

IN VITRO HEMMUNG DER HISTIDINDECARBOXYLASEN DURCH ANTITHYREOIDALE SUBSTANZEN

W. LORENZ, K. PFLEGER und E. WERLE

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen,
Klinik der Universität München

(Received 26 October 1967; accepted 9 November 1967)

Abstract—The specific histidine decarboxylase of the thyroid gland of pigs and of the stomach of rats and the nonspecific histidine decarboxylase of the kidney of guinea pigs are inhibited by inhibitors of intrathyroid hormone synthesis *in vitro*. *m*-Fluorotyrosine, an inhibitor of iodide ion trapping, and 5-fluorouracil, a cytostatic drug, are ineffective. 2-mercaptopbenzimidazole-1,3-dimethylol is a relatively strong inhibitor of the specific and unspecific histidine decarboxylase, 2-carbethoxythio-1-methylimidazole is effective too, but 6-propyl-2-thiouracile and 6-methyl-2-thiouracile are only weak inhibitors. The K_m of the unspecific histidine decarboxylase and histidine is 1.7×10^{-3} M, if the velocity of reaction is calculated as initial velocity and not after an incubation time of 3 hr, when values between 10^{-2} and 10^{-1} M have been reported. Newer results do not agree with the suggestion, that the nonspecific histidine decarboxylase does not play a role in the decarboxylation of histidine *in vivo*.

2-Mercaptobenzimidazole-1,3-dimethylol inhibits the nonspecific histidine decarboxylase competitively with respect to histidine and pyridoxal phosphate. The K_i -values for histidine and pyridoxal phosphate are 1.7×10^{-4} and 2.7×10^{-4} M, the K_m for pyridoxal phosphate being 6×10^{-5} M. From this 2-mercaptopbenzimidazole-1,3-dimethylol shows a 10-fold higher affinity to the active center of the nonspecific histidine decarboxylase than histidine.

During the incubation and complete inhibition of histidine decarboxylase the histamine content in the incubation mixture is diminished though aminoguanidine and chlorpromazine have been added. In the presence of antithyroid drugs, such as 2-carbethoxythio-1-methylimidazole, in concentrations greater than 1×10^{-3} M, the fluorescence of the condensation product of histamine and *o*-phthaldialdehyde is diminished. Histamine therefore has been estimated on the isolated guinea pig's ileum, because the substances can be separated from histamine by the extraction procedure only to 50 per cent. The diminishing effect is not caused by quenching, but by reaction of phthaldialdehyde with the inhibitors and partial absorption of the exciting light. This effect can be used for estimation of the antithyroid drugs. An influence of histamine on the intrathyroid synthesis of thyroid hormones is suggested. The importance of the unspecific histidine decarboxylase for the metabolism of histamine in mammals is discussed.

SCHILDDRÜSEN des Menschen und aller untersuchten Säugetiere enthalten Histamin, Histidindecarboxylasen^{15-17, 35} sowie Enzyme, die Histamin umsetzen, wie Histaminmethyltransferase³ und Diaminoxidase.¹⁸ Auch Dopadecarboxylase³⁵ und Monoaminoxidase²² wurden nachgewiesen. Über die Bedeutung von Histamin und anderen biogenen Aminen in der Schilddrüse, über Wechselwirkungen von biogenen Aminen und Schilddrüsenhormonen und über die Beeinflussung des Stoffwechsels von biogenen

Aminen in der Schilddrüse und in anderen Organen durch Hemmstoffe der Schilddrüsenhormonsynthese ist wenig bekannt.³⁵ In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung von antithyreoidalen Substanzen auf die Histidin-decarboxylasen aus Schweineschilddrüse, Rattenmagen und Meerschweinchenniere untersucht, die neben anderen Organen die höchste Aktivität der spezifischen und unspezifischen Histidin-decarboxylase aufweisen.

METHODIK

Material. Histidin-decarboxylasen (EC 4.1.1.22) aus Rohextrakten von Schweineschilddrüsen, Rattenmagen und Meerschweinchennieren gewonnen (Organe mit dem Ultraturrax 1:2 in dest. Wasser homogenisiert, da die Enzyme in verschiedenen Puffern relativ instabil sind; 1–2 min bei 1800 g zentrifugiert, der Überstand diente als Enzymlösung). 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol, 6-Methyl-2-thiouracil, 6-Propyl-2-thiouracil von der Fa. Herbrand, Gengenbach, 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol von der Fa. Byk-Gulden, Konstanz, Chlorpromazin und *m*-Fluortyrosin von den Farbenfabriken Bayer, 5-Fluoruracil von Hoffmann-La Roche, Grenzach.

