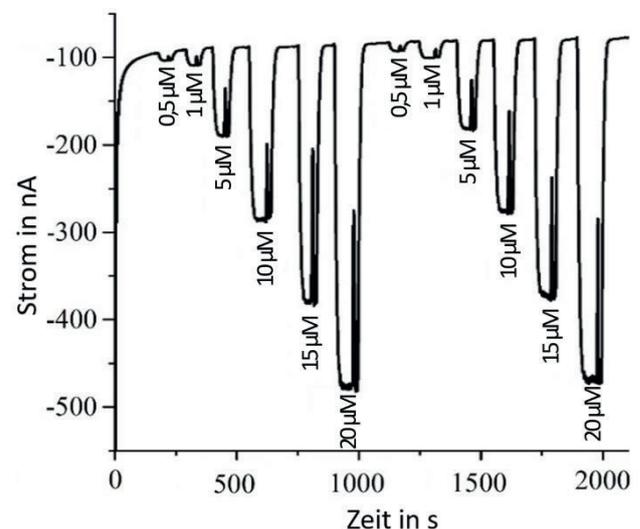


Abb. 2: Amperometrische Messung von H_2O_2 an vorhandenen Preußisch Blau-Dickschicht-Elektroden von Rusens in 100 mM Phosphatpuffer ($\text{pH } 7,2$) mit 100 mM KCl bei einem Potential von -100 mV vs. Ag/AgCl und einer Flussrate von $310 \mu\text{l min}^{-1}$.

Nach der Vorbehandlung konnte die Kalibrierung mit H_2O_2 erfolgen. Um die Signalstabilität zu zeigen, wurde die Kalibrierung dreimal in einem amperometrischen Experiment wiederholt (Abb. 2). Dabei ist festzustellen, dass das Signal mindestens 50 min sehr stabil ist und das amperometrische Messsignal linear von der H_2O_2 -Konzentration abhängt.

(Abb. 3). Die Sensitivität der Preußisch Blau-modifizierten Elektroden sinkt von der ersten bis zur dritten Messung um nur 1 Prozent. Diese leichte Abnahme ist wahrscheinlich auf die Reduktion von Preußisch Blau zu Preußisch Weiß zurückzuführen, letzteres zeigt auf Elektroden eine geringere thermodynamische Stabilität (Karyakin, 2001).

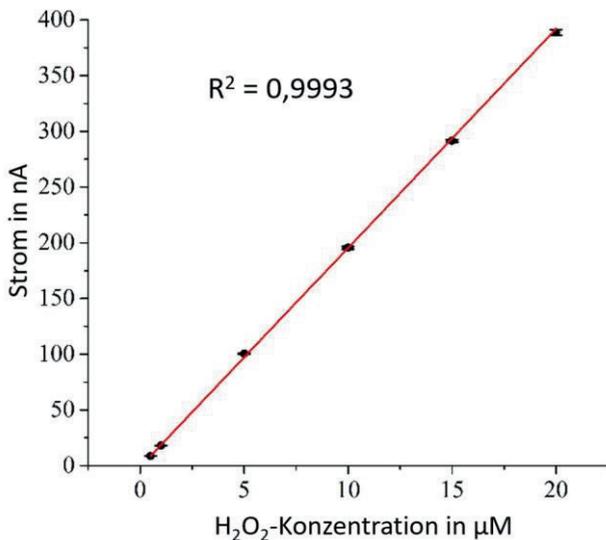


Abb. 3: Kalibrationskurve der Preußisch Blau-Dickschicht-Elektroden für H₂O₂.

