

## 104. Über den enzymatischen Abbau von Histamin und Diaminen

2. Mitteilung

von E. Albert Zeller.

(3. VI. 38.)

*Eldbacher* und *Zeller* teilten in der ersten Publikation dieser Untersuchungsreihe<sup>1)</sup> mit, dass sie als enzymatisches Abbauprodukt des Histamins eine Carbonylverbindung von der Formel  $C_4H_7N_2O_4$  als schön krystallisierendes Dinitrophenyl-hydrason aufgefunden hatten. Unter der Annahme, dass der Übergang vom Histamin in diesen Körper, dem noch zwei Molekel Krystallwasser entzogen werden konnten, in mehreren Stufen erfolge, wurde versucht, die Teilprozesse zu erfassen. Die vorliegende Mitteilung befasst sich hauptsächlich und eingehend mit der ersten Reaktionsstufe. Wegen der Wichtigkeit der Frage der Spezifität der Histaminase für pharmakologische Probleme wurde sie von einer neuen Seite her angegangen. Schliesslich sollten einige in der Literatur bestehende Widersprüche aufgeklärt werden, um eine feste Grundlage für die weitere Erforschung der Histaminase zu bekommen.

### Methodik.

Als Ausgangsprodukt für die Herstellung der Enzympräparate wurde das in der ersten Mitteilung beschriebene Aceton-Trockenpulver aus Schweinenieren verwendet. Das Pulver wurde entweder zuerst mit der zehnfachen Menge destillierten Wassers eine Viertelstunde bei  $38^{\circ}$  vorextrahiert, dann mit 2,5-proz. Kochsalzlösung eine halbe Stunde gerührt, um zu erreichen, dass der Ammoniakgehalt und die Eigenatmung möglichst gering wurden. Später wurde das Nierenpulver mit der zwanzigfachen Menge 1-proz. Kochsalzlösung zwanzig Minuten lang behandelt, dann in Cellophanschläuchen gegen Wasser dialysiert. Nach zwei Tagen trat in der Lösung eine geringe Fällung auf, die abzentrifugiert wurde. Wenn gegen m/15 Phosphatpuffer dialysiert wurde, blieben die Lösungen vollkommen klar. Besonders der Gehalt an Ammoniumionen konnte auf diese Weise leicht bis fast auf Null reduziert werden, während die Substrate der Eigenatmung nur sehr langsam nach einer Woche völlig wegdialysiert waren.

<sup>1)</sup> *Helv.* **20**, 717 (1937). In jener Mitteilung ist in der Tabelle auf S. 718 die Kolonne für Nierenmark irrtümlicherweise ausgelassen worden. Es wurde keine Histaminase im Nierenmark von Ratte, Meerschweinchen, Katze und Schwein gefunden. Die Reaktion ist aber in der Niere von Huhn positiv, und nicht, wie angegeben, negativ. In der Nierenrinde von Ratte ist sie ebenfalls negativ, positiv aber in der Rinde von Meerschweinchen, Rind, Katze und Schwein.

Für die Bestimmung des Ammoniaks benutzte ich die Dampfdestillation im Vakuum nach *Parnas*<sup>1)</sup> unter Nesslerisierung des Destillats und Messung der Extinktion im Stufenphotometer mit 150 mm-Mikro-Cuvetten. Mit Hilfe dieser Methode und der dialysierten Extrakte war es möglich, schon nach 15 Minuten die Bildung von Ammoniak nachzuweisen. Für die Destillation cyanidhaltiger Lösungen wurde nach *Krebs*<sup>2)</sup> an Stelle des Boratpuffers vom  $p_H$  9,3 2-n. NaOH verwendet.

Die Beobachtung des Sauerstoffverbrauchs geschah mit offenen *Warburg*-Manometern mit kegelförmigen Gefässen. Im Einsatz befand sich n. NaOH und ein Streifen Filtrierpapier. Beim Arbeiten mit Kaliumcyanid wurden die von *Krebs*<sup>2)</sup> angegebenen Kaliumcyanid-Natriumhydroxyd-Mischungen gebraucht.

