

## UNTERSUCHUNGEN ZUR SUBSTRAT- UND INHIBITOR-SPEZIFITÄT DER FREISETZBAREN MEERSCHWEINCHEN-LEBERHISTAMINASE\*

W. SCHMUTZLER und J. KNOP

Pharmakologisches Institut der Universität Freiburg i.Br, Germany

(Received 30 December 1967; accepted 28 February 1968)

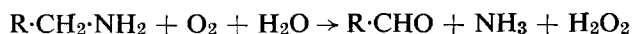
**Abstract**—The substrate- and inhibitor specificity of the histamine metabolizing enzyme released from the guinea pig liver by heparin has been studied.

During the degradation of histamine 1/2 mole oxygen per mole substrate is consumed. The reaction velocity does not depend on the substrate concentration in the range from  $4.5 \times 10^{-6}$  to  $1 \times 10^{-2}$  M. Besides histamine the diamines cadaverine and putrescine, the monoamines  $\beta$ -phenylethylamine and benzylamine, and the polyamine spermidine are oxidized. A significant degradation of 5-hydroxytryptamine, tryptamine, mescaline, and tyramine could not be detected by the Warburg-technique. 4-aminobutyraldehyde (as  $\Delta^1$ -pyrroline) and benzaldehyde were demonstrated to be reaction products of the degradation of putrescine and benzylamine respectively. The pH-optimum of the degradation of cadaverine is 6.0, of histamine 7.0. and of benzylamine 8.0. A complete inhibition of the degradation of histamine, cadaverine, and benzylamine was achieved with aminoguanidine ( $10^{-6}$  M), hydroxylamine ( $10^{-5}$  M), or semicarbazide ( $10^{-4}$  M). An incomplete inhibition was observed with isonicotinic acid hydrazide ( $10^{-2}$  M) and iproniazide ( $10^{-2}$  M). No inhibition at all was observed with 2-phenylcyclopropylamine ( $10^{-3}$  M). It is concluded that the enzyme belongs to the carbonyl-reagent sensitive amine oxidases (Enzyme Commission No. 1.4.3.6).

### EINLEITUNG

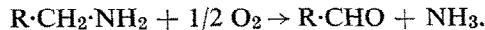
PARENTERALE Zufuhr bestimmter an- und kationischer Polyelektrolyte (z.B. Heparin und Protamin) führt beim Meerschweinchen zur Freisetzung eines histaminzerstörenden Enzyms aus der Leber ins Blut.<sup>1–5</sup> Dabei steht einem dosisabhängigen Anstieg der enzymatischen Aktivität im Blutplasma eine entsprechende Verminderung des Enzymgehaltes im Lebergewebe gegenüber. Diese kann, z.B. nach 500 IE Heparin/kg i.v., bis zur völligen Entspeicherung des Enzyms aus der Leber gehen, wo es normalerweise an Partikel der Mikrosomenfraktion gebunden ist.<sup>3, 6, 7</sup>

Dieses histaminzerstörende Enzym ist durch den Diaminoxydase-Inhibitor Aminoguanidin<sup>8</sup> hemmbar. Es handelt sich deshalb vermutlich um Histaminase.<sup>9–11</sup> Der Beweis dafür, daß es sich tatsächlich um eine Aminoxidase handelt, ist aber bisher noch nicht erbracht worden. Dieser erfordert den Nachweis eines Sauerstoffverbrauches oder des Entstehens typischer Reaktionsprodukte gemäß den Reaktionsgleichungen.<sup>12, 13</sup>



\* Ausgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft

bzw. bei Anwesenheit von Katalase



Wie wir an Hand von Untersuchungen mit der Warburg-Technik zeigen werden, sind diese Bedingungen erfüllt. Die Ergebnisse der Testung verschiedener Substrate und Inhibitoren erlaubt, das Enzym den carbonylreagensempfindlichen Aminoxydasen zuzuordnen.

#### METHODIK

Insgesamt 170 Meerschweinchen beiderlei Geschlechts (Gewicht 300–600 g) dienten als Spender von Lebervenenplasma. Seine Gewinnung erfolgte nach Schmutzler u. Mitarb.<sup>14</sup> In Pentobarbital-Na-Narkose (35 mg/kg i.p.) wurden die Tiere unter künstlicher Beatmung laparo- und thorakotomiert. Nach Abklemmung der V. cava inf. zwischen Nierenvenen und Leber wurden 500 IE Heparin\*/kg in einem Volumen von 1.0 ml/kg in die V. portae injiziert. Gleichzeitig wurde die V. cava inf. zwischen der Leber und dem rechten Vorhof abgeklemmt. 2 Minuten später wurde der Lebervenensinus von der V. cava her punktiert und so viel Blut wie möglich (8–13 ml) entnommen. Das Lebervenenplasma enthält sämtliches, zuvor in der Leber gespeichertes Enzym<sup>6</sup>, im folgenden als enzymreiches Lebervenenplasma bezeichnet. Normalblut wurde ohne vorherige Injektion auf gleiche Weise gewonnen. Ihm wurde die gleiche Heparindosis (500 IE/kg) nach der Entnahme zugesetzt. Verdünnung und Heparin Gehalt waren also bei normalem und enzymreichem Lebervenenplasma etwa gleich.

