

## 102. Weitere Beiträge zur Kenntnis der Diamin-oxydase (Histaminase)

4. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Poly-aminen<sup>1)</sup>

von E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin.

(24. IV. 39.)

In der 3. Mitteilung dieser Untersuchungsreihe<sup>2)</sup> wurde ein gewisser Abschluss über das Spezifitätsproblem der früher als Histaminase bezeichneten Diamin-oxydase erreicht<sup>3)</sup> und die Regel aufgestellt, dass nur solche Körper von dem Ferment abgebaut werden, die zwei Aminogruppen, von denen die eine substituiert sein kann, aufweisen, und die nicht in  $\alpha$ -Stellung zur freien Aminogruppe eine Carboxylgruppe tragen. Nun gingen wir der Frage nach, ob neben Histamin, Putrescin, Cadaverin, Spermin, Spermidin, Agmatin und Äthylen-diamin noch weitere Basen im tierischen Organismus vorkommen, die zu der durch die erwähnte Regel umfassten Körperklasse gehören. Von diesem Gesichtspunkt aus wurde das Verhalten des Aneurin (Vitamin B<sub>1</sub>), das als Trimethylen-diaminderivat betrachtet werden kann, gegenüber der Diamin-oxydase studiert, besonders auch deshalb, als schon seit längerer Zeit Beziehungen zwischen Histamin und B<sub>1</sub> vermutet wurden<sup>4)</sup>.

In jener Publikation wurde die wechselnde Affinität der verschiedenen Substrate benutzt, um zu zeigen, dass es sich bei der Einwirkung von Carbonylreagentien und Guanidinderivaten auf das Enzym um eine kompetitive Hemmung handle. Wir unterzogen nun die Bindungsverhältnisse zwischen Ferment und Substrat einer genaueren Analyse, um jene Schlussfolgerungen zu erhärten und um ein exaktes Material für die Beurteilung der gegenseitigen Beeinflussung der Oxydation der aufgezählten Basen an der Diamin-oxydase zu gewinnen.

<sup>1)</sup> Teilweise am 4. II. 1939 vorgetragen: *E. A. Zeller*, Verh. schweiz. Physiol. **14**, 27 (1939).

<sup>2)</sup> *E. A. Zeller*, Helv. **21**, 1645 (1938).

<sup>3)</sup> *K. Felix* und *K. Zorn*, Z. physiol. Ch. **258**, 16 (1939), schreiben in der am 19. XII. 1938 eingesandten Arbeit: „In der Diskussion, welche im Anschluss an die Mitteilung unserer Befunde auf dem 16. Internationalen Physiologenkongress entstand, wies *E. A. Zeller* darauf hin, dass nach seinen Versuchen, die inzwischen ausführlich erschienen sind, 2 Fermente vorliegen. Er bezeichnet das Ferment, welches die Amine abbaut, als Diamino-oxydase.“ Dazu ist zu bemerken, dass die erste vorläufige Mitteilung in den Naturwissenschaften am 6. V. 1938 (eingesandt am 12. IV. 1938) und die erste ausführliche Arbeit, in der die Abgrenzung der Diamin-oxydase gegenüber der (Mono-)Amin-oxydase und der *d*-Aminosäure-oxydase experimentell belegt wurde, am 1. VII. 1938 (der Redaktion am 3. VI. 1938 zugesandt), also anderthalb Monate vor dem Kongress herausgekommen ist.

<sup>4)</sup> Zusammenfassung bei: *A. Küpper*, Erg. Physiol. **30**, 153 (1930).

Ursprünglich wurde der enzymatische Abbau von Histamin am biologischen Objekt geprüft und das Verschwinden der Histaminwirkung auf den Blutdruck der atropinisierten Katze oder auf den isolierten Meerschweinchendarm verfolgt. Um einen Vergleich dieser Methoden mit den von uns fast ausschliesslich angewandten chemischen in sicherer Weise zu ermöglichen, war es nötig zu wissen, in welcher Stufe der Histamin-Diamin-oxydase-Reaktion die Inaktivierung erfolgt. Zu diesem Zweck setzten wir die Inaktivierungsgeschwindigkeit mit der Desaminierungs- und der Oxydationsgeschwindigkeit in Beziehung. Dadurch sollte auch gleichzeitig die Frage entschieden werden, ob das Histamin als solches oder erst ein Abbauprodukt desselben die bekannten, vielfältigen Wirkungen auf den tierischen Organismus ausübe.

Bei der Untersuchung der Verteilung der „Histaminase“ bei verschiedenen Tieren und Organen fanden *Best* und *McHenry*<sup>1)</sup> und *Edlbacher* und *Zeller*<sup>2)</sup>, dass besonders die Nierenrinde und die Dünndarmschleimhaut, in einigen Fällen auch die Leber reich an diesem Enzym sind. Da eine Reihe von Befunden darauf hindeuteten, dass auch die Placenta eine wesentliche Rolle im Histamin-Stoffwechsel spiele, bestimmten wir deren Fähigkeit, Diamine zu oxydieren.