Ansätze zur Bestimmung der Histidin-decarboxylasen. Die Inkubation erfolgte in der Warburgapparatur bei 37°, unter N₂-Atmosphäre. Für die spezifische Histidin-decarboxylase des Rattenmagens wurde die folgende Testzusammenstellung verwendet: Im *Hauptgefäß* 0,8 ml Rohextrakt (0,27 g Gewebe), 1,5 ml Puffer (0,4 M Na₂HPO₄/KH₂PO₄ pH 7,0), 0,1 ml Aminoguanidin ($1,3 \times 10^{-4}$ M Endkonzentration), 0,1 ml Decarboxylase-Hemmstoff. Im *Seitengefäß* befand sich 0,5 ml 1-Histidin (1×10^{-2} M Endkonzentration). Bei der spezifischen Histidin-decarboxylase der Schweineschilddrüse wurde der Test in folgender Weise abgewandelt:¹⁵ Aminoguanidin $6,25 \times 10^{-4}$ M, Zusatz von 0,1 ml Chlorpromazin 1×10^{-3} M und 0,1 ml Glutathion 1×10^{-2} M (stets Endkonzentration angegeben). Bei der unspezifischen Histidin-decarboxylase der Meerschweinchenniere wurde der Testansatz wie folgt geändert:¹⁷ Phosphatpuffer pH 8,0, Zusatz von 20 mg Benzol (1 Tropfen), 0,1 ml Chlorpromazin 5×10^{-4} M Endkonzentration. Das Endvolumen war in allen Ansätzen 3,0 ml, das Volumen der Histidinlösung wurde entsprechend vermindert. Alle Zusätze waren in dest. Wasser gelöst, um in allen Ansätzen eine möglichst gleiche jonenkonzentration zu gewährleisten, mit Ausnahme der antithyreoidalen Stoffe, die wegen schlechter Löslichkeit in 0,01 N NaOH aufgenommen wurden.³⁵ Die Verwendung von drei verschiedenen Testsystemen ist notwendig, um die Aktivität der Histidin-decarboxylasen in verschiedenen Organextrakten optimal bestimmen zu können.^{15, 17}

Nach 5, 10, 15, 30 und 45 min wurde in jeweils einem Ansatz die Reaktion mit 0,5 ml 3 N Perchlorsäure gestoppt. Der Histamingehalt wurde spektrofluorometrisch nach Shore *et al.*²³ in der Modifikation nach Burkhalter⁷ sowie im biologischen Test am isolierten Meerschweinchenileum⁴ bestimmt. Durch 1–5 µg Antistin pro 12 ml Badflüssigkeit war die dem Histamin zugeschriebene Kontraktion des Darms in allen Fällen vollständig hemmbar.

Proteinbestimmung. Mit der Biuretmethode nach Weichselbaum.³³

Definitionen. Als Nullwert wird der Histaminwert in Ansätzen mit säureinaktiviertem Enzym und Substratzusatz, als Leerwert der Histaminwert in Ansätzen mit intaktem Enzym ohne Substratzusatz (also nur mit endogenem Substrat), als Hauptwert der Histaminwert in Ansätzen mit intaktem Enzym und Substratzusatz bezeichnet. Die Enzymaktivität wird in pMol Histaminzuwachs/mg Protein und min ange-

geben. Der Histaminzuwachs wird aus der Differenz von Haupt- und Nullwert bzw. aus der Differenz von Hauptwert mit und ohne Decarboxylasehemmstoff¹⁷ bestimmt und aus den Histaminwerten errechnet, die nach einer Inkubationsdauer von 15 min gemessen werden (linearer Bereich der Zeit-Umsatzkurven, Abb. 1). Der Anschluss

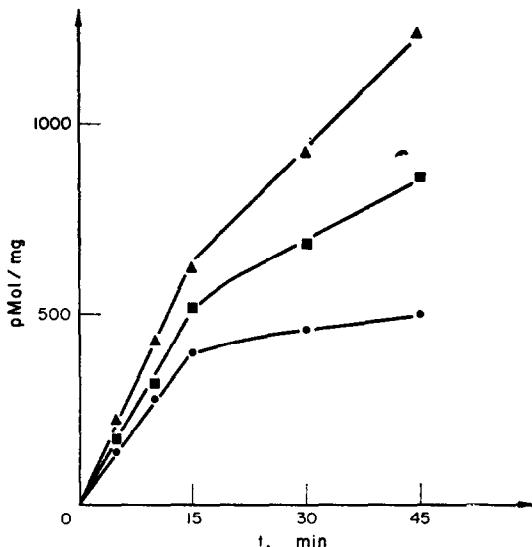


ABB. 1. Zeit-Umsatzkurven der Histidindecarboxylierung in Ansätzen mit Rattenmagen-, Meerschweinchenniere- und Schweineschilddrüsensextrakt. Enzymaktivität in pMol Histaminzuwachs/mg Protein und Zeiteinheit. ●—●—● Extrakt aus Schweineschilddrüse, ■—■—■ Extrakt aus Meerschweinchenniere, ▲—▲—▲ Extrakt aus Rattenmagen.

an die frühere Definition der Enzymaktivität: μg Histaminbildung/g und 180 min wird anhand der folgenden Beziehung gewonnen:

$$\text{pMol Histamin/mg Protein und min} = \frac{\mu\text{g Histamin/g}}{\text{mg Protein/g}} \times \frac{5450}{180}$$

Bei einem Molekulargewicht von Histamindihydrochlorid von 185 entspricht 1 μg Histamindihydrochlorid 5450 pMol.