Alle Extrakte wurden unter Toluol aufbewahrt. Da die Ansätze meistens viele Stunden dauerten, wurde regelmässig Toluol zugegeben. Die Bebrütung fand ausschliesslich bei 38° statt. Durch Octylalkohol wurde die Schaumbildung beim Durchleiten von Sauerstoff oder Luft und gleichzeitig etwaige Ammoniakbildung und Sauerstoffzehrung durch Aminoxydasen verhindert. In spätern *Warburg*-Ansätzen liess ich das Toluol wegen seiner denaturierenden Wirkung weg und ersetzte es durch Octylalkohol. Durch diese Vorkehrungen sind bakterielle Infektionen ausgeschlossen. Überdies können sie leicht erkannt werden durch das Auftreten hoher Ammoniakleerwerte.

#### Die Spezifität der Histaminase<sup>3)</sup>.

Alle Autoren, die sich bisher mit der Histaminase beschäftigt hatten, betonten deren absolute Spezifität. Weder Tyramin<sup>4)</sup> noch die Imidazole Imidazol-aldehyd, Imidazol-milchsäure, Imidazol-propionsäure und Histidin<sup>5)</sup>, noch endlich Tryptamin<sup>6)</sup> werden abgebaut. Diese Eigenschaft der Histaminase wurde schon mehrfach in der Pharmakologie zur Identifizierung chemisch nicht fassbarer histaminähnlich wirkender Substanzen mitbenutzt. So schrieben *Anrep*, *Barsoum* und *Talaat*<sup>7)</sup>:

“The specificity of histaminase is an important piece of evidence in favour of the substance being histamine itself and not some other closely related amine.”

Ich konnte die bisher vorliegenden Befunde bestätigen und fand, dass bei den Bedingungen, unter denen Histamin kräftig desaminiert wird, die folgenden Amine: Amylamin, Tyramin, Tryptamin, Adren-

<sup>1)</sup> *Bioch. Z.* **274**, 158 (1934).

<sup>2)</sup> *Biochem. J.* **29**, 1620 (1935).

<sup>3)</sup> *E. A. Zeller*, *Naturwiss.* **26**, 282 (1938).

<sup>4)</sup> *C. H. Best*, *E. W. McHenry*, *J. Physiol.* **70**, 349 (1930).

<sup>5)</sup> *E. Gebauer-Fuelnegg*, *H. L. Alt*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **29**, 531 (1932).

<sup>6)</sup> *E. Werle*, *G. Mennicken*, *Bioch. Z.* **296**, 99 (1933).

<sup>7)</sup> *G. V. Anrep*, *G. S. Barsoum*, *M. Talaat*, *J. Physiol.* **86**, 431 (1936).

alin, Phenyl-oxy-äthylamin und Ephedrin weder Ammoniak liefern noch Sauerstoff verbrauchen. Im Konkurrenzversuch mit Histamin hemmen sie den Abbau desselben nicht, womit auch die Bildung nicht zerfallender Ferment-Substratkomplexe ausgeschlossen wird. Setzte man jedoch zu einem aktiven Präparat Putrescin, Cadaverin oder Agmatin zu, so traten starker Sauerstoffverbrauch und Ammoniakbildung auf, ebenso beim Äthylen-diamin, wenn auch in wesentlich geringerem Masse. Als Beispiel ist ein Versuch in der Tabelle 1 zusammengefasst. Die Amine wurden einesteils zu dialysiertem Extrakt + Phosphatpuffer  $p_H$  6,8, andernteils zu Puffer allein zugesetzt. Die Menge des freigemachten Ammoniaks ist in  $\gamma$  Stickstoff angegeben.

**Tabelle 1.**

Extrakt 2,5 cm<sup>3</sup>, Puffer 2,4 cm<sup>3</sup>, Amine neutralisiert, 0,1 cm<sup>3</sup> einer 0,1-m. Lösung.

	N $\gamma$
Puffer+ Extrakt . . . . .	8
Puffer+ Histamin-dichlorhydrat . . . . .	8
Puffer+ Histamin-dichl.+ Extrakt . . . . .	110
Puffer+ Putrescin-dichl. . . . .	7
Puffer+ Putrescin-dichl.+ Extrakt . . . . .	115
Puffer+ Cadaverin-dichl. . . . .	11
Puffer+ Cadaverin-dichl.+ Extrakt . . . . .	130
Puffer+ Agmatin-sulfat . . . . .	30
Puffer+ Agmatin-sulfat+ Extrakt . . . . .	204

Man sieht, dass die Ammoniakbildung gegenüber den Kontrollen um das Mehrfache erhöht ist. In der zweiten Tabelle ist der Sauerstoffverbrauch verschiedener Amine unter ähnlichen Versuchsbedingungen wiedergegeben.