#### Methodisches.

Die Methoden sind zur Hauptsache dieselben, die in der 2.<sup>3)</sup> und 3. Mitteilung beschrieben worden sind. Im Folgenden soll die Herstellung eines für verschiedene Zwecke vorteilhaften Fermentpräparates und der chemische Nachweis sehr kleiner Mengen von Diamin-oxydase erläutert werden.

##### a) Wasserlösliches Fermentpräparat.

Wenn man Aceton-Trockenpulver aus Schweinenieren eine Viertelstunde mit der zehnfachen Menge *m/15*-Phosphatpuffer  $p_H$  6,9 (in den in dieser vorliegenden Arbeit wiedergegebenen Versuchen wurde ausschliesslich diese Pufferlösung verwendet) bei 38° extrahiert und das Filtrat im Vakuum mit Zusatz von etwas Octylalkohol eindampft und trocknet, so erhält man ein Pulver von folgenden Eigenschaften: es ist vollkommen wasserlöslich, bildet ohne Substrat wenig Ammoniak und zeigt eine geringe Eigenatmung; es ist 2 bis 3 mal so aktiv wie das Ausgangsmaterial. Die Fermentlösung kann unmittelbar vor dem Versuch hergestellt werden, ohne dass sie zentrifugiert und in den meisten Fällen ohne dass sie dialysiert zu werden braucht, sodass man für vergleichende und zeitlich auseinander liegende Versuche über praktisch identische Enzympräparate verfügt.

<sup>1)</sup> *C. H. Best* und *E. W. McHenry*, *J. Physiol.* **70**, 349 (1930).

<sup>2)</sup> *Helv.* **20**, 717 (1937).

<sup>3)</sup> *E. A. Zeller*, *Helv.* **21**, 880 (1938).



zunimmt. Wenn die Konzentration des Aneurins so gross ist wie die des Histamins, so wird die Spaltung des letztern fast gänzlich unterbunden. Die Fig. 1, obwohl sie aus verschiedenen Versuchen zusammengestellt wurde, lässt erkennen, dass zwischen Aneurinkonzentration und Hemmung Proportionalität besteht. Auf diese Tatsache liesse sich unschwer eine fermentchemische Aneurinbestimmung aufbauen. Mit Hilfe der Aktivitäts- $p_s$ -Kurve des Systems Histamin-Diamin-oxydase (vgl. 2. Abschnitt) lässt sich die Affinität des Aneurins zur Diamin-oxydase als mindestens zwei mal so gross wie die des Histamins schätzen. Die Hemmung kommt demnach so zustande, dass das Aneurin wegen seiner grossen Affinität zum Ferment dieses blockiert.

**Tabelle 1.**  
Hemmung der Diamin-oxydase durch Aneurin.

Reaktionsdauer	Substrat	Molarität Aneurin	Hemmung in Prozent	
			NH <sub>3</sub> -Bild.	O <sub>2</sub> -Verbr.
65 Min.	Cadaverin 0,002-m.	0,001	82	
90 Min.	Histamin 0,001-m.	0,001	90	
160 Min.	Histamin 0,001-m.	0,00008	10	8
		0,00032	27	25
		0,00064	41	53

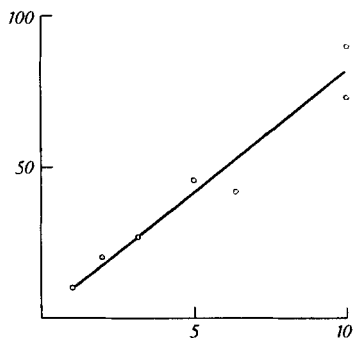


Fig. 1.

Hemmung der Diaminoxydase durch Aneurin.

Abszisse: Konzentration des Aneurins in Millimol, Ordinate: Hemmung der Ammoniakbildung in Prozent, Substrat:  $10^{-3}$ -m. Histamin.

Besteht ein derartiger Zusammenhang auch *in vivo*, und gehört es mit zu den Funktionen des Aneurins, den Stoffwechsel des Histamins zu beeinflussen? In der Niere, in der am ehesten ein solcher Mechanismus realisiert sein könnte, entspricht das Verhältnis der

Konzentrationen von Aneurin und Histamin dem in der Tabelle 1 angeführten. In 1 g Säugerniere sind 3 bis 4  $\gamma$  Histamin<sup>1)</sup> und in der Rattenniere 2,5 bis 10  $\gamma$  Aneurin<sup>2)</sup> enthalten. Da der Aneuringehalt B<sub>1</sub>-avitaminotischer Tiere sehr stark erniedrigt ist, müsste sich bei diesen ein stärkerer Abbau von Histamin und andern Diaminen finden als bei normalen Tieren. Das konnten wir bei der Ratte auch tatsächlich zeigen. In der 3. Mitteilung wurde die Erfahrung früherer Autoren bestätigt, dass die Rattenniere keine Diamin-oxydase enthält. Mit Hilfe der im methodischen Teil angegebenen Verfahren gelang es uns, in der Mehrzahl der Fälle bei B<sub>1</sub>-avitaminotischen Ratten, deren B<sub>1</sub>-Mangel durch die elektrocardiographische bestimmte Bradycardie kontrolliert worden war, einen geringen, aber deutlichen Abbau von Histamin und Cadaverin festzustellen.