Für die Bestimmung der Mao B-Aktivität mittels amperometrischer H₂O₂-Messung muss auch der Einfluss des Substrates Benzylamin und der Reaktionsprodukte Benzaldehyd und NH₃ auf das Messsignal betrachtet werden. Während µ-molare Konzentrationen von Benzaldehyd und NH₃, wie sie beim Umsatz von Benzylamin durch die Mao B in den untersuchten Zeitspannen entstehen, keinen Einfluss auf die Signalstärke hatten, zeigte sich in Gegenwart von 1 mM Benzylamin ein geringfügiger Anstieg um etwa 10 nA. Diese hohe Benzylaminkonzentration ist aber für das Messen der Enzymaktivität erforderlich. Um Fehler bei der H₂O₂-Bestimmung zu vermeiden, wurde den Lösungen zur H₂O₂-Kalibrierung 1 mM Benzylamin hinzugegeben.

Nach dem Anpassen der Messlösungen konnten die Preußisch Blau-modifizierten Dickschicht-Elektroden mit hinreichender Spezifität für die Mao B-Aktivitätsmessungen mittels amperometrischer H₂O₂-Detektion eingesetzt werden.

Amperometrische Mao B-Aktivitätsmessungen

Spezifische Antikörper wurden dafür eingesetzt, das Enzym aus einer Lösung selektiv zu binden. Dabei wurde auch untersucht, ob die Antikörperbindung die enzymatische Aktivität beeinflusst. Für den Test können nur Antikörper eingesetzt werden, die weit genug vom aktiven Zentrum binden. Die Antikörper wurden für die Bindung der Mao-B an Cellulose-Beads gekoppelt. Dann wurde die gebundene Mao B für 10, 20 und 30 min in einer Lösung mit 1 mM

Benzylamin inkubiert und anschließend das gebildete Wasserstoffperoxid detektiert. Aus den amperometrischen Signalen wurden mittels der Kalibrierungsgeraden die betreffenden H₂O₂-Konzentrationen ermittelt.

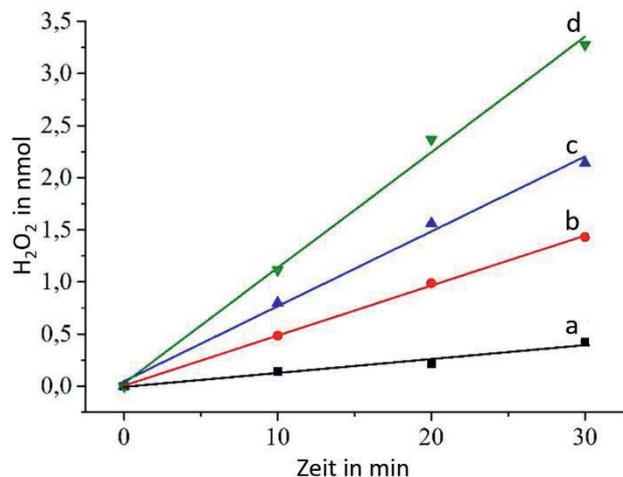


Abb. 4: Bestimmung der Aktivität der an mit Antikörpern modifizierten Cellulose-Beads gebundenen Mao B mittels amperometrischer Messung des beim enzymatischen Umsatz von Benzylamin entstehenden Wasserstoffperoxids. Die verschiedenen Geraden repräsentieren Messungen mit Proben, die (a) 1.6; (b) 2.3; (c) 3.2 oder (d) 4.8 % (v/v) Cellulose-Beads mit gebundener Mao B enthalten.

Wie in Abbildung 4 zu sehen, besteht ein linearer Zusammenhang von gemessener H₂O₂-Konzentration und Zeitdauer der enzymatischen Reaktion. Damit kann gezeigt werden, dass das hier vorgestellte System in der Lage ist, die Mao M mittels Antikörper-modifizierten Cellulose-Beads zu binden und deren Aktivität quantitativ zu erfassen.