Zur Plasmagewinnung wurde das Blut von jedem Tier einzeln in paraffinierten Zentrifugengläsern  $2 \times 20$  Minuten mit  $1.300 \times g$  zentrifugiert. Vom normalen bzw. enzymhaltigen Plasma wurden dann Mischplasmen (Pools) hergestellt und in kleinen Portionen (10 ml) bei  $-20^\circ C$  bis zum Versuch aufbewahrt.

#### Enzymbestimmungen

(1) Manometrie: Der während oxydativer Desaminierung von Aminen stattfindende  $O_2$ -Verbrauch wurde in Gegenwart von Katalase in der Warburg-Apparatur gemessen. Standardansatz: Im Hauptraum 0.5 ml Plasma, 1.2 ml 0.067 M Phosphatpuffer pH 7.0, und 0.1 ml Katalaselösung Endkonzentration 100  $\mu g/ml$  (Kristall-suspension "Boehringer" verdünnt mit Phosphatpuffer pH 7.0). Im Anhangsgefäß 0.2 ml. Substratlösung (bei den Leerwerten 0.2 ml Phosphatpuffer). Substratkonzentration nach dem Kippen in der Regel  $10^{-2}$  M. Im Zentralgefäß 0.2 ml 10% KOH. Temperatur  $37^\circ C$ , Schüttelfrequenz 120/min Sauerstoffatmosphäre.

Abweichungen von diesem Standardansatz sind bei den betreffenden Versuchen angegeben.

Substrate: Histamin-dihydrochlorid (Merck, Darmstadt),  
Putrescin = 1,4-Diaminobutan-dihydrochlorid (Fluka, Buchs, Schweiz),  
Cadaverin = 1,5-Diaminopentan-dihydrochlorid (Fluka),  
Spermidin-trihydrochlorid (Fluka),  
Spermin-tetrahydrochlorid (Fluka),

\* Vetren (Heparin-Na 140 IE/mg), Promonta, Hamburg.

$\beta$ -Phenyläthylamin-hydrochlorid (Schuchardt, München),  
Benzylamin-hydrochlorid (Schuchardt),  
Tyramin-hydrochlorid (Merck),  
Tryptamin-hydrochlorid (Merck),  
5-Hydroxytryptamin-creatininsulfat, Mescalinsulfat (Merck).

(2) Diaminoxidase-Bestimmung im optischen Test nach Holmstedt u. Tham<sup>15</sup>: Nachweis von  $\Delta^1$ -Pyrrolin, das durch Kondensation des Produktes der oxydativen Desaminierung von Putrescin, 4-Aminobutyraldehyd, entsteht. Ansatz: 1.0 ml Plasma mit 2.0 ml 0.067 M Phosphatpuffer pH 7.0 und 6.0 ml *o*-Aminobenzaldehyd-Lösung versetzt (*o*-Aminobenzaldehyd (Fluka) 0.005 M und nach Abfiltrieren des ungelösten Restes mit Phosphatpuffer verdünnt bis zur Extinktion 1,500, gemessen bei 400 m $\mu$  und 1 cm Lichtweg, vgl. Werle u. Schirren<sup>16</sup>). Nach Temperierung Zusatz von 1.0 ml 0.1 M Putrescin in Phosphatpuffer pH 7.0. Inkubation 3 Stunden im Schüttelthermostaten bei 37°C. Abstoppen der Reaktion durch Zusatz von 2.0 ml 50%iger Trichloressigsäure. Nach Abzentrifugieren des gefällten Proteins wird bei 436 m $\mu$  und 1 cm Lichtweg im Eppendorf-Photometer gegen Leerwerte, denen das Substrat erst nach Beendigung der Inkubation zugesetzt wurde, colorimetriert. Angegeben wird die Extinktionszunahme im Trichloressigsäureextrakt innerhalb 3 Stunden pro ml Plasma.