## 2. Die Affinität zwischen Diamin und Diamin-oxydase.

Aus Fig. 1 der 3. Mitteilung geht hervor, dass die Abbaugeschwindigkeit in der Reihe der Diamine vom Äthylendiamin bis zum Pentamethylen-diamin stetig zunimmt. Wie verhält sich die Affinität Ferment-Substrat in dieser homologen Reihe? In jener Publikation wurde anhand eines Konkurrenzversuchs (Tabelle 1) dargelegt, dass Äthylen-diamin stärker als Trimethylen-diamin von der Diamin-oxydase gebunden wird. Diese Experimente wurden durch Vergleich der oxydativen Desaminierung verschiedener Triamine<sup>3)</sup> fortgesetzt. Mit Triaminen von der Formel H<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>NH<sub>2</sub> (Spermidin-homologe) und mit verschiedenen langen Methylen-ketten lassen sich intramolekulare Konkurrenzversuche durchführen, weil die Molekel auf zwei verschiedene Arten sich mit dem Enzym verbinden kann, entweder mit der längern oder mit der kürzern Kette. Diejenige wird umso mehr bevorzugt, je grösser ihre Affinität gegenüber der andern ist. Welche Kette reagiert hat, das erkennt man an der Abbaugeschwindigkeit, da diese, wie erwähnt, eine Funktion der Kettenlänge ist. So wurde in der vorangehenden Mitteilung hingewiesen, dass Spermidin (n = 3, m = 4) mit einer dem Trimethylen-diamin entsprechenden Geschwindigkeit desaminiert wird. Spermin wird noch langsamer gespalten, offenbar, weil es überhaupt nur mit einer Dreierkette sich mit dem Ferment verknüpfen kann, da die mittelständige Viererkette keine unsubstituierte Aminogruppe besitzt. Besonders klar kommen die herrschenden Gesetzmässigkeiten zum Ausdruck, wenn man verschiedene Triamine auf ihr Verhalten gegenüber der

<sup>1)</sup> C. H. Best und E. W. McHenry, l. c.; V. W. Thorpe, Biochem. J. **22**, 94 (1928).

<sup>2)</sup> K. Ritsert, Klin. Wschr. **17**, 1379 (1938); H. G. K. Westenbrink und J. Goudsmit, Enzymologia **5**, 307 (1938).

<sup>3)</sup> Für die Überlassung der zum ersten Mal von J. v. Braun und W. Pinkernelle (B. **70**, 1230 (1937)) dargestellten Triamine sind wir dem leider vor Kurzem verstorbenen Prof. J. v. Braun sehr zu Dank verpflichtet.

Diamin-oxydase prüft. So ist in Fig. 2 die Desaminierung und in Fig. 3 die Oxydation verschiedener, durch Indices, die die Zahl der Methylgruppen angeben, gekennzeichnete Triamine dargestellt. Wegen der kleinen Reaktionsgeschwindigkeit ist nicht die Anfangsgeschwindigkeit, wie es sich gehörte, sondern das Reaktionsergebnis nach mehreren Stunden aufgezeichnet. In diesem Falle macht sich auch der zweite Oxydationsschritt bemerkbar, von dem von vorneherein nicht bekannt ist, ob bei diesem die gleichen Beziehungen zwischen Kettenlänge, Affinität und Umsatzgeschwindigkeit bestehen. Trotzdem ersieht man aus den Figuren mit völliger Klarheit, dass in erster Linie die Dreierkette die Geschwindigkeit bestimmt, dass sie somit eine grössere Affinität zur Diamin-oxydase als die Vierer- und Fünferkette besitzt.

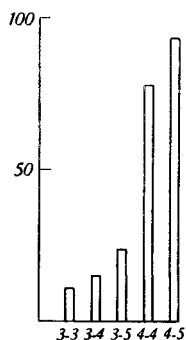


Fig. 2.

Ammoniakbildung mit verschiedenen Triaminen.

Ordinate: Stickstoff, Konzentration der Substrate:  $4 \times 10^{-3}$ -m., Reaktionsdauer: 24 Stunden.

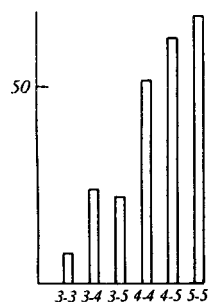


Fig. 3.

Sauerstoffverbrauch mit verschiedenen Triaminen.