Für diagnostische Anwendungen ist außerdem erforderlich unterschiedliche Aktivitäten des Enzyms mit dem Sensorsystem bestimmen zu können. Um diese zu untersuchen, wurden unterschiedliche Mengen an Cellulose Beads gebundener Mao B mit Benzylamin inkubiert und das entstehende H₂O₂ amperometrisch detektiert. Dabei zeigt sich, dass für alle Enzymmengen die H₂O₂-Konzentration linear mit der Zeit steigt. Außerdem korreliert die H₂O₂-Produktionsgeschwindigkeit mit der eingesetzten Enzymmenge. Ohne Benzylamin ist nahezu kein amperometrisches Signal zu beobachten und somit keine Enzymaktivität festzustellen. Mit der hier entwickelten Methode lassen sich Enzymaktivitäten von $1 \cdot 10^{-5}$ bis $1,4 \cdot 10^{-4}$ U nachweisen.

Die Ergebnisse aus der amperometrischen Aktivitätsbestimmung wurden schließlich mit denen des oben beschriebenen fluoreszenz-basierten kommerziellen Tests verglichen, bei dem das gebildete H₂O₂ mit Hilfe von Peroxidase einen Fluoreszenzfarbstoff oxidiert. Beim Einsatz von 4,8 % (v/v) Cellulose-Beads mit gebundener Mao B werden mit dem optischen Test $7,2 \cdot 10^{-5}$ und mit dem elektrochemischen Verfahren $8,6 \cdot 10^{-5}$ Enzymaktivität detektiert. Damit sind die Ergebnisse beider Methoden gut vergleichbar.

Diskussion

Ziel dieser Entwicklung war die elektrochemische Aktivitätsbestimmung der Mao B, einem der Enzyme, die eine Schlüsselrolle bei der Behandlung von Morbus Parkinson haben. Dabei ist die Mao B aus einer Lösung durch anti-Mao B-IgG an Cellulose-Beads selektiv gebunden worden. Dieser Bindungsschritt ist zusätzlich vorteilhaft für die Detektion, da alle anderen Bestandteile einer realen Probe (z.B. Blut) gewaschen werden können und somit die Enzymmessung unter genau definierten Bedingungen abläuft.

Mit dem gewählten Enzymsubstrat Benzylamin entsteht durch die enzymatische Umsetzung Benzaldehyd, NH_3 und H_2O_2 . Letzteres wird durch die Verwendung von Preußisch Blau modifizierten Dickschichtelektroden detektiert und somit die Mao B-Aktivität bestimmt. Ein Einfluss der Reaktionsprodukte Benzaldehyd und NH_3 auf das Messsignal kann bei den akkumulierten μ -molaren Konzentrationen ausgeschlossen werden. Eine Verfälschung der Messung durch 1 mM Benzylamin kann durch die Zugabe einer entsprechenden Menge zu den Kalibrierungslösungen vermieden werden.

Schließlich ist das entwickelte Verfahren zur Aktivitätsbestimmung eingesetzt worden. Zeitabhängige Messungen zeigen den linearen Anstieg der H_2O_2 -Konzentration über einen Zeitraum von 30 min sowie eine klare Diskriminierung unterschiedlicher Enzymaktivitäten. Die Sensitivität des elektrochemischen Systems erlaubt dabei bereits nach 10 min eine Quantifizierung. Der Bereich der nachweisbaren Enzymaktivität liegt bei $1 \cdot 10^{-5}$ bis $1,4 \cdot 10^{-4}$ U. Bei einer Enzymaktivität von 0,01 U bis 0,015 U je 10^{10} Thrombozyten [12] und einer Thrombozytenzahl von 15 bis $45 \cdot 10^{10}$ je Liter Blut [13], erreicht die hier entwickelte Methode die erforderliche Sensitivität für die Bestimmung der Mao B-Aktivität in Blutproben.

Es lässt sich also sagen, dass das entwickelte Verfahren zur Bestimmung der Enzymaktivität mittels amperometrischer Messung des enzymatisch gebildeten an Wasserstoffperoxid-sensitiven Dickschichtelektroden funktioniert und somit als Grundlage zur Evaluierung der Wirksamkeit der Medikation bei der Parkinson-Erkrankung dienen kann. Dies eröffnet Perspektiven für eine individualisierte Behandlung von Patienten.