(3) Benzylamin-Oxydase-Bestimmung im optischen Test nach McEwen und Cohen<sup>17</sup>: Benzylamin wird oxydativ zu Benzaldehyd desaminiert. Dieser kann spektrophotometrisch im UV bestimmt werden.<sup>18</sup> Ansatz: 1.0 ml Plasma wird mit 1.25 ml 0.067 M Phosphatpuffer pH 7.0 versetzt. Nach Temperierung Zusatz von 0.25 ml 0.1 M Benzylamin. Inkubation 60 Minuten im Schüttelthermostaten bei 37°C. Danach Substratzusatz zum Leerwert. Abstoppen der Reaktion mit 0.25 ml 60%iger Perchlorsäure. Die Probe wird dann mit 5.0 ml Cyclohexan versetzt und darin 2 mal im Abstand von 15 Minuten emulgiert. Nach Trennung der Phasen durch Zentrifugation wird der Cyclohexanextrakt bei 242 m $\mu$  und 1 cm Lichtweg im Zeiss-Spektrophotometer PMQII gegen den Leerwert photometriert. Angegeben wird die Extinktionszunahme im Cyclohexanextrakt pro Stunde und pro ml Plasma.

In einigen Versuchen wurde auch der Abbau des biologisch aktiven Histamins nach Schmutzler u. Mitarb.<sup>14</sup> bestimmt.

Getestete Aminoxydase-Hemmstoffe: Aminoguanidin-Sulfat (Schuchardt, München), Semicarbazid-hydrochlorid (Merck, Darmstadt), Hydroxylamin-hydrochlorid (Fluka, Buchs, Schweiz), Isoniazid = Isonicotinsäurehydrazid (Hoffman-La Roche, Basel, Schweiz), Iproniazid = Isonicotinylisopropylhydrazin-phosphat (Hoffman-La Roche).

2-Phenylcyclopropylamin-hydrochlorid (Hoffmann-La-Roche).

## ERGEBNISSE

Die Abbildung 1 zeigt den Gesamt-Sauerstoffverbrauch während des Umsatzes von Histamin durch enzymreiches Lebervenenplasma. Die Ansätze wichen insofern von dem in der Methodik beschriebenen Standardansatz ab, als nicht 0.5 ml sondern 1.0 ml Plasma und die Substratkonzentrationen  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-3}$ ,  $5 \times 10^{-3}$ , und  $1 \times 10^{-2}$  molar bei gleichbleibendem Gesamtvolumen eingesetzt wurden.

Die initiale Reaktionsgeschwindigkeit ist bei allen vier Substratkonzentrationen

gleich und bleibt—sofern genügend Substrat vorhanden ist—etwa 2 Stunden konstant. Die Reaktion kommt zum Stillstand, wenn pro Mol Substrat etwa 1/2 Mol  $O_2$  aufgenommen ist, was dem theoretisch geforderten  $O_2$ -Verbrauch beim Umsatz von Histamin durch eine Aminoxydase entspricht. Biologisch aktives Histamin ist dann in diesen Ansätzen nicht mehr vorhanden.

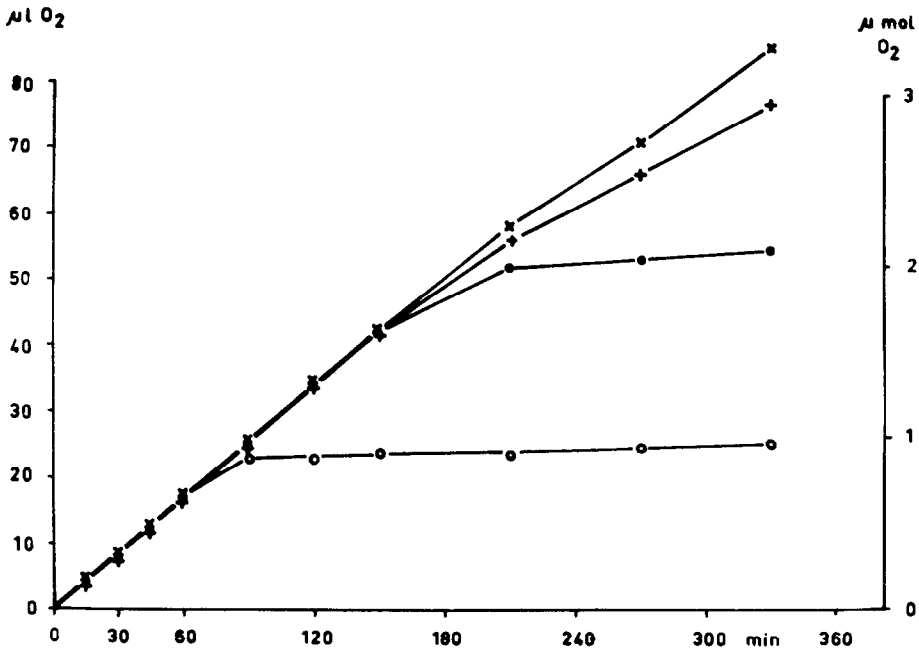


ABB. 1. Sauerstoffaufnahme während des Abbaues von Histamin durch sog. enzymreiches Lebervenenplasma, das die durch Heparin aus der Meerschweinchenleber entspeicherte Histaminase enthält. Die Ansätze enthielten bei Start der Reaktion an Substrat: ○—2  $\mu$ mole, ●—4  $\mu$ mole, +—10  $\mu$ mole und ×—20  $\mu$ mole.