ERGEBNISSE

(1) Hemmung der spezifischen und unspezifischen Histidindecarboxylase durch antithyreoidale Substanzen

Die Zeit-Umsatzkurven der Histidindecarboxylierung in Ansätzen mit Schweineschilddrüs-, Rattenmagen- und Meerschweinchennierenextrakten verliefen nur 15–30 min linear (Abb. 1). Die Hemmung der Histidindecarboxylasen durch antithyreoidale Substanzen wurde deshalb nur in diesem Zeitraum bestimmt, also nicht wie bisher nach einer Reaktionszeit von 3 Std. (Tabelle 1). Die Inhibitoren der intrathyreoidalen Hormonsynthese hemmen die Histidindecarboxylasen aller drei Organextrakte, nicht aber *m*-Fluortyrosin, ein Jodretentionshemmer, und 5-Fluoruracil, ein Cytostaticum. 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol und 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol hemmen die spezifische Histidindecarboxylase stärker als α -Methylhistidin,²⁸ 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol die unspezifische Histidinde-

carboxylase aus Meerschweinchenniere fast so stark wie α -Methyldopa.²⁸ Die Hemmstärke der Hydrazinanalogen beider α -methylierten Aminosäuren^{1,13} wird aber von den geprüften Thyrostatica nicht erreicht. Die Hemmstärke von 6-Propyl-2-thiouracil und 6-Methyl-2-thiouracil ist sehr gering. Die Hemmstärke der antithyreoidalen Substanzen nimmt von 6-Methyl-2-thiouracil, das nur die unspezifische Histidindecarboxylase signifikant hemmt, über 6-Propyl-2-thiouracil, 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol bis 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol in derselben Reihenfolge zu wie

TABELLE 1. HEMMUNG DER HISTIDINDECARBOXYLASEN DURCH
ANTITHYREOIDALE SUBSTANZEN

Hemmstoff	Konzentration (M)	% Hemmung der Histidindecarboxylierung in Extrakten		
		Schweineschilddrüse	aus Rattenmagen	Meerschweinchenniere
2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol	5×10^{-3}	100	100	100
	1×10^{-3}	100	100	70
	5×10^{-4}	70	58	25
2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol	5×10^{-2}	100	100	100
	5×10^{-3}	61	30	36
	1×10^{-3}	30	13	22
6-Propyl-2-thiouracil	5×10^{-2}	30	10	29
6-Methyl-2-thiouracil	5×10^{-2}	10	10	38
<i>m</i> -Fluor-tyrosin	5×10^{-2}	0	0	0
5-Fluor-uracil	5×10^{-2}	0	0	0

Mittelwerte aus 2 Dreifachbestimmungen.

ihre antithyreoidale Wirkung.⁹ 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol wirkt als Thyrostaticum 30fach stärker als 6-Methyl-2-thiouracil und 6-Propyl-2-thiouracil,²¹ die Histidindecarboxylasen hemmt es etwa 20–40fach stärker als die genannten Thiouracile. Die Hemmung der Histidindecarboxylasen durch 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol nimmt bei Vorinkubation bis zu 30 min zu. Wie seine verzögert eintretende antithyreoidale Wirkung kann das durch die zeitbenötigende Abspaltung der Carbäthoxygruppe erklärt werden.²⁵ Die spezifische Histidindecarboxylase der Schweineschilddrüse wird durch die antithyreoidalen Substanzen stärker gehemmt als die spezifische Histidindecarboxylase des Rattenmagens und die unspezifische Histidindecarboxylase der Meerschweinchenniere.

Alle diese Befunde ergeben einen Hinweis für die Beziehung zwischen Schilddrüsenstoffwechsel und Histamin sowie anderen biogenen Aminen, der weiterer Untersuchungen bedarf.