Ordinate: mm<sup>3</sup> Sauerstoff, Substratkonzentration:  $4 \times 10^{-3}$ -m., Reaktionsdauer: 15 Stunden.

Diese mehr qualitativen Angaben sollen durch quantitative ergänzt und die *Michaelis*-Konstante für verschiedene Substrate bestimmt werden. Die dazu nötige Messung der anfänglichen Reaktionsgeschwindigkeit bei verschiedenen Substratkonzentrationen bot einige Schwierigkeiten. Schon *McHenry* und *Gavin* wiesen das Bestehen einer Inkubationszeit bei der Histaminase nach<sup>1)</sup>, die bei ihren Versuchen 5 Stunden dauerte. Bei den in den letzten Mitteilungen entwickelten Fermentpräparaten und Ansätzen wurde die Inkubationszeit auf wenige Minuten (Fig. 7) und schliesslich auf weniger als eine Minute, d. h. für unsere Methoden nicht mehr nachweisbar, heruntergedrückt. Nach Tabelle 2 erhielten wir schon nach einer Minute die richtige Grösse der Geschwindigkeitskonstante. Da wir den Sauerstoffverbrauch verfolgten, musste wieder die Frage geprüft

<sup>1)</sup> *E. W. McHenry* und *G. Gavin*, *Biochem. J.* **26**, 1365 (1932).

werden, ob nicht in der für die Messung nötigen Zeit die Oxydation des Zwischenprodukts die des unveränderten Substrats überlagert. Man bekommt schon bei der Betrachtung der Kurve des Oxydationsverlaufs (Fig. 4) einen gewissen Einblick in die vorliegenden Ver-

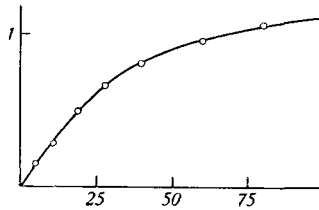


Fig. 4.

Oxydation des Putrescins an der Diamin-oxydase. Abszisse: Minuten, Ordinate: verbrauchte Sauerstoffatome pro Molekel Putrescin, Ansatz: 3,5 cm<sup>3</sup> gegen Puffer dialysierte Fermentlösung, mit Puffer auf 4 cm<sup>3</sup> ergänzt, Putrescin 0,001-m.

hältnisse. Die Geschwindigkeit, mit der Sauerstoff gebunden wird, nimmt nach Verbrauch einer halben Molekel O<sub>2</sub> pro Molekel Substrat sehr deutlich ab; die Geschwindigkeit der zweiten Reaktionsstufe ist also wesentlich geringer als die der ersten. Überdies muss sich das Substrat der zweiten erst bilden, sodass von vornherein wahrscheinlich ist, dass in der Anfangszeit die Geschwindigkeit allein durch die Konzentration des unveränderten Substrats bestimmt wird. Diese Annahme lässt auf folgende Weise kontrollieren. *McHenry* und *Gavin* (l. c.) hatten mit Hilfe der biologischen Methode gezeigt, dass die Geschwindigkeitskonstante des enzymatischen Abbaus von Histamin die einer monomolekularen Reaktion ist, was bedeutet, dass der Zerfall der Ferment-Substratverbindung geschwindigkeitsbestimmend ist. Wir konnten auf rein chemischen Weg das Ergebnis der genannten Autoren bestätigen (Tabelle 2). Die Geschwindigkeitskonstante der monomolekularen Reaktion

$$k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x}$$

( $a$  = Anzahl Mole des Substrats am Anfang,  $x$  = in der Zeit  $t$  umgesetzte Anzahl Mole des Substrats)

ist aber nur in den ersten Minuten wirklich konstant und nimmt dann erwartungsgemäss zu. *McHenry* und *Gavin* fanden, dass die Grösse  $k$  bis zum Ende konstant blieb, was begreiflich ist, da sie die biologische Inaktivierung massen, die nach Abschnitt 3 unserer Arbeit schon durch den ersten Oxydationsschritt bewirkt wird.

Für die Bestimmung der Aktivitäts- $p_s$ -Kurve wurden die Messungen der ersten 15 Minuten benutzt, bei denen sich also schon die zweite Stufe bemerkbar macht, die aber, besonders bei Putrescin und Cadaverin, vernachlässigt werden darf. Die in den Figg. 5 und 6 wiedergegebenen Versuchen wurden innerhalb 24 Stunden mit dem gleichen Fermentpräparat durchgeführt.

**Tabelle 2.**

Verlauf der Cadaverin-Diamin-oxydase-Reaktion.

Ansatz: 3,5 cm<sup>3</sup> gegen Puffer dialysierte Fermentlösung, 4 × 10<sup>-6</sup> Mol Cadaverin, mit Puffer auf 4 cm<sup>3</sup> ergänzt. Zeitangaben: Sekunden nach Einkippen des Cadaverins. Sauerstoffatmosphäre, Leerwerte subtrahiert.