Literatur

- (1) PRINGSHEIM, T.; JETTE, N.; FROLKIS, A.; STEEVES, T. D. L. The Prevalence of Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Mov. Disord.* (2014), 29 (13), 1583–1590
- (2) POEWE, W.; SEPPI, K.; TANNER, C. M.; HALLIDAY, G. M.; BRUNDIN, P.; VOLKMANN, J.; SCHRAG, A.-E.; LANG, A. E. Parkinson Disease. *Nat. Rev. Dis. Primers* (2017), 3, 17013
- (3) DICKSON, D. W.; BRAAK, H.; DUDA, J. E.; DUJCKAERTS, C.; GASSER, T.; HALLIDAY, G. M.;

- HARDY, J.; LEVERENZ, J. B.; DEL TREDICI, K.; WSZOLEK, Z. K.; LITVAN, I. Neuropathological Assessment of Parkinson's Disease: Refining the Diagnostic Criteria. *Lancet Neurol.* (2009), 8 (12), 1150–1157
- (4) OERTEL, W.; SCHULZ, J. B. Current and Experimental Treatments of Parkinson Disease: A Guide for Neuroscientists. *J. Neurochem.* (2016), 139, 325–337
- (5) BINDA, C.; HUBALEK, F.; LI, M.; EDMONDSON, D. E.; MATTEVI, A. Crystal Structure of Human Monoamine Oxidase B, a Drug Target Enzyme Monotopically Inserted into the Mitochondrial Outer Membrane. *FEBS Lett.* (2004), 564 (3), 225–228
- (6) ADOLFSSON, R.; GOTTFRIES, C.-G.; ORELAND, L.; WIBERG, Å.; WINBLAD, B. Increased Activity of Brain and Platelet Monoamine Oxidase in Dementia of Alzheimer Type. *Life Sciences* (1980), 27 (12), 1029–1034
- (7) REYESPARADA, M.; SCORZA, M.; SILVEIRA, R.; DAJAS, F.; CASSELS, B. 4-Dimethylamino-phenethylamine, a Sensitive, Specific, Electrochemically Detectable Monoamine Oxidase-B Substrate. *Life Sci.* (1994), 54 (25), 1955–1963.
- (8) GOEBEL, G.; TALKE, A.; AHNERT, U.; LISDAT, F. Electrochemical Activity Determination of Catechol-O-Methyl Transferase by Selective Dopamine Detection. *ChemElectroChem* (2019), 6 (17), 4533–4540
- (10) KARYAKIN, A. A. Prussian Blue and Its Analogues: Electrochemistry and Analytical Applications. *Electroanalysis* (2001), 13 (10), 813–819
- (11) CHEN, W.; CAI, S.; REN, Q.-Q.; WEN, W.; ZHAO, Y.-D. Recent Advances in Electrochemical Sensing for Hydrogen Peroxide: A Review. *Analyst* (2012), 137 (1), 49–58
- (12) ALM, P. O.; KLINTEBERG, B.; HUMBLE, K.; LEPPERT, J.; SORENSEN, S.; THORELL, L. H.; LIDBERG, L.; ORELAND, L. Psychopathy, Platelet MAO Activity and Criminality among Former Juvenile Delinquents. *Acta Psychiatr. Scand.* (1996), 94 (2), 105–111
- (13) GILES, C. The Platelet Count and Mean Platelet Volume. *Br. J. Haematol.* (1981), 48 (1), 31–37

Danksagung

Unser Dank gilt dem Bundesministerium für Wirtschaft und Energie, welches dieses Forschungs- und Entwicklungsprojekt (16KN041836) im Rahmen des zentralen Innovationsprogramm Mittelstand gefördert hat.