(2) *Untersuchungen zum Mechanismus der Hemmung der unspezifischen Histidindecarboxylase aus Meerschweinchenniere durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol*

Bestimmt man die K_m der unspezifischen Histidindecarboxylase mit Histidin aus den Anfangsgeschwindigkeiten der Decarboxylierung, so erhält man mit der Ableitung

nach Lineweaver-Burk¹⁴ einen Wert von $1,7 \times 10^{-3}$ M. Diesen Wert erhielten wir aus drei Versuchsreihen, die jeweils eine K_m von $2,8 \times 10^{-3}$, $1,0 \times 10^{-3}$ (Abb. 2) und $1,5 \times 10^{-3}$ M ergaben. Die von uns ermittelte Michaeliskonstante ist um eine Zehnerpotenz niedriger, als sie von anderen Autoren ermittelt wurde.^{32,34} Den Bestimmungen dieser Autoren wurde aber die Histaminbildung nach einer Reaktionszeit

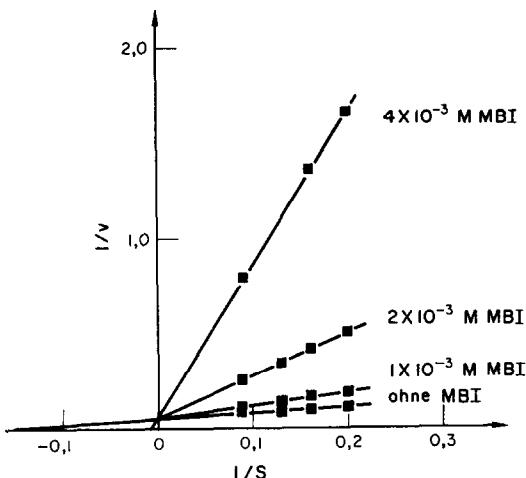


ABB. 2. Substrat-kompetitive Hemmung der unspezifischen Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

Enzympräparat 60 mg Protein, Pyridoxalphosphatkonzentration 5×10^{-5} M. v in nmol/min, $[S]$ in 10^{-3} M. Sonstige Bedingungen s. Methodik.

MBI = 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

von 3 Std. zugrunde gelegt, bei welcher unter den gegebenen Bedingungen der Reaktionsverlauf nicht mehr überschaubar ist.^{1, 15, 36} Auch wurde von Radwan und West²⁴ kürzlich im Pylorus der Ratte eine unspezifische Histidin-decarboxylase beschrieben, die ebenfalls eine K_m von $1,9 \times 10^{-3}$ M aufwies. Der unspezifischen Histidin-decarboxylase wurde bisher *in vivo* keine Bedeutung zugemessen, weil für ihre K_m ein so hoher Wert wie 10^{-1} – 10^{-2} M errechnet wurde. Dieses Argument sollte überprüft werden.

Zur Ermittlung des Hemmtyps von 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol gegenüber der unspezifischen Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere wurde ferner die endogene Menge Histidin nach einer Modifikation²⁰ der Methode von Pisano *et al.*²³ und die endogene Menge Pyridoxalphosphat nach der Methode von Bonavita⁶ bestimmt. Es wurden $80 \mu\text{g}$ Histidin/g und $140 \mu\text{g}$ Pyridoxalphosphat/g nachgewiesen. Die K_m für Pyridoxalphosphat betrug 6×10^{-5} M.

In der Ableitung nach Lineweaver und Burk¹⁴ erwies sich der Hemmtyp von 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol bei der unspezifischen Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere als kompetitiv gegenüber Histidin und Pyridoxalphosphat (Abb. 2 u. 3). Die Hemmkonstanten wurden nach der Gleichung berechnet (12).

$$v_t = \frac{V_{\max} \times [S]}{K_m(1 + ([I]/K_i)) + [S]}$$

Danach hat 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol mit einem K_t -Wert von $1,7 \times 10^{-4}$ M eine 10fach höhere Affinität zum aktiven Zentrum des Enzyms als Histidin, mit einem K_t -Wert von $2,7 \times 10^{-4}$ M eine etwa 5fach geringere als Pyridoxalphosphat.

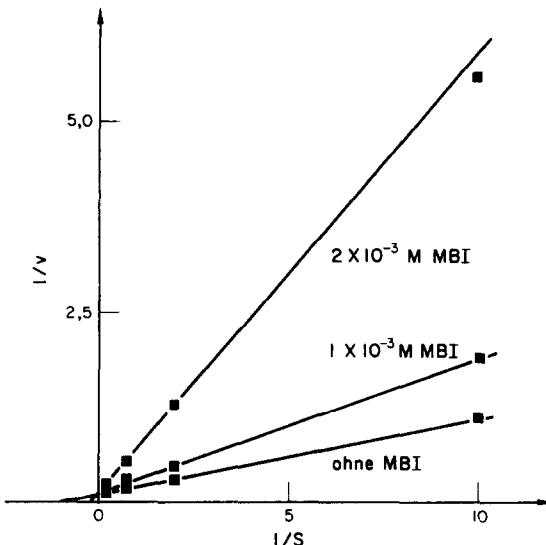


ABB. 3. Coenzym-kompetitive Hemmung der unspezifischen Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.
Enzympräparat 60 mg Protein, 1-Histidinkonzentration 10^{-2} M, v in nmol/min, $[S]$ in 10^{-5} M.
Sonstige Bedingungen s. Methodik.
MBI = 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