Zeit	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Mol Substrat × 10 <sup>-6</sup>	$k = \frac{1}{t} \lg \frac{a}{a-x}$
1	2,6	0,23	0,025
2	4,4	0,39	0,022
3	7,0	0,62	0,024
4	9,0	0,80	0,024
5	11,3	1,01	0,025
6	13,0	1,16	0,025
8	17,0	1,52	0,026
10	21,2	1,89	0,028
12	24,8	2,21	0,029
15	28,7	2,56	0,0295
18	33,0	2,94	0,032
22	38,1	3,38	0,037

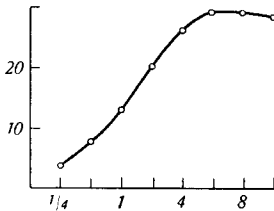


Fig. 5.

Aktivitäts-p<sub>S</sub>-Kurve von Putrescin-Diamin-oxydase.

Abszisse: Millimolarität des Putrescin, Ordinate: mm<sup>3</sup> Sauerstoffverbrauch in 10 Minuten, Ansatz: 3,5 cm<sup>3</sup> gegen Puffer dialysierte Fermentlösung, mit Puffer auf 4 cm<sup>3</sup> ergänzt.

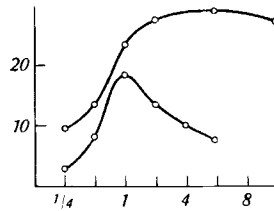


Fig. 6.

Aktivitäts-p<sub>S</sub>-Kurve von Cadaverin- und Histamin-Diamin-oxydase.

Obere Kurve: Cadaverin, untere Kurve: Histamin, das Übrige wie bei Fig. 4.

Die Kurven weisen die typische S-Form auf. Durch graphische Interpolation lassen sich aus ihnen die *Michaelis*-Konstanten (Konzentration des Substrats, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit die Hälfte der maximalen ist) ermitteln. Sie sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

**Tabelle 3.**

*Michaelis*-Konstanten für verschiedene Substrate der Diamin-oxydase.

Substrat	$k_M$	$1/k_M$
Putrescin . .	0,0012	840
Cadaverin . .	0,00056	1800
Histamin . .	0,00050	2000
(Aneurin . .	0,00025	4000)



Bei den Diaminen lässt sich somit hinsichtlich der Affinität zur Diamin-oxydase folgende Reihenfolge aufstellen:

Äthylen-diamin > Trimethylen-diamin > Cadaverin > Putrescin

und weiterhin:

Aneurin > Histamin > Cadaverin > Putrescin

Die Resultate stehen in voller Übereinstimmung mit den Ergebnissen der 3. Mitteilung. In dieser wurde an mehreren Beispielen gezeigt, dass Guanidin und seine Derivate und die Carbonylreagentien den Abbau von Putrescin stärker als den von Histamin und Cadaverin hemmen. Die Annahme, dass es sich bei diesen zwei Gruppen von Körpern um „competitive inhibitors“ handle, ist damit bestätigt worden.

Es wurde schon früher (2. Mitteilung) das Vorhandensein einer scharf ausgeprägten optimalen Histaminkonzentration bei Desaminierungsversuchen beobachtet. Diese Erscheinung muss bei allen Experimenten, bei denen Histamin als Substrat dient, berücksichtigt werden, wenn man vor Fehlschlüssen gesichert sein will. Als Beispiel sei auf die Bestimmung des Gehalts an Diamin-oxydase in verschiedenen Organen hingewiesen. Man erhält nur dann wirklich vergleichbare Resultate, wenn die optimale Konzentration ermittelt und bei dieser der Histaminabbau gemessen wird. Eine zu geringe und besonders eine zu grosse Histaminkonzentration lässt den Fermentgehalt als kleiner erscheinen, als er wirklich ist. Bei Anwendung einer rein chemischen Methodik kann man diese Schwierigkeit vermeiden, wenn man Cadaverin als Substrat benützt. Wenn man eine sicher sättigende Menge zusetzt, ist man gewiss, eine maximale Wirkung zu erzielen. Dazu kommt, wie Fig. 6 und frühere Resultate zeigen, dass Cadaverin rascher als Histamin oxydiert wird. Diese Vorteile der Verwendung von Cadaverin kommen besonders dann zur Geltung, wenn es sich um sehr kleine Enzymmengen handelt (vgl. Methodisches).

### 3. Der Vergleich der biologischen Inaktivierung mit der oxydativen Desaminierung des Histamins.

*McHenry* und *Cavin* (l. c.) hatten gefunden, dass die Inaktivierung, gemessen am Blutdruck der atropinisierten Katze, parallel der Desaminierung verläuft. Wir wiederholten diese Versuche, indem wir das Verhalten des Histamins gegenüber dem isolierten Meerschweinchendarm verfolgten. Immer dann, wenn eine Molekel Ammoniak aus dem Histamin abgespalten war, verschwand auch die Wirkung auf den Darm. Aus Tabelle 4 geht hervor, dass die Geschwindigkeit beider Prozesse gleich gross ist.