**Tabelle 2.**

Extrakt 2 cm<sup>3</sup>, Puffer  $p_H$  6,8 ad 3 cm<sup>3</sup>, Amine 0,03 cm<sup>3</sup> einer 0,1-m. Lösung.

	mm <sup>3</sup> O <sup>2</sup>
1. Extrakt . . . . .	0
Extrakt+ Histamin-dichl. . . . .	55
Extrakt+ Äthylendiamin-dichl. . . . .	35
2. Extrakt . . . . .	55
Extrakt+ Histamin-dichl. . . . .	71
Extrakt+ Cadaverin-dichl. . . . .	124
3. Extrakt . . . . .	39
Extrakt+ Agmatin-sulfat . . . . .	116

Um auszuschliessen, dass es sich um verschiedene Fermente handle, wurden Konkurrenzversuche ausgeführt, die in keinem einzigen Fall eine Summation der Ammoniakbildung ergaben. In der Tabelle 3 sind einige Zahlen angeführt. Die Versuchsbedingungen sind dieselben wie bei Tabelle 1. Da die Substratkonzentrationen zwischen den einzelnen Ansätzen verschieden sind, werden die Extinktionswerte, die der Konzentration proportional sind, angegeben. Man setzt zu einem Fermentpräparat das eine Diamin, zu einem zweiten das andere und zu einem dritten beide zusammen, stets in derselben molaren Konzentration. Die Ammoniakdestillation erfolgt mit einem aliquoten Teil. Die Zahlen stellen die Differenzen zwischen den gefundenen Werten und den sehr kleinen Leerwerten dar.

Tabelle 3.

Histamin . . . . .	59	Histamin . . . . .	99
Cadaverin . . . . .	123	Putrescin . . . . .	82
Hist. + Cadav. . . . .	54	Hist. + Putr. . . . .	90
Histamin . . . . .	85	Agmatin . . . . .	64
Agmatin . . . . .	107	Äthylendiamin. . . . .	6
Hist. + Agmat. . . . .	117	Agm. + Äthylendiam. . . . .	44

Die den angegebenen Diaminen entsprechenden Diaminocarbonsäuren Ornithin, Lysin, Arginin und Histidin wurden nicht desaminiert, *d,l*-Alanin und *d,l*-Valin wenig. Der Konkurrenzversuch zeigte, dass die *d*-Aminooxydase von *Krebs*<sup>1)</sup> von der „Histaminase“ verschieden ist. In der Tabelle 4 ist das freigewordene Ammoniak als Stickstoff berechnet angegeben.

Tabelle 4.

Nicht dialysierter Extrakt 2,5 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 6,8 ad 5 cm<sup>3</sup>, Substrate 0,1 cm<sup>3</sup> 0,1-m. Lösung. Dauer 16 Std.

	γ N	Differenz
Extrakt . . . . .	59	
Extrakt + Histamin . . . . .	171	112
Extrakt + <i>d,l</i> -Valin . . . . .	78	19
Extrakt + Hist. + <i>d,l</i> -Valin . . . . .	187	128

Die Versuche zeigen eindeutig, dass ein Enzym existiert, das verschiedene Diamine, und nur solche, oxydativ desaminiert. Für die Diamine Äthylendiamin, Putrescin, Cadaverin und Agmatin ist es somit zum ersten Male<sup>2)3)</sup> gelungen, sie mit Hilfe eines

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 217, 191 (1933).

<sup>2)</sup> H. Blaschko, D. Richter, H. Schlossmann, Biochem. J. 31, 2187 (1937).

<sup>3)</sup> F. Bernheim, M. L. C. Bernheim, J. Biol. Chem. 123, 317 (1938).

definierten Fermentpräparates abzubauen. *Richter*<sup>1)</sup>, *Blaschko, Richter* und *Schlossmann*<sup>2)</sup> und *Pugh* und *Quastel*<sup>3)</sup> zeigten vor kurzer Zeit, dass die Mono-amine Tyramin, Tryptamin, Amylamin, Adrenalin usw. durch ein und dasselbe Ferment, die (Mono-)Aminoxydase zerlegt werden. Ihr gegenüber lässt sich eine Diaminoxydase stellen, die auch eine ganze Gruppe von Körpern abbaut, die ihrerseits alle zwei ausgeprägt basische Gruppen als gemeinsame Eigenschaft besitzen.