TABELLE 1. SAUERSTOFFVERBRAUCH IN  $\mu$ l/3 STD DURCH 0.5 ml LEBERVENENPLASMA BEI INKUBATION MIT VERSCHIEDENEN MONO-, DI- UND POLYAMINEN

(Mittelwerte, mittlere Fehler der Mittelwerte und Anzahl der Einzeltestungen in Klammern)

Substrat Konzentr. $10^{-2}$ M	Normales Lebervenenplasma	Enzymreiches Lebervenenplasma
Cadaverin	$3.2 \pm 2.7$ (6)	$36.6 \pm 2.8$ (7)
Histamin	$1.2 \pm 0.7$ (4)	$28.7 \pm 1.4$ (21)
$\beta$ -Phenyläthylamin	$1.3 \pm 1.0$ (5)	$25.8 \pm 6.0$ (4)
Putrescin	$4.6 \pm 3.3$ (5)	$21.4 \pm 1.6$ (5)
Spermidin	$1.2 \pm 0.5$ (5)	$17.3 \pm 2.2$ (5)
Benzylamin	$3.2 \pm 1.4$ (6)	$14.6 \pm 2.8$ (7)
5-Hydroxytryptamin	$9.2 \pm 2.3$ (5)	$10.5 \pm 1.5$ (4)
Tyramin	$0.9 \pm 0.6$ (6)	$9.3 \pm 2.9$ (7)
Spermin	$1.1 \pm 0.4$ (6)	$8.2 \pm 1.1$ (7)
Tryptamin	$0.1 \pm 0.1$ (5)	$5.2 \pm 3.0$ (6)
Mescaline	$0.0 \pm 0.0$ (5)	$4.0 \pm 1.5$ (6)

Tabelle 1 zeigt, daß der Gesamt-Sauerstoffverbrauch während 3 Stunden Inkubation bei pH 7.0 von Cadaverin, Histamin,  $\beta$ -Phenyläthylamin, Putrescin, Spermidin und Benzylamin mit enzymreichem Lebervenenplasma deutlich höher ist als bei Inkubation mit normalen Lebervenenplasma. Bei 5-Hydroxytryptamin besteht kein Unterschied. Bei Tyramin, Spermin, Tryptamin und Mescaline liegen die Werte noch im Bereich der Fehlerbreite der Methodik und erlauben daher keine klare Aussage, daß diese Substrate durch enzymreiches Lebervenenplasma vermehrt abgebaut werden (Einzelwerte und Zeitverlaufskurven dieser Versuche können der Inaugural-Dissertation von J. Knop entnommen werden<sup>19</sup>).

In einer gesonderten Versuchsreihe wurde der Abbau von Putrescin und Benzylamin mit den optischen Tests von Holmstedt u. Tham<sup>15</sup> bzw. McEwen u. Cohen<sup>17</sup> nachgeprüft und der im biologischen Test bestimmten Histaminase-Aktivität gegenübergestellt. Die Ergebnisse (Tabelle 2) bestätigen die mit der Warburg-Methode erhobenen

TABELLE 2. ABBAU VON HISTAMIN, PUTRESCIN UND BENZYLAMIN DURCH LEBERVENEN-PLASMA DES MEERSCHWEINCHENS (EINZELPLASMEN)

Tier-Nr.	Intraportale Injektion von	Histaminase mE/ml Plasma	Diaminoxidase $\Delta E$ 436 m $\mu$ /3 std	Benzylaminoxidase $\Delta E$ 242 m $\mu$ / std
1	NaCl-Lösung 1.0 ml/kg	0.034	0.005	0.004
2		0.000	0.005	0.002
3		0.052	0.003	0.005
4	Heparin-Lösung 500 IE/kg	50.200	0.435	0.620
5		87.800	0.748	1.130
6		155.500	1.095	1.140
7		112.000	0.871	1.060
8		43.300	0.520	0.605

Befunde und zeigen die Entstehung von Aldehyden als Produkte der oxydativen Desaminierung von Putrescin und Benzylamin an ( $\Delta^1$ -Pyrrolin bzw. Benzaldehyd). Dabei läßt der Abbau des Histamins, des Diamins Putrescin und des Monoamins Benzylamin einen gewissen Parallelismus erkennen.