Tabelle 4.

Vergleich zwischen Inaktivierung und Desaminierung des Histamins. Ansatz:  $10^{-6}$  Mol Histamin in  $10\text{ cm}^3$  Fermentlösung. Nach den angegebenen Zeitabständen (Minuten) Entnahme der Proben für Ammoniak- und Aktivitätsbestimmung (Meerschweinchendarm). Die Zahlen, mit  $10^{-6}$  multipliziert, bedeuten die Menge der umgesetzten Mol.

Zeit	Aktivitätsabnahme	Ammoniakbildung
85	2,2	1,3
115	4,1	3,7
150	5,1	4,7
200	6,1	7,2

Ein Atom Sauerstoff setzt eine Molekel Ammoniak in Freiheit. Es sollte deshalb nach Verbrauch eines Sauerstoffatoms ebenfalls das Histamin inaktiviert sein. Wie die Fig. 7 zeigt, ist das nur annähernd der Fall. Mit zunehmender Reaktionsdauer bleibt die Inaktivierung hinter der Oxydation immer mehr zurück. Die Abweichung ist bedingt durch den Einfluss der im vorangehenden Abschnitt diskutierten Oxydation des ersten Zwischenprodukts. (Ein kleiner Teil des zusätzlichen Sauerstoffverbrauchs ist durch die Eigenatmung des Fermentpräparats bedingt). Es geht somit auch aus diesen Versuchen eindeutig hervor, dass die biologische Aktivität des Histamins durch den in der 2. Mitteilung formulierten ersten Oxydationsschritt zum Verschwinden gebracht wird.

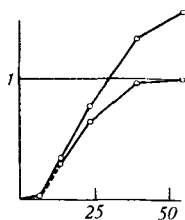


Fig. 7.

Inaktivierungs- und Oxydationsgeschwindigkeit von Histamin. Abszisse: Minuten, Ordinate: Zahl der verbrauchten Atome Sauerstoff resp. Zahl der inaktivierten Molekel Sauerstoff pro Molekel zugesetztem Histamin, obere Kurve: verbrauchter Sauerstoff, untere Kurve: inaktiviertes Histamin, Konzentration Histamin:  $10^{-3}$ -m.

Dieses Resultat entscheidet auch die Frage, ob das Histamin selber oder erst ein Abbauprodukt desselben das wirksame Agens im Tierversuch darstellt, im erstern Sinne. Das kann durch einen weitem, einfachen Versuch demonstriert werden. Setzt man zu der Tyrodelösung, in der ein Stück Meerschweinchendarm aufgespannt ist, soviel Semicarbazid als für die Ausschaltung der Diamin-oxydase nötig ist ( $0,0001$ -m.), so reagiert der Darm in gleicher Weise wie vorher auf Histamin, gelegentlich sogar stärker.

Alle unsere Ergebnisse bestätigen und erweitern diejenigen von *McHenry* und *Cavin*: Der Verlust der Histaminwirkung ist gleichbedeutend mit der Entstehung einer Molekel Ammoniak und mit dem Verbrauch eines Sauerstoffatoms. Damit ist die Beziehung zwischen biologischer und chemischer Methodik aufgeklärt.

#### 4. Das Vorkommen der Diamin-oxydase in der Placenta.

Es ist ein grosses Tatsachenmaterial bekannt, das auf eine Veränderung des Histamin-Stoffwechsels in der Schwangerschaft bei Mensch und Tier hindeutet. So nimmt die Fähigkeit Histamin zu inaktivieren, während der Geburt im Blute sehr stark zu<sup>1)</sup>. Verschiedene Autoren bringen den abnorm hohen Histamingehalt des Blutes bei gewissen pathologischen Zuständen der Schwangerschaft in einen ursächlichen Zusammenhang mit den Krankheitssymptomen<sup>2)</sup>. Auch der Befund ist bedeutsam, dass das vom Foetus zur Placenta strömende Blut mehr Histamin enthält als das, das von der Placenta zurückströmt<sup>1)</sup>. Es lag deshalb nahe, die Placenta auf ihren Gehalt an Diamin-oxydase zu untersuchen. Wir fanden denn auch, dass sowohl die frische Placenta als auch die aus ihr hergestellten Aceton-Trockenpulver das Enzym in relativ hoher Konzentration enthalten. Tabelle 5 zeigt, dass die Wirksamkeit verschiedener Menschen-Placenten von derselben Grössenordnung ist. Dass es sich wirklich um die Diamin-oxydase handelt, beweist die Tabelle 6. Das Ferment desaminiert in gleicher Weise Cadaverin und Histamin und wird durch 0,0002-m. Semicarbazid vollständig inaktiviert.

Tabelle 5.

