

HISTAMIN UND HISTIDINDECARBOXYLASEN IN SCHILDDRÜSE UND THYMUS

E. WERLE und W. LORENZ

Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen
Klinik der Universität München
(Vorstand: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

(Received 7 February 1966; accepted 15 February 1966)

Summary—In the thyroid glands of dog, cattle and pig on the average 4.6; 17.1 and 20.9 μg histamine/g fresh weight were detected; in thymus of rat and cattle 8.8 and 8.5 μg respectively and by the behaviour against 1, α -methyl dopa and α -methylhistidine were found. There was no evidence for a relationship between histamine concentration and basal metabolic rate. In the thyroid glands of dog, cattle and pig, two fairly active histidine decarboxylases (HDC) were detected, characterized by pH optima at 7.0 and 8.0. In the thymus of rat and cattle histidine was also decarboxylated at pH 7.0 and 8.0. In crude homogenates of pig thyroid glands pyridoxal phosphate $1.25\text{--}3.75 \times 10^{-5}$ M activates the specific HDC, but inhibits, depending on substrate concentration, the unspecific HDC. In presence of phosphate buffer (0.1 M) the specific enzyme shows a higher activity than in presence of TRA or TRIS buffer. The activity of the unspecific enzyme is not changed. For the specific HDC 0.2 M phosphate buffer is optimal, for the unspecific HDC 0.4 M. Within certain limits the two enzymes show opposite behaviour regarding the influence of ion strength. Separation of the two enzymes was achieved by chromatography on Sephadex G 75 and G 100. The unspecific HDC has a greater molecular weight than the specific HDC; they are two enzymes, not merely two different centres of activity on one protein molecule. Homogenates of pig and dog thyroid glands at pH 8.0 decarboxylated dopa to dopamine. In dog a formation of 2.5 mg/g fresh weight/3 hr was demonstrated. The localization of histamine in the thyroid gland, the influence of thyroid hormones on turnover and action of histamine, serotonin and catecholamines, the action of pyridoxal phosphate and the physiological function of histamine of the upper gestional tract are described.

IM OBEREN Verdauungstrakt konnte Histamin in grösseren Mengen nachgewiesen werden, so in Zunge und Oesophagus des Hundes,¹ im Zahnfleisch des Menschen,² in Speicheldrüsen und Magen vom Menschen und vielen Säugetieren.^{3, 4, 5} Seine Bildung durch Histidindecarboxylasen^{3, 5, 6} und seine mögliche physiologische Bedeutung in Speicheldrüsen und Magen^{4, 8} wurden untersucht bzw. diskutiert.⁷ Auch die Adenohypophyse, die sich vom Dach der Mundhöhle herleitet, enthält bemerkenswert viel Histamin.^{9, 10} Da aus dem embryonalen Kopfdarm hypobranchial die Schilddrüse, branchogen Thymus, Epithelkörperchen und Ultimobranchialkörper entstehen,¹¹ waren auch in diesen Organen Histamin und Histidindecarboxylasen zu erwarten.

METHODIK

Schilddrüsen und Thymi frisch geschlachteter Rinder und Schweine, pernoctontäubter Bastardhunde sowie äthernarkotisierter Ratten und Meerschweinchen wurden sofort nach Entnahme bei -20° eingefroren und im Verlauf einer Woche

verarbeitet. Bei Hund und Rind wurde sorgfältig nach inneren Epithelkörperchen,³² beim Thymus der Ratte nach Schilddrüsengewebe¹² gesucht.

Als Enzymlösungen dienten Rohhomogenate 1: 6 mit 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,45, (bei Thymus, Ratten- und Meerschweinchen schilddrüsen 1: 3 mit aqua dest.), und Extrakte, die auf folgende Weise gewonnen wurden: Homogenisieren gefrorener Organe 1: 2 oder 1: 3 in 0,9 % NaCl; kurzes Zentrifugieren bei 1800 g, Überstand 3 Std. gegen fließendes Wasser von 5° dialysieren ("Dial-Extrakt") und 30 min bei 0° und 30,000 g zentrifugieren ("UZ-Extrakt"). 10 ml Überstand wurden auf eine Säule von Sephadex G 75 bzw. G 100 (2,5 × 50) aufgetragen, mit 0,9 % NaCl entwickelt und 10–15 min Fraktionen (5,5–6 ml) für jeweils drei Ansätze (Nullwert; Hauptwert bei