#### Der Nachweis der Wasserstoffperoxydbildung.

Die Diaminoxydase reagiert mit dem Substrat nur bei Anwesenheit von Sauerstoff. Bei nah verwandten Enzymen wie bei der Tyraminase<sup>4)</sup>, Aminoxydase<sup>3)</sup> und *d*-Aminosäure-Oxydase<sup>5)</sup> werden Wasserstoffatome des Substrats aktiviert, so dass Wasserstoffperoxyd intermediär entsteht. Ich fahndete deshalb auch bei der Diaminoxydase danach. Das Abfangverfahren mit Cerhydroxyd nach *Wieland* und *Rosenfeld*<sup>6)</sup> führte zu keinem positiven Resultat, wohl deshalb, weil die Enzympräparate eine starke katalytische Wirksamkeit besaßen. Der Nachweis gelang dann mit Hilfe der üblichen Methode, zu den Ansätzen leicht oxydable Körper zu geben, und von den an diesen ausgeübten Oxydationswirkungen auf Peroxyde zu schliessen. Nach *Bernheim, Bernheim* und *Gillapsie*<sup>7)</sup> wird zugefügtes Hämoglobin in Methämoglobin umgewandelt. Diese Reaktion liess sich erfolgreich bei der Diaminoxydase anwenden. Setzte man zu dem Nierenextrakt Histamin und Hämoglobin (dreimal auf der Zentrifuge gewaschene und dann mit der dem ursprünglichen Blutvolumen entsprechenden Menge Wasser hämolytierten roten Blutkörperchen), so trat beim Durchleiten von Sauerstoff bald eine braune Farbe auf. Die typischen zwei starken Absorptionstreifen des Oxyhämoglobins verschwinden, und es tritt dafür der Methämoglobinstreifen bei 614 m $\mu$  auf. Dieser Vorgang findet auch mit Histamin allein, gelöst in Phosphatpuffer, statt, aber sehr viel später. Er ist offenbar in letztern Falle durch das bei der Autoxydation von Histamin entstehende Wasserstoffperoxyd bedingt, was man auch durch das Phenolphthalin-Reagens<sup>8)</sup> nachweisen kann, Ich versuchte, den Hämoglobintest zu einem quantitativen zu gestalten, indem ich die Umwandlung im Stufenphotometer verfolgte.

<sup>1)</sup> *D. Richter*, Biochem. J. **31**, 2022 (1937).

<sup>2)</sup> *H. Blaschko, D. Richter, H. Schlossmann*. Biochem. J. **31**, 2187 (1937).

<sup>3)</sup> *C. E. M. Pugh, J. H. Quastel*, Biochem. J. **31**, 2306 (1937).

<sup>4)</sup> *M. L. C. Hare*, Biochem. J. **22**, 968 (1928); *F. J. Philpot*, Biochem. J. **31**, 856 (1937); *H. J. Kohn*, Biochem. J. **31**, 1693 (1937).

<sup>5)</sup> *D. Keilin, E. F. Hartree*, Proc. Roy. Soc. [B] **119**, 114 (1936).

<sup>6)</sup> A. **477**, 32 (1930).

<sup>7)</sup> *J. biol. Chem.* **114**, 657—63 (1936).

<sup>8)</sup> *O. Schales*, B. **71**, 477 (1938).

Beim Filter mit dem Schwerpunkt 619  $m\mu$  nahm die Extinktion im Vergleich mit den Kontrollen zu und bei 572  $m\mu$  ab. Die angegebenen Filterschwerpunkte fallen ungefähr mit den Absorptionsmaxima von Methämoglobin (614  $m\mu$ ) resp. Hämoglobin (587  $m\mu$ ) zusammen. Die Extinktion ist deshalb ein Mass für das Entstehen und Verschwinden der betreffenden Farbstoffe. In der Tabelle 5 ist ein entsprechender Versuch zusammengestellt.

Tabelle 5.

Extrakt 5  $cm^3$ , Phosphatpuffer  $p_H$  6,8 ad 15  $cm^3$ , 1  $cm^3$   
 0,1-m. Histamin-dichlorhydrat, 2  $cm^3$  Hämoglobin,  
 Dauer  $\frac{1}{2}$  Stunde.