Desaminierung von Cadaverin durch 4 verschiedene Placenten (Mensch). Ansatz: Organbrei mit doppelter Menge Wasser extrahiert, gegen Puffer dialysiert, 2,5 cm<sup>3</sup> Lösung mit 2,5 cm<sup>3</sup> Puffer und 10<sup>-5</sup> Mol Cadaverin versetzt. Dauer: 21 Stunden.

$\gamma$ N (erste Zahl = Leerwert)	$\Delta$
25/114	89
42/145	103
10/110	100
10/85	75

Damit ist das Vorkommen von „Histaminase“ in der Placenta, das schon von *Marcou*<sup>3)</sup> wahrscheinlich gemacht worden war, sicher gestellt. Der Fermentgehalt ist nicht so hoch wie der der (Schweine-) Niere, aber in Anbetracht ihrer Grösse ist die Placenta neben der

1) *I. Marcou* und *E. Atanasiu-Vergu*, Bull. Acad. Méd. Roumanie [II] **3**, 19 (1937).

2) Zusammenfassung bei: *W. Feldberg* und *E. Schilf*, Histamin, Berlin 1930.

3) *I. Marcou* c. s., Presse Médicale **20**, 371 (1938).

Niere und der Darmschleimhaut einer der wichtigsten Organe für den oxydativen Abbau von Histamin und Polyaminen.

**Tabelle 6.**

Einfluss von Semicarbazid auf die Desaminierung von Histamin durch die Menschenplacenta.

Ansatz: Aceton-Trockenpulver mit der fünffachen Menge 2,5-proz. NaCl-Lösung extrahiert, gegen Puffer dialysiert, 3 cm<sup>3</sup> Lösung auf 3,5 cm<sup>3</sup> durch Puffer ergänzt. Dauer: 15 Stunden.

	γ N
Ferment allein . . . . .	26
Ferment+ Cadaverin (0,003-m.) . . . . .	83
Ferment+ Histamin (0,001-m.) . . . . .	73
Ferm.+ Histamin (0,001-m.)+ Semicarb. (0,0002-m.) .	23

**Diskussion der Ergebnisse.**

Die Diamin-oxydase der Darmschleimhaut zerlegt die im Darm-lumen durch verschiedene Bakterien gebildeten Stoffe Histamin, Putrescin und Cadaverin und schützt den Organismus auf diese Weise vor einer Überschwemmung mit diesen Basen<sup>1)</sup>. Es ist aber ungewiss, ob das gleiche, in der Niere und Placenta wirksame Ferment, mit Putrescin und Cadaverin, deren Vorkommen in der Zelle nicht erwiesen ist, normaliter zu reagieren Gelegenheit hat. An deren Stelle treten neben Histamin, Spermin, Spermidin und Aneurin. Alle vier sind Derivate des Trimethylen-diamins und besitzen aus diesem Grunde eine grosse Affinität zur Diamin-oxydase. Die Struktur des Trimethylen-diamins ist nach verschiedener Richtung hin variiert: Beim Histamin wird durch die konjugierte Doppelbindung des Imidazolringes die Seitenkette so aktiviert, dass die Abbaugeschwindigkeit gegenüber der des Grundkörpers stark gesteigert ist. Beim Aneurin steht die freie Aminogruppe am Pyrimidinkern, dessen Stabilität offenbar zu gross ist, als dass es trotz der festen Bindung an das Ferment zu einer oxydativen Desaminierung kommt. Demgemäss kann das Aneurin nicht durch die Diamin-oxydase der Darmschleimhaut zerstört werden, was mit der alimentären Genese der Beri-Beri in Einklang steht. Spermin und Spermidin werden als wenig abgewandelte Derivate des Trimethylendiamins sehr langsam abgebaut. Das zeigt sich nicht nur im Ferment-, sondern auch im Tierversuch. Nach subkutaner Injektion von Spermin treten bei der Ratte erst nach 48 Stunden Vergiftungssymptome in Form einer Vagusüber-tonisierung auf.

Die Substrate der Diamin-oxydase lassen sich in zwei Gruppen einteilen, in solche, die bei Überschreiten einer bestimmten Konzen-

<sup>1)</sup> E. A. Zeller und B. Schür, Schweiz. med. Wschr. 68, 1318 (1938).

tration ihre Oxydation verzögern (Histamin, Spermin und ev. Spermidin, vgl. Tabelle 3 der 3. Mitteilung) und in solche, deren Abbau-geschwindigkeit nach Erreichen eines Maximums bei weiterer Steigerung der Konzentration konstant bleibt (Putrescin, Cadaverin). Diese Zweiteilung der Substrate findet sich ebenfalls bei der Xanthin-oxydase<sup>1)</sup>. Die Kenntnis des Vorhandenseins einer optimalen Substratkonzentration ist nicht nur aus methodischen Gründen wichtig, sondern sie lässt an die Möglichkeit denken, dass diese Eigenschaft der Diamin-oxydase bei Hemmungsmechanismen eine Rolle spiele. So könnte beispielsweise das Aneurin das Enzym so weit blockieren, dass die Histaminkonzentration gegenüber dem frei gebliebenen Teil über-optimal wird, sodass zur Aneurinhemmung noch die Histamin-hemmung tritt. Auf Grund dieser Überlegungen ist die  $k_M$  des Aneurins (Tabelle 3) geschätzt worden.