Die pH-Optima des Umsatzes dieser 3 Substrate sind aber unterschiedlich. Abb. 2 zeigt zunächst die Ergebnisse von Bestimmungen des Histamin-Abbaues bei verschiedenem pH mit der biologischen Methode. Das pH-Optimum hier bei pH 7.0. Die mit der Warburg-Methode ermittelten Werte liegen damit gut überein (Abb. 3). Anders verläuft die Kurve mit Cadaverin als Substrat. Hier liegt das Optimum bei pH 6.0, wobei in der Zeiteinheit beträchtlich mehr Cadaverin umgesetzt wird als Histamin bei pH 7.0. Bei einem pH unterhalb 6.0 fällt der Cadaverinabbau ziemlich steil ab.

Wieder anders verhält sich der Abbau von Benzylamin, der bei verschiedenem pH im optischen Test geprüft wurde. Hier nimmt der Umsatz von pH 5.0 bis 8.0 stetig zu (Abb. 4). Extremere pH-Bereiche wurden nicht getestet, um keinen anderen Puffer als Phosphatpuffer einsetzen zu müssen.

Tabelle 3 zeigt die Hemmbarkeit des Histamin- und Cadaverinabbaues bei pH 7.0 durch verschiedene typische Aminoxydase-Inhibitoren.

In diesen Versuchen wurden Warburgflaschen mit zwei Seitengefäßen benutzt. Der Hemmstoff wurde nach Temperierung und Begasung, das Substrat 15 Minuten später in den Hauptraum gekippt. Gesamtvolumen der Ansätze 2.0 ml (vgl. Methodik).

TABELLE 3. HEMMWIRKUNG VERSCHIEDENER AMINOXYDASE-INHIBITOREN IN PROZENT AUF DEN ABBAU VON HISTAMIN UND CADAVERIN DURCH FREISETZTE MEERSCHWEINCHENLEBERHISTAMINASE

Hemmstoff	Substrat: Histamin 10 <sup>-2</sup> M						Substrat: Cadaverin 10 <sup>-2</sup> M						
	Molare Hemmstoffkonzentration						Molare Hemmstoffkonzentration						
	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
Aminoguanidin					100 ±0 (3)	90 ±4 (6)	30 ±4 (5)	16 ±10 (5)			98 ±2 (3)	27 ±3 (6)	14 ±8 (4)
Hydroxylamin		100 (1)	100 (1)	96 ±4 (5)	53 ±8 (4)	10 ±5 (4)			100 (1)	96 ±1 (5)	50 ±10 (4)	21 ±9 (4)	
Semicarbazid			98 ±2 (5)	86 ±5 (4)	42 ±9 (3)	12 ±7 (4)			97 ±3 (4)	86 ±5 (4)	64 ±6 (5)	38 ±7 (5)	
Isoniazid	75 ±11 (3)	71 ±6 (4)					90 ±2 (3)	92 ±4 (4)					
Iproniazid	77 ±14 (3)	39 ±11 (3)	19 (1)				70 ±3 (1)	46 ±7 (3)	22 (1)				
Phenylcyclopropylamin		0 ±0 (2)						0 ±0 (2)					

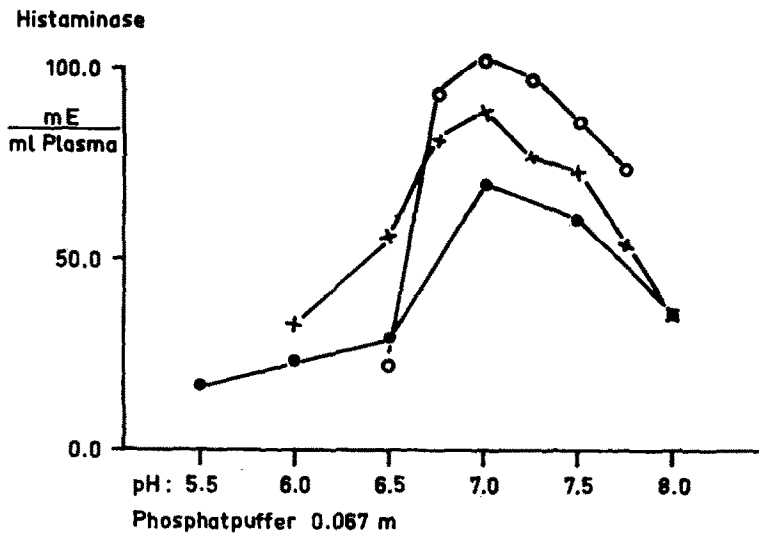


Abb. 2. Biologische Inaktivierung von Histamin bei verschiedenem pH durch enzymreiches Lebervenenplasma des Meerschweinchens. Dargestellt sind 3 Einzelversuche.