	Extinktion (Schichtdicke 0,5 cm)	
	Filter S 61 619 $m\mu$	Filter S 57 572 $m\mu$
Extrakt . . . . .	0,25	0,64
Puffer + Histamin-dichl. . . . .	0,23	0,64
Extrakt + Histamin-dichl. . . . .	0,37	0,61

In dem System Extrakt + Histamin + Hämoglobin findet sich also nach kurzer Zeit eine grössere Methämoglobin- und eine kleinere Oxyhämoglobinmenge als in den Kontrollen. Die Methode liess sich aber nicht zu einer quantitativen ausbauen, weil das Methämoglobin rasch weiter oxydiert wurde. Schliesslich bildet sich ein brauner Farbstoff, der im Sichtbaren eine bilirubinähnliche Absorption aufweist. *Haurowitz*<sup>1)</sup> und *Barkan* und *Schaes*<sup>2)</sup> hatten schon früher Hämoglobin in Bilirubinoide übergeführt.

*Keilin* und *Hartree*<sup>3)</sup> weisen fermentativ entstandenes Wasserstoffperoxyd durch Zusatz von Äthylalkohol und Katalase, sofern das System keine solche besitzt, nach. Für jede Molekel Wasserstoffperoxyd wird ein Atom Sauerstoff mehr gegenüber einem Ansatz ohne Alkohol verbraucht. Bei allen meinen Proben erhöhte Äthylalkohol ausnahmslos den Sauerstoffverbrauch, in vielen Fällen auf die doppelte Menge. Der Sauerstoffverbrauch ist wesentlich grösser als der, welcher der Bildung von nur einer Molekel Peroxyd entspricht. Das lässt darauf schliessen, dass nicht nur der erste Oxydationsschritt unter Bildung von Wasserstoffperoxyd vor sich geht, sondern zum Teil auch die folgenden. Eine gewisse Menge Sauerstoff wird dann noch für die Weiteroxydation des Acetaldehyds verwendet, da die für diesen typische Gelbfärbung des mit Lauge getränkten Absorptionspapiertes durch Polymerisationspro-

<sup>1)</sup> Enzymolog. 4, 139 (1937).

<sup>2)</sup> Z. physiol. Ch. 253, 83 (1938).

<sup>3)</sup> D. Keilin, E. F. Hartree, Proc. Roy. Soc. [B] 119, 141 (1936).

dukte fehlt. Es lässt sich leicht zeigen, dass diese verstärkte Oxydation nicht durch eine vermehrte Oxydation des zugesetzten Diamins bedingt ist. Die Menge des gebildeten Ammoniaks ist in den Ansätzen mit und ohne Alkohol stets dieselbe. Diese Verhältnisse sind in der Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6.**  
Gleiche Versuchsanordnung wie in Tabelle 2.

Substrat	Mol $\times 10^{-6}$	O <sub>2</sub> -Verbrauch		NH <sub>3</sub> -Bildung	
		ohne Alkohol	mit Alkohol	ohne Alkohol	mit Alkohol
Histamin-dichl. . . . .	10	151 mm <sup>3</sup>	290 mm <sup>3</sup>	69 $\gamma$ N	75 $\gamma$ N
Agmatin-sulf. . . . .	6	97	256	83	84
Cadaverin-dichl. . . . .	3	113	161	51	53

### Die Bildung von Ammoniak.

McHenry und Gavin<sup>1)</sup> zeigten, dass pro Molekel Histamin eine Molekel Ammoniak gebildet wird. Sie stellten weiterhin fest, dass die Ammoniakbildung im Verlauf der ersten Stunden nur sehr gering ist, um dann scharf anzusteigen. Diese Eigentümlichkeit konnte auch ich beobachten. Je grösser die Substratmenge war, desto länger war die Inkubationsperiode. Gewöhnlich war sogar ein Absinken des Ammoniaks in der ersten Stunde zu finden. Gründlich ausdialysierte Extrakte aber verhalten sich völlig anders. Bei ihnen nimmt die Ammoniakproduktion von Anfang an stetig zu.

Die Substratkonzentration beeinflusst sehr deutlich die Bildungsgeschwindigkeit von Ammoniak. Sie nimmt beispielsweise beim Histamin von der Konzentration 0,0001-m. bis 0,0005-m. zu, um dann bei höheren Konzentrationen als 0,001 m. wieder abzunehmen. Es besteht also, wie etwa bei der Xanthinoxydase<sup>2)</sup>, ein Substratoptimum, dessen Kenntnis wichtig ist, wenn es sich um den Vergleich der Enzymaktivitäten verschiedener Organe oder Tiere handelt. Für die andern Diamine gelten ähnliche Verhältnisse, doch sollen diese in einer folgenden Arbeit über den exakten Vergleich über den Abbaumechanismus aller geeigneten Substrate dargestellt werden.