Es wurde aus früheren Versuchen erschlossen, dass die Affinität zur Diamin-oxydase bei Putrescin, Cadaverin und Histamin in der angegebenen Reihenfolge zunimmt. Die Bestimmung der *Michaelis*-Konstante hat diese und damit gleichzeitig auch jene Annahme bestätigt, dass die Guanidinderivate und die Carbonylreagentien in der Weise wirken, dass sie mit den Substraten um das Ferment konkurrieren. Die Behauptung, dass es sich bei der Reaktion der Blausäure auf die Diamin-oxydase um einen neuen Cyanidhemmungsmechanismus handle, in dem Blausäure in gleicher Weise wie Semicarbazid, Bisulfit oder Dimedon das Ferment beeinflusse, wird durch die angegebenen Befunde ebenfalls unterstützt. *Werle* und *Heitzer*<sup>2)</sup> haben die Versuche mit den Carbonylreagentien mit gleichem Erfolg und mit gleicher Schlussfolgerung bezüglich der Blausäurewirkung auf die Histidin-carboxylase übertragen.

Die enzymatische Zerlegung von Triaminen mit zwei ungleich langen Methylenketten stellt ein Analogon zu dem gut untersuchten Beispiel der Spaltung optisch aktiver Ester durch die Schweineleber-esterase dar<sup>3)</sup>. Diese besitzt eine grössere Affinität zum *d*- als zum *l*-Mandelsäure-ester, während umgekehrt die *l*-Ester-Fermentverbindung rascher als die entsprechende *d*-Verbindung hydrolysiert wird. Nur spielt sich der Prozess an unserm Beispiel nicht an zwei, sondern an ein und demselben Substrat ab. Die Diamin-oxydase hat zur Dreierkette eine grössere Affinität als zur Vierer- und Fünferkette, während diejenigen Ferment-Substratkomplexe rascher (in Ammoniak und Aldehyd) zerfallen, die mit der längern Kette, als die mit der kürzern gebildet worden sind.

<sup>1)</sup> *M. Dixon*, *Enzymologia* **5**, 198 (1938).

<sup>2)</sup> *E. Werle* und *K. Heitzer*, *Biochem. Z.* **299**, 420 (1938).

<sup>3)</sup> Zusammenfassung bei *R. Ammon*, *Ergeb. Physiol.* **37**, 366 (1935).

Unsere Resultate stehen im Widerspruch mit einer Angabe von P. Szendrö<sup>1)</sup>. Dieser Autor hatte gezeigt, dass bei der Bestrahlung von Histidin mit Ultraviolett Imidazol-acetaldehyd entsteht. Dieser Aldehyd soll nun in gleicher Weise wie Histamin auf den Meerschweinchendarm wirken. Wir aber haben eben gezeigt, dass schon das erste Zwischenprodukt des enzymatischen Histaminabbaues, das wohl mit Sicherheit eben Imidazol-acetaldehyd ist, vollständig inaktiv ist.

#### Zusammenfassung.

1. Aneurin hemmt innerhalb eines bestimmten Bereiches proportional seiner Konzentration die Diamin-oxydase. Seine Affinität zu dieser ist grösser als die des Histamins. In der Niere der B<sub>1</sub>-avitaminotischen Ratte ist im Gegensatz zu der der normalen Tiere Diamin-oxydase nachweisbar.

2. Sämtliche Triamine mit den Methylenketten mit drei bis fünf C-Atomen werden von der Diamin-oxydase oxydativ desaminiert. Aus dem Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten kann eine Beziehung zwischen Länge der Methylenkette und ihrer Affinität zum Enzym aufgestellt werden.

3. Der Sauerstoffverbrauch der Diamin-Diamin-oxydase-Reaktion entspricht in den ersten Minuten dem einer monomolekularen Reaktion.

4. Aus den Aktivitäts-p<sub>s</sub>-Kurven für Histamin, Putrescin und Cadaverin lassen sich die entsprechenden *Michaelis*-Konstanten ermitteln. Die Zahlen stehen in völliger Übereinstimmung mit den aus andern Versuchen erschlossenen Affinitätsverhältnissen dieser Substrate.

5. Die biologische Inaktivierung des Histamins ist nach Ablösung einer Molekel Ammoniak, die mit Verbrauch eines Atoms Sauerstoff verknüpft ist, erreicht.

6. In der Menschenplacenta befindet sich ein beträchtlich hoher Gehalt an Diamin-oxydase.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.

---

<sup>1)</sup> P. Szendrö, *Pflüger's Arch. ges. Physiol.* **228**, 742 (1931).