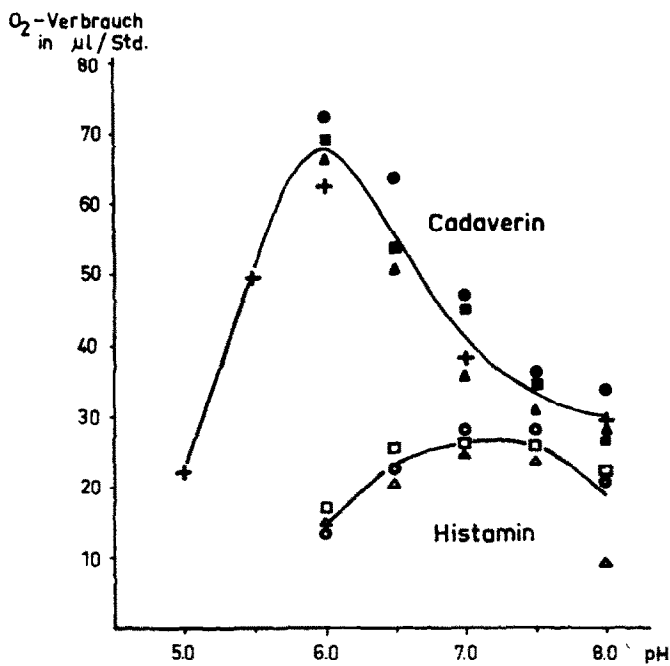


Abb. 3. Sauerstoffaufnahme innerhalb 60 Minuten während Inkubation von Cadaverin und Histamin mit enzymreichem Lebervenenplasma bei verschiedenem pH. Die verschiedenen Symbole repräsentieren Einzelversuche. Die ausgefüllten Symbole bedeuten Cadaverin, die offenen Symbole Histamin als Substrat bei Testung des gleichen Plasmas.

Die Hemmwirkung ist im Vergleich zu den jeweiligen Parallelansätzen ohne Hemmstoff in Prozent Hemmung des  $O_2$ -Verbrauches innerhalb 60 Minuten angegeben.

Sämtliche geprüften Hemmstoffe beeinflussen Histamin- und Cadaverinoxydation in annähernd gleicher Weise. Aminoguanidin ist unter ihnen der stärkste und bewirkt

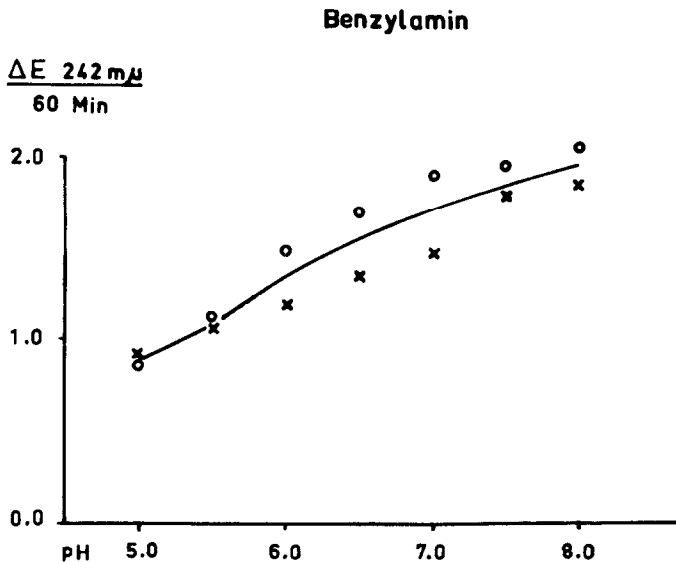


ABB. 4. Bildung von Benzaldehyd innerhalb 60 Minuten während Inkubation von Benzylamin mit enzymreichem Lebervenenplasma bei verschiedenem pH. Dargestellt sind 2 Einzelversuche.

schon in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M eine 90 bzw. 95%ige Hemmung. Hydroxylamin und Semicarbazid wirken schwächer, wenn auch noch in relativ geringen Konzentrationen. Mit Isoniazid und Iproniazid konnte selbst bei hohen Konzentrationen ( $10^{-3}$  bis  $10^{-2}$  M) keine vollständige Hemmung erzielt werden. Der spezifische Monoaminoxidase-Hemmstoff 2-Phenylcyclopropylamin hatte  $10^{-3}$  M (in höheren Konzentrationen war er nicht mehr vollständig löslich) keine Hemmwirkung.

Auch der Abbau von Benzylamin wurde nach Bestimmungen im optischen Test durch 2-Phenylcyclopropylamin ( $10^{-3}$  M) nicht gehemmt, wohl aber durch niedrige Konzentrationen Aminoguanidin (92%ige Hemmung bei  $10^{-7}$  M).

#### DISKUSSION

Die vorgelegten Ergebnisse klären einige Eigenschaften des histaminabbauenden Enzyms, das durch Heparin aus der Meerschweinchenleber freigesetzt wird.