### Die Aufnahme von Sauerstoff.

Wie bei der Ammoniakbildung findet sich ein Unterschied zwischen nicht oder nur teilweise und dem völlig ausdialysierten Extrakt. Im letztern Fall nimmt das System Extrakt + Puffer praktisch keinen Sauerstoff auf. Nach Zusatz eines Diamins beginnt

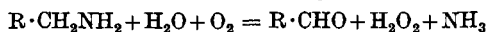
<sup>1)</sup> E. W. McHenry, G. Gavin, Biochem. J. **26**, 1365 (1932).

<sup>2)</sup> V. H. Booth, Biochem. J. **20**, 1731 (1935).

dann sofort der Sauerstoffverbrauch, der solange geradlinig verläuft, bis ungefähr pro Molekel Substrat zwei Sauerstoffatome gebunden sind; dann nimmt er einen flacheren Verlauf. Bei den Präparaten, die eine Eigenatmung aufweisen, kommt es nach Substratbeifügung zu einer Hemmung oder Förderung der Leeratmung. Beim Agmatin-sulfat beispielsweise war bei der Konzentration 0,00033-m. eine deutliche Hemmung und bei der Konzentration 0,001-m—0,033-m. eine Steigerung zu konstatieren. Als eine mögliche Erklärung dieser Tatsachen liesse sich denken, dass die Affinität des Systems Diaminoxydase/Diamin zum Sauerstoff, der vielleicht über ein Eisensystem aktiviert wird, grösser ist als die der in dem Extrakt vorkommenden Atmungssysteme. Demnach darf man nicht ohne weiteres den Sauerstoffverbrauch des Fermentes ohne Substrat von dem des Fermentes mit Substrat subtrahieren, da man ja dadurch unter Umständen zu negativen Werten gelangt. *Pugh* und *Quastel*<sup>1)</sup> fanden beim Arbeiten mit Hirngewebe eine spezifische Hemmung der Atmung desselben durch Monoamine, erklärten aber den Unterschied gegenüber den ähnlichen Versuchen anderer Autoren (*Philpot*)<sup>2)</sup>, die eine Steigerung fanden, dadurch, dass sie eine geringere Phosphatpufferkonzentration anwandten, bei der die für die Reaktion vielleicht nötigen Calciumionen noch nicht entionisiert würden.

Da in der vorliegenden Mitteilung nur die erste Oxydationsstufe behandelt werden soll, begnüge ich mich mit einem kurzen Hinweis auf den weitem Verlauf der Oxydation. Es wurde eben erwähnt, dass die Geschwindigkeit der Sauerstoffaufnahme nach dem Verbrauch von zwei Sauerstoffatomen abnimmt. Man findet deshalb meistens Werte, die zwischen 2 und 3 liegen.

Durch gleichzeitige Messung von Ammoniakproduktion und Sauerstoffverbrauch wurde bestimmt, wieviel Sauerstoff für die Bildung einer Molekel Ammoniak nötig ist. Nun ist es so, dass nicht alle Substratmolekel zuerst desaminiert werden, und dann die Weiteroxydation einsetzt, sondern die zuerst desaminierten Teilchen werden schon weiter oxydiert, wenn noch unveränderte Substratmolekel vorhanden sind. Man kommt deshalb je nach Versuchsdauer und Substratkonzentration zu verschiedenen Werten des Verhältnisses Sauerstoff zu Ammoniak; entscheidend sind aber nur die kleinsten, und diese nähern sich mit zunehmender Substratkonzentration immer mehr dem Werte 1, d. h. es wird ein Atom Sauerstoff zur Bildung einer Molekel Ammoniak benötigt. Dasselbe Verhältnis von Sauerstoff zu Ammoniak findet man bei der *d*-Aminosäure-Oxydase<sup>3)</sup>. Die erste Reaktionsstufe lässt sich folgendermassen formulieren:



<sup>1)</sup> *C. E. M. Pugh, J. H. Quastel, Biochem. J. 31, 2306 (1937).*

<sup>2)</sup> *F. J. Philpot, Biochem. J. 31, 856 (1937).*

<sup>3)</sup> *Z. physiol. Ch. 217, 191 (1933).*



Das ist dieselbe Gleichung, die *Kohn*<sup>1)</sup> für die Tyraminase aufgestellt hatte. Da dieser Mechanismus für alle Diamine ausser dem Äthylendiamin, dessen Untersuchung noch nicht zu Ende geführt ist, gilt, lässt sich daraus schliessen, dass diese erste Reaktionsstufe beim Histamin die Seitenkette betrifft, was mit den Ergebnissen von *McHenry* und *Gavin*<sup>2)</sup> übereinstimmt. Diese Autoren fanden, dass die Menge der nach *van Slyke* bestimmbaren freien Aminogruppen parallel der Inaktivierung des Histamins abnahm.

Der Einfluss von Hemmungssubstanzen.

In dem Abschnitt über den Nachweis von Wasserstoffperoxyd wurde darauf hingewiesen, dass mindestens zwei Teilfermente der Diaminoxidase Dehydrasen seien. Es war daher von Interesse, das Verhalten gegenüber dem typischen Dehydrasegift Urethan kennen zu lernen. Urethan aber hemmte die Ammoniakproduktion erst bei so hoher Konzentration, dass auch das sonst völlig unwirksame Natriumchlorid bei derselben Konzentration die Ammoniakmenge verringerte. Die Wirkung des Urethans beruht also, wie etwa bei der *Uricase*<sup>3)</sup>, nur auf einem Salzeffekt. In der Tabelle 7 sind einige diesbezügliche Werte zusammengestellt.

Tabelle 7.

Extrakt 2,5 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer p<sub>H</sub> 6,8 ad 5 cm<sup>3</sup>, 5 × 10<sup>-6</sup> Mol Histamin-dichlorhydrat, Dauer 5 Stunden.

	Konzentration	γN
Extrakt allein . . . . .		20
Extrakt + Histamin-dichl. . . . .		109
Extrakt + Histamin-dichl. + Urethan . . . . .	0,8 m	68
Extrakt + Histamin-dichl. + Urethan . . . . .	0,4 m	100
Extrakt + Urethan . . . . .	0,8 m	20
Extrakt + Histamin-dichl. + NaCl. . . . .	0,8 m	73
Extrakt + Histamin-dichl. + NaCl. . . . .	0,4 m	121
Extrakt + NaCl . . . . .	0,8 m	20

Die Zahlen für Urethan und Kochsalz stimmen ordentlich genau miteinander überein.

Einen ungleich viel stärkeren Einfluss findet man beim Hydroxylamin-chlorhydrat, das bei einer Konzentration von 0,01-m. sowohl die Sauerstoffaufnahme als auch die Ammoniakbildung völlig

<sup>1)</sup> *H. J. Kohn*, *Biochem. J.* **31**, 1693 (1937).

<sup>2)</sup> *Biochem. J.* **29**, 622 (1935).

<sup>3)</sup> *D. Keilin, E. F. Hartree*, *Proc. Roy. Soc. [B]* **119**, 114 (1936).

hemmt, bei 0,001-m. teilweise. In der Tabelle 8 seien ein paar Belege dafür zusammengestellt.

**Tabelle 8.**  
Gleiche Versuchsbedingungen wie Tabelle 7.

	$\gamma N$
Extrakt allein . . . . .	8
Extrakt+ Histamin-dichl. . . . .	38
Extrakt+ Histamin-dichl. + $NH_2OH \cdot HCl$ 0,001-m. . . . .	42
Extrakt+ Histamin-dichl. + $NH_2OH \cdot HCl$ 0,01-m. . . . .	11
Extrakt+ $NH_2OH \cdot HCl$ 0,01-m. . . . .	12

In der folgenden Tabelle wird auch der Einfluss auf den Sauerstoffverbrauch gezeigt.

**Tabelle 9.**  
Extrakt 2 cm<sup>3</sup>, Phosphatpuffer  $p_H$  6,8 ad 3 cm<sup>3</sup>, Cadaverin-dichlorhydrat  $3 \times 10^{-6}$  Mol.