(3) Abnahme des Histamingehaltes in Gegenwart hoher Konzentrationen antithyreoidaler Substanzen

Bei vollständiger Hemmung der Histidin-decarboxylasen durch antithyreoidale Substanzen kam es trotz Zusatz von Aminoguanidin bzw. Aminoguanidin und Chlorpromazin, welche Diaminoxydase und Histaminmethyltransferase hemmen, in Leerwert und Hauptwert zu einer erheblichen Abnahme des Histamingehaltes während der Inkubation (Tab. 2). Für diesen Umsatz kommen Diphosphopyridinnucleotidase im Rattenmagen^{6, 19} und Histamintransaminase in der Meerschweinchenniere¹¹ in Frage. Zusatz von 10^{-2} M Nicotinamid verhinderte in der Tat im Rattenmagen die Abnahme des Histamingehaltes.

(4) Probleme der fluorometrischen Bestimmung von Histamin in Gegenwart der antithyreoidalen Substanzen

Die Fluoreszenz des Kondensationsprodukts aus Histamin und Phthaldialdehyd ist in Gegenwart der antithyreoidalen Substanzen stark abgeschwächt (Abb. 4). Dies wäre ohne Bedeutung, wenn die antithyreoidalen Substanzen bei der Extraktion des Histamins von diesem abgetrennt würden. Das ist aber beim 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol nur zu 50%, beim 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol zu 60% der Fall (Tab. 3).

TABELLE 2. ABNAHME DES HISTAMINGEHALTES WÄHREND DER INKUBATION MIT HOHEN KONZENTRATIONEN ANTITHYREOIDALER SUBSTANZEN TROTZ HEMMUNG DER DIAMIN-OXYDASE UND HISTAMINMETHYLTRANSFERASE

Organ	Hemmstoff (M)	Nullwert μg/g	Abnahme des Histamingehaltes in 1 % des Ausgangswertes (Nullwert) nach	
			15 min	45 min
Meerschwein-chenniere	2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol 5×10^{-3}	6,0		
	2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol 5×10^{-2}		34	40
Rattenmagen	2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol 5×10^{-3}	50,0		
	2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol 5×10^{-2}		28	32

Mittelwerte aus zwei Doppelbestimmungen.

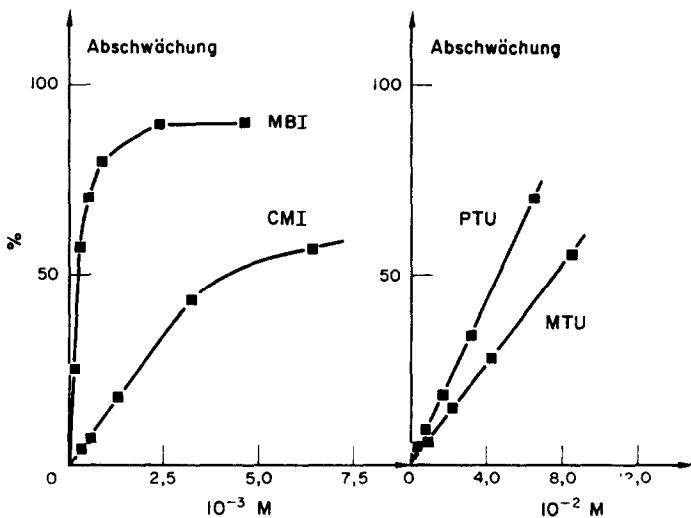


ABB. 4. Abschwächung der Fluoreszenz des Histamin-Phthaldialdehyd-kondensats durch antithyreoidale Substanzen.

Ordinate: Abschwächung der Fluoreszenz in %. 0,4 μg Histamindihydrochlorid/ml 0,1 N HCl ohne Zusatz von Thyreostatica = 100% Fluoreszenz und 0% Abschwächung. Die antithyreoidalen Substanzen wurden vor der Kondensation von Histamin mit o-Phthaldialdehyd zugesetzt.

MBI = 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol.

CMI = 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol.

PTU = 6-Propyl-2-thiouracil.

MTU = 6-Methyl-2-thiouracil.