Das Enzym gehört zur Gruppe der carbonylreagensempfindlichen Aminoxydasen (Enzyme Commission No. 1.4.3.6) und besitzt die klassischen Eigenschaften einer Histaminase. Diese Aussage stützt sich einmal auf seine Fähigkeit, Histamin unter Verbrauch von  $1/2$  Mol Sauerstoff pro Mol Substrat biologisch zu inaktivieren und mit einer Reihe von Mono-, Di- und Polyaminen unter  $O_2$ -Verbrauch zu reagieren. Mit zweien dieser Substrate konnten ferner die typischen Reaktionsprodukte einer



oxydativen Deaminierung nachgewiesen werden wie 4-Aminobutyraldehyd bzw.  $\Delta^1$ -Pyrrolin als Produkt des Putrescinabbaues und Benzaldehyd als Produkt des Benzylaminabbaues. Auch wird die enzymatische Aktivität durch typische Diaminoxidase-Inhibitoren, nicht dagegen durch den Monoaminoxidase-Inhibitor 2-Phenylcyclopropylamin gehemmt.

Hinsichtlich der Nomenklatur der Aminoxydasen besteht z.Zt. in der Literatur Unsicherheit. Die Zeller'sche Einteilung in Mono- und Diaminoxidasen, die von der internationalen Enzymkommission<sup>20</sup> übernommen wurde, kann nicht mehr befriedigen. In den letzten Jahren ist bekannt geworden, daß es Aminoxydasen gibt, die sowohl Mono- als auch Diamine angreifen, und ferner solche, die überwiegend Mono- oder Polyamine deaminieren, aber durch typische Diaminoxidase-Inhibitoren gehemmt werden.<sup>9, 11, 21</sup> Letzteres gilt besonders für die Plasmaaminoxidasen, von denen bisher zwei, die Rinderplasma-Sperminoxidase<sup>22</sup> und die Schweineplasma-Benzylaminoxidase<sup>23</sup> kristallisiert dargestellt werden konnten. Blaschko<sup>10</sup>, Nara u. Yasunobu<sup>24</sup> und auch Zeller<sup>9</sup> schlugen daher vor, die Aminoxydasen vorerst nach ihren Inhibitoren, ihrer Quelle und ihrem besten Substrat zu unterscheiden. Wir schließen uns der Nomenklatur Blaschko's<sup>10</sup> an und bezeichnen das hier untersuchte Enzymsystem als carbonylreagensempfindliche Meerschweinchenleber-Aminoxydase (Amin- $O_2$ -Oxidoreduktase 1.4.3.6).

Ob es sich bei dem von uns untersuchten Enzymsystem um ein einziges Enzym mit breiter Substratspezifität oder um ein Gemisch homologer Enzyme handelt, muß vorläufig offen bleiben. Der Parallelismus der enzymatischen Aktivität gegenüber Histamin, Putrescin und Benzylamin, den wir in anderem Zusammenhang bestätigen konnten (Schmutzler, im Druck), legt zwar eine Identität des Enzyms nahe, beweist sie jedoch nicht. Eine diesbezügliche Entscheidung wird erst nach Erarbeitung kinetischer Daten mit gereinigten Enzympräparaten möglich sein, ebenso die Deutung der verschiedenen pH-Optima beim Cadaverin-, Histamin- und Benzylaminabbau.

Das Enzym unterscheidet sich von der meist untersuchten Schweinenierenhistaminase (-diaminoxidase) insofern, als seine Aktivität durch hohe Substratkonzentrationen nicht gehemmt wird<sup>25</sup> und bereits bei sehr niedriger Substratkonzentration (Histamin  $4.5 \times 10^{-6}$  M) mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit arbeitet. Es läßt sich daraus schließen, daß das Enzym im physiologischen Histaminstoffwechsel eine Rolle spielen kann, wenn auch seine Wirkungsmöglichkeit unter extremen Bedingungen wie z.B. im anaphylaktischen Schock eng begrenzt ist.<sup>26</sup>

**Zusammenfassung**—Ausgeführt wurden Untersuchungen zur Substrat- und Inhibitorspezifität des histaminabbauenden Enzyms, das durch Heparin aus der Meerschweinchenleber liberiert wird. Nach Versuchen mit der Warburg-Technik geht der Umsatz von Histamin mit einem Sauerstoffverbrauch von  $1/2$  Mol  $O_2$  pro Mol Substrat einher.

Mit Histamin als Substrat wurde keine Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration in den Konzentrationsbereichen  $4.5 \times 10^{-6}$  bis  $1 \times 10^{-2}$  M festgestellt. Außer Histamin werden die Diamine Cadaverin und Putrescin, die Monoamine  $\beta$ -Phenyläthylamin und Benzylamin sowie das Polyamin Spermidin umgesetzt. Ein klarer Abbau von 5-Hydroxytryptamin, Tryptamin, Mescalin und Tyramin konnte mit der Warburg-Technik nicht gesichert werden.