	$\gamma N$	mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub>
Extrakt allein . . . . .	11	88
Extrakt+ Cadaverin-dichl. . . . .	62	113
Extrakt+ Cadaverin-dichl. + $NH_2OH \cdot HCl$ 0,01-m. . . . .	30	61
Extrakt+ $NH_2OH \cdot HCl$ 0,01-m. . . . .	23	65

Der Einfluss von Cyaniden auf die Diaminoxydase ist von sehr komplexer Art. Einerseits wurde eine vollständige Hemmung der Histamin-Histaminasereaktion durch Kaliumcyanid beobachtet<sup>1)</sup>, andererseits nur eine geringfügige Verzögerung derselben<sup>2)</sup>. In meinen Versuchen reagierte die Diaminoxydase sehr verschieden, je nachdem wie das Fermentpräparat hergestellt und wie lange es dialysiert wurde. Von wesentlicher Bedeutung ist das  $p_H$  der Versuchslösung. Bei einer 0,0004-m. KCN-Lösung zeigte sich bei einem  $p_H$  von 6,4 keine Hemmung, dafür eine gleichmässig zunehmende Verminderung der Ammoniakbildung beim Übergang in das stärker saure und in das alkalische Gebiet. Länger dialysierte Extrakte ohne Eigenatmung sind empfindlicher gegenüber Cyaniden als solche, die eine Eigenatmung aufweisen. Es wäre denkbar, dass die Blausäure durch Carbonylverbindungen inaktiviert wird. Es ist bekannt, dass Cyanide durch einfachen Zusatz von Brenztraubensäure durch Übergang in das Cyanhydrin derselben ihre hemmende Wirkung auf enzymatische Prozesse verlieren<sup>3)</sup>.

<sup>1)</sup> E. W. McHenry, G. Gavin, Biochem. J. 26, 1365 (1932).  
<sup>2)</sup> E. Gebauer-Fuelnegg, H. L. Alt, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 29, 531 (1932).  
<sup>3)</sup> D. E. Green, St. Williamson, Biochem. J. 31, 617 (1937).

Wenn man also in verschiedenen Versuchen findet, dass 0,001-m. und 0,01-m. KCN die Sauerstoffaufnahme nicht völlig hindert, so ist diese doch stets stark vermindert gegenüber einem normalen Ansatz. In einigen Proben war das Verhältnis Sauerstoff/Substrat fast genau gleich 1, eine Feststellung, die wiederum an die Tyraminase erinnert. Die Befunde von *Gebauer* und *Alt*<sup>1)</sup>, die durch relativ hohe Cyanidkonzentrationen nur eine Verzögerung der Histamin-Histaminasereaktion eintreten sahen, erklären sich wohl folgendermassen: Wenn ich in meinen Versuchen zur Absorption des Kohlendioxyds reine Lauge benutzte, konnte ich dieselbe Erfahrung wie die Autoren machen. Gab ich aber in den Einsatz des Atmungsgefässes die von *Krebs* angegebenen Lauge/Cyanidmischungen, so wurde nur ein Atom oder gar kein Sauerstoff verbraucht. Die Blausäure wird durch die Lauge ziemlich rasch absorbiert, sodass die Reaktion, wenn die Hemmung keine irreversible war, mit einiger Verzögerung doch noch stattfindet. Die Hemmung der Diaminoxydase durch Cyanide ist somit reversibel. Durch das gleiche Verfahren wurde festgestellt, dass die in einem frühern Abschnitt beschriebene sekundäre Oxydation von Äthylalkohol durch Blausäure ebenfalls reversibel gehemmt wird.

#### Zusammenfassung.

1. Es wird gezeigt, dass die von *Best* entdeckte Histaminase ausser Histamin auch die Diamine Äthylendiamin, Putrescin, Cadaverin und Agmatin oxydativ desaminiert. Es wird deshalb für sie der Name Diaminoxydase vorgeschlagen. Sie lässt sich mit Sicherheit von der (Mono-)Aminoxydase und der *d*-Aminosäure-oxydase abgrenzen.

2. Die erste Reaktionsphase besteht in der Aufnahme von je einer Molekel Wasser und Sauerstoff, und in der Bildung von je einer Molekel Ammoniak und Wasserstoffperoxyd. Im ganzen werden mindestens drei Atome Sauerstoff verbraucht.

3. Es wird der Einfluss von Urethan, Hydroxylamin und Kaliumcyanid auf die Diaminoxydasereaktion untersucht.

Ich danke Herrn Prof. Dr. *S. Edlbacher* bestens für die Überlassung des Arbeitsgebietes.

Physiologisch-Chemische Anstalt der  
Universität Basel.

---

<sup>1)</sup> *E. Gebauer-Fuelnegg, H. L. Alt, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **29**, 531 (1932).