1×10^{-3} M 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol im Ansatz stört die fluorometrische Bestimmung von Histamin nur mehr zu weniger als 10%. Bei höheren Konzentrationen musste Histamin am isolierten Meerschweinchenileum bestimmt werden. Dessen Ansprechbarkeit wurde durch 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol, 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol, 6-Propyl-2-thiouracil und 6-Methyl-2-thiouracil nicht

TABELLE 3. ABTRENNUNG DER ANTITHYREOIDALEN STOFFE VON
HISTAMIN BEIM EXTRAKTIONSVERFAHREN NACH SHORE *et al.*²⁹

Hemmstoff	Vorgelegte Hemmstoffkonzentration im Ansatz (M)	Nach der Extraktion gemessene Hemmstoffkonzentration (M)	Abtrennung in %
2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol	1×10^{-3} 5×10^{-3}	$0,49 \times 10^{-3}$ $2,5 \times 10^{-3}$	51 50
2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol	1×10^{-3} 2×10^{-3}	$0,43 \times 10^{-3}$ $0,8 \times 10^{-3}$	57 60

Messung der antithyreoidalen Substanzen anhand der Fluoreszenzabschwächung des Histamin-Phthaldialdehydkondensats.

beeinflusst. Auch wurden die antithyreoidalen Substanzen während der Inkubation nicht zu einer als Antihistaminikum wirksamen Substanz umgesetzt.

Als Ursache für die Abschwächung der Fluoreszenz des Histamin-Phthaldialdehydkondensates wurden zwei Faktoren ermittelt.

(1) *Die antithyreoidalen Substanzen verhindern durch Reaktion mit Phthaldialdehyd die Bildung des Histaminkondensationsproduktes*

Entsteht das Kondensationsprodukt aus Histamin und Phthaldialdehyd vor dem Zusetzen der antithyreoidalen Substanzen, so wird die Fluoreszenz nur wenig abgeschwächt (Tab. 4). 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol, 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol, 6-Propyl-2-thiouracil und 6-Methyl-2-thiouracil selbst ergaben mit Phthaldialdehyd bei keiner Wellenlänge eine fluoreszierende Verbindung.

TABELLE 4. ABSCHWÄCHUNG DER FLUORESENZ DURCH ZUSATZ VON ANTITHYREOIDALEN SUBSTANZEN VOR UND NACH BILDUNG DES HISTAMIN-PHTHALDIALDEHYDKONDENSATS

Zusatz der Hemmstoffe	Fluoreszenz des Histamin-Phthaldialdehyd-kondensats in Gegenwart von		
	2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol $2,4 \times 10^{-3}$ M	2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol $1,6 \times 10^{-2}$ M	6-Propyl-2-thiouracil $3,2 \times 10^{-2}$ M
vor der Bildung des Kondensats	4	14	21
nach der Bildung des Kondensats	82	72	64

Fluoreszenz des Histamin-Phthaldialdehydkondensats ohne Hemmstoffzusatz 100%. Die Fluoreszenz in Gegenwart der Hemmstoffe, in %, wird auf diesen Wert bezogen. Bedingungen s. Abb. 4.

(2) Die Anregungsstrahlung bei 360 nm für Histamin wird durch antithyreoidale Substanzen teilweise absorbiert

Die Absorptionsspektren von 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol und 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol ergaben eine mäßige Absorption im Bereich der Anregungswellenlänge für das Histamin-Phthalodialdehydkondensat. Die Abschwächung der Fluoreszenz des Histamin-Phthalodialdehydkondensats ist deshalb zum überwiegenden Teil kein echter Auslöscherfekt (quenching).³¹ Sie kann zur Bestimmung der antithyreoidalen Substanzen im Gewebe verwendet werden (Eichkurven s. Abb. 4).

Das Gewebshomogenat wird enteiweißt, nach Shore *et al.*²⁹ mit *n*-Butanol extrahiert und in 0,1 N HCl überführt. 1 ml dieses Extraks wird zu 1 ml einer bekannten Histaminklösung zugesetzt und die Fluoreszenz in der üblichen Weise gemessen. Die Abschwächung der Fluoreszenz wird anhand einer Vergleichslösung von 1 ml Histamin und 1 ml HCl-Extrakt des Ansatzes ohne Hemmstoff (100%-Wert) ermittelt. Ausbeutewerte erhält man durch Zusatz einer bekannten Hemmstoffmenge zum Perchlorsäureextrakt.