Als Reaktionsprodukt des Putrescinabbaues wurde 4-Aminobutyraldehyd, bzw.  $\Delta^1$ -Pyrrolin, als Reaktionsprodukt des Benzylaminabbaues Benzaldehyd nachgewiesen.

Das pH-Optimum des Umsatzes von Cadaverin liegt bei 6·0, von Histamin bei 7·0, von Benzylamin bei 8·0.

Eine vollständige Hemmung des Umsatzes von Histamin, Cadaverin und Benzylamin ließ sich erzielen mit Aminoguanidin ( $10^{-6}$  M), Hydroxylamin ( $10^{-5}$  M), Semicarbazid ( $10^{-4}$  M). Deutlich schwächere Hemmwirkungen besaßen Isonicotinsäurehydrazid ( $10^{-2}$  M) und Iproniazid ( $10^{-2}$  M). 2-Phenylcyclopropylamin besaß  $10^{-3}$  M keine Hemmwirkung.

Nach diesen Ergebnissen gehört das Enzym zu den carbonylreagensempfindlichen Aminoxydasen (Enzyme Commission No. 1.4.3.6).

#### LITERATUR

1. W. BERNAUER, H. GIERTZ, F. HAHN, W. SCHMUTZLER, G. SESEKE und B. U. SIEVERS, *Naturwissenschaften* **51**, 412 (1964).
2. W. SCHMUTZLER, H. GIERTZ, F. HAHN und G. SESEKE, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **250**, 173 (1965).
3. W. SCHMUTZLER, O. GOLDSCHMIDT, J. KNOP und R. P. SCHAAFF, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **255**, 69 (1966 a).
4. W. SCHMUTZLER, F. HAHN, O. GOLDSCHMIDT und G. SESEKE, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **255**, 344 (1966 b).
5. F. HAHN, W. SCHMUTZLER, G. SESEKE, H. GIERTZ und W. BERNAUER, *Biochem. Pharmac.* **15**, 155 (1966).
6. W. SCHMUTZLER und O. GOLDSCHMIDT, in Vorbereitung.
7. W. SCHMUTZLER und K. P. BETHEGE, in Vorbereitung.
8. W. SCHULER, *Experientia* **8**, 230 (1952).
9. E. A. ZELLER, Diamine oxidases. In *The Enzymes*, 2nd edn., vol. 8, pp. 313–335 (1963).
10. H. BLASCHKO, *Adv. comp. physiol. Biochem.* **1**, 67 (1962).
11. F. BUFFONI, *Pharmac. Rev.* **18**, 1163 (1966).
12. D. RICHTER, *Biochem. J.* **31**, 2022 (1937).
13. E. A. ZELLER, *Helv. Chim. Acta* **21**, 880 (1938).
14. W. SCHMUTZLER, F. HAHN, G. SESEKE und W. BERNAUER, *Arch. exp. Path. Pharmac.* **252**, 332 (1966 c).
15. B. HOLMSTEDT and R. THAM, *Acta physiol. scand.* **45**, 152 (1959).
16. E. WERLE und V. SCHIRREN, *Z. ges. exp. Med.* **138**, 522 (1965).
17. C. M. McEWEN and J. D. COHEN, *J. Lab. clin. Med.* **62**, 766 (1963).
18. C. W. TABOR and S. M. ROSENTHAL, *J. biol. Chem.* **208**, 645 (1954).
19. H. KNOP, Inaugural-Dissertation, Freiburg i. Br. (1968).
20. Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry. J.U.B. Symp. Series, vol. 20, Pergamon Press, Oxford (1961).
21. H. BLASCHKO, Amine oxidase. In *The Enzymes* 2nd edn, vol. 8, pp. 337–351 (1963).
22. H. YAMADA and K. T. YASUNOBU, *J. biol. Chem.* **237**, 1511 (1962).
23. F. BUFFONI and H. BLASCHKO, *Proc. R. Soc.* **161**, 153 (1964).
24. S. NARA and K. T. YASUNOBU, in *The Biochemistry of Copper*, (Eds. J. PEISACH, P. AISEN and W. E. BLUMBERG), pp. 423–436. Academic Press, New York (1966).
25. E. A. ZELLER, B. SCHÄR und S. STÄHLIN, *Helv. Chim. Acta* **22**, 837 (1939).
26. H. GIERTZ, F. HAHN, G. SESEKE und W. SCHMUTZLER, *Naunyn-Schiedebergs Arch. exp. Path. Pharmac.* **256**, 26 (1967).