DISKUSSION

(1) Antithyreoidale Substanzen und Histaminstoffwechsel

Da antithyreoidale Substanzen *in vitro* und *in vivo*¹⁶ die Histaminbildung hemmen, und Antihistaminica wie Antistin thyreostatisch wirken,¹⁰ spielt Histamin möglicherweise im Stoffwechsel der Schilddrüsenhormone eine Rolle. Jodkali hemmt nur die unspezifische Histidin-decarboxylase in geringem Ausmaß,⁸ Hesperidinmethylchalkon, das die J¹³¹-Aufnahme steigert,¹⁰ und *m*-Fluortyrosin, ein Jodretentionshemmer, sind gegenüber beiden Decarboxylasen wirkungslos (^{8, 16}, s. oben). Somit scheinen nur die Hemmstoffe der intrathyreoidalen Hormonsynthese die Histaminbildung zu beeinflussen. Nach Untersuchungen von Oberdisse²¹ bzw. Stanley und Astwood³⁰ wirkt 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol etwa 30-bzw. 50 mal stärker thyreostatisch als 6-Propyl-2-thiouracil und 6-Methyl-2-thiouracil, was mit seiner relativen Hemmstärke gegenüber 6-Propyl-2-thiouracil und 6-Methyl-2-thiouracil als Hemmstoffen der Histidin-decarboxylasen übereinstimmt.

In vivo hemmte 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol beim Meerschweinchen in allen untersuchten Organen des oberen Verdauungstraktes und in Leber und Niere beide Decarboxylasen stark.¹⁶ Diese Hemmung wurde durch Zusatz von hohen Dosen Pyridoxalphosphat zum Ansatz nur teilweise aufgehoben. Durch Zusatz von Organextrakten der mit 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol vorbehandelten Tiere ZH Organextrakten der unbehandelten Tiere konnte dabei sichergestellt werden, daß die Hemmung *in vivo* nicht durch Kontakt des Hemmstoffs mit den Histidin-decarboxylasen erst *nach* dem Homogenisieren zustande kommt, in Wirklichkeit also einen *in vitro* Effekt darstellen würde.

(2) Zur Frage der physiologischen Bedeutung der unspezifischen Histidin-decarboxylase

Die Ermittlung der K_m der unspezifischen Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere mit Histidin ergab bei drei Versuchsserien in jedem Fall einen Wert, der etwa eine Zehnerpotenz niedriger ist, als er von anderen Autoren angegeben wurde^{32, 34} (Zusammenfassung s. 28). Die Ursache hierfür liegt in der Bestimmung

der Reaktionsgeschwindigkeit nach einer Reaktionszeit von drei Stunden, bei der die Reaktion vor allem bei höheren Substratkonzentrationen nicht mehr überschaubar ist.^{15, 36, 37} Es kommt z.B. zur Bildung eines Komplexes zwischen Substrat bzw. Produkt und Pyridoxalphosphat, dessen Bildungsgeschwindigkeit von den Konzentrationen der Reaktionspartner abhängt.³⁷ Auch bei niedrigen Substratkonzentrationen, wie sie bei den Bestimmungsmethoden der Histidin-decarboxylasen mit markierten Substraten verwendet werden, war in Versuchen von Schayer²⁷ der Verlauf der Zeit-Umsatzkurve über drei Stunden nicht linear: Die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit nach drei Stunden Inkubationszeit betrug gegenüber dem 15 Minuten Wert 60%. Wegen der hohen K_m für die unspezifische Histidin-decarboxylase, die sich aus den 3 Stunden-Messungen ergab, wurde diesem Enzym *in vivo* keine Bedeutung beigemessen. Der von uns ermittelte Wert für K_m entspricht einer K_m von noch mittlerer Größenordnung. Schayer und Sestokas²⁸ konnten kürzlich nachweisen, dass die unspezifische Histidin-decarboxylase der Meerschweinchenniere auch *in vivo* beträchtliche Mengen Histamin bildet, was durch α -Methyldopa verhindert werden konnte. Es erscheint daher nicht mehr begründet, das Enzym im Histaminstoffwechsel der Säugetiere ausser Acht zu lassen.

Zusammenfassung—Die spezifische Histidin-decarboxylase aus Schweineschilddrüse und Rattenmagen sowie die unspezifische Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere werden durch Hemmstoffe der intrathyreoidalen Hormonsynthese *in vitro* gehemmt. *m*-Fluortyrosin, ein Jodretentionshemmer, und 5-Fluoruracil, ein Cytostatikum, sind ohne Wirkung.

Die K_m der unspezifischen Histidin-decarboxylase mit Histidin beträgt $1,7 \times 10^{-3}$ M, mit Pyridoxalphosphat 6×10^{-5} M. 2-Mercaptobenzimidazol-1,3-dimethylol hemmt die unspezifische Histidin-decarboxylase aus Meerschweinchenniere kompetitiv gegenüber Histidin und Pyridoxalphosphat. Der K_t -Wert gegenüber Histidin beträgt $1,7 \times 10^{-4}$ M und gegenüber Pyridoxalphosphat $2,7 \times 10^{-4}$ M.

In Gegenwart antithyreoidaler Substanzen, z.B. von 2-Carbäthoxythio-1-methylimidazol in einer Konzentration von mehr als 1×10^{-3} M wird die Fluoreszenz des Histamin-Phthaldialdehydkondensats durch Reaktion des Hemmstoffs mit *o*-Phthalodialdehyd und durch Absorption der Anregungsstrahlung abgeschwächt.

LITERATUR

1. D. AURES und W. G. CLARK, *Analyt. Biochem.* **9**, 35 (1964).
2. J. AWAPARA, R. P. SANMAN und C. STANLEY, *Archs Biochem. Biophys.* **98**, 250 (1962).
3. J. AXELROD, P. P. LEAN, R. W. ALBERS und H. WEISSBACH, in *Regional Neurochemistry* (S. S. KETY und J. ELKES), p. 307. Pergamon Press, Oxford (1961).
4. G. S. BARSOUM und J. H. GADDUM, *J. Physiol., Lond.* **85**, 1 (1935).
5. M. A. BEAVEN, Z. HORAKOWA, H. N. JOHNSON, F. ERYAVEC und B. B. BRODIE, *Fedn Proc.* **26**, 233 (1967).
6. V. BONAVITA, *Archs. Biochem. Biophys.* **88**, 366 (1960).
7. A. BURKHALTER, *Biochem. Pharmac.* **11**, 315 (1962).
8. G. CLASGENS, Dissertation University Düsseldorf (1940).
9. F. HAUSSCHILD, *Pharmakologische und Grundlagen der Toxikologie*, S. 413. VEB Georg Thieme Verlag, Leipzig (1961).
10. G. HILLMANN, *Biosynthese und Stoffwechselwirkungen der Schilddrüsenhormone, Biochemie und Klinik*, S. 35. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1961).
11. R. ITO, T. ITO und K. NAKAZAWA, *Nippon Univ. J. Med.* **2**, 259 (1960).
12. H. KOBLET, *Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1964).
13. R. J. LEVINE, T. L. SATO und A. SJOERDSMA, *Biochem. Pharmac.* **14**, 139 (1965).

14. H. LINEWEAVER und D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.* **56**, 658 (1934).
15. W. LORENZ und E. WERLE, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **348**, 319 (1967).
16. W. LORENZ, K. PFLEGER und E. WERLE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmak. exp. Path.* **257**, 38 (1967).
17. W. LORENZ, K. PFLEGER und E. WERLE, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak.* **258**, 150 (1967).
18. W. LORENZ, H. J. KUSCHE und E. WERLE, *Pharmak. Symp. Freiburg*, February (1967).
19. W. LORENZ und K. PFLEGER, *Klin. Wschr.*, **46**, 57 (1968).
20. W. LORENZ, M. GERANT und E. WERLE, unveröffentlicht.
21. H. OBERDISSE, zitiert nach 46.
22. A. G. FISCHER, A. R. SCHULTZ und L. OLINER, *Life Sci.* **5**, 995 (1966).
23. J. J. PISANO, C. MITOMA und S. UDENFRIEND, *Nature, Lond.* **180**, 1125 (1957).
24. A. G. RADWAN und G. B. WEST, *J. Pharm. Pharmac.* **19**, 305 (1967).
25. C. RIMINGTON, A. LAWSON und C. E. SEARLE, *Lancet* ii, 619 (1951).
26. R. W. SCHAYER und E. SESTOKAS, *Biochim. biophys. Acta (Amst)* **111**, 557 (1965).
27. R. W. SCHAYER, *Am. J. Physiol.* **186**, 199 (1956).
28. H. SCHIEVELBEIN und E. WERLE unter Mitarbeit von W. LORENZ, Histidin-decarboxylase, in *Hoppe-Seylers Handbuch der physiol. Path chem. Analyse*, Bd. VIc, p. 515 (1966).
29. P. A. SHORE, A. BURKHALTER und V. H. COHN, JR., *J. Pharmac. exp. Ther.* **127**, 182 (1959).
30. M. M. STANLEY und E. B. ASTWOOD, *Endocrinology* **41**, 66 (1947).
31. S. UDENFRIEND, in N. O. KAPLAN und H. A. SCHERAGA, *Molecular Biology*, Vol. 3, p. 172. Academic Press, New York (1962).
32. S. UDENFRIEND, *Proc. Symp. Int. Union Biochem.* p. 267 (1963).
33. T. E. WEICHSELBAUM, *Am. J. Clin. Path.* **10**, 40 (1946).
34. H. WEISSBACH, W. LOVENBERG und S. UDENFRIEND, *Biochim. biophys. Acta* **50**, 177 (1960).
35. E. WERLE und W. LORENZ, *Biochem. Pharmac.* **15**, 1059 (1966).
36. E. WERLE und H. HERRMANN, *Biochem. Z.* **291**, 105 (1937).
37. E. WERLE und W. LORENZ, *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* **338**, 251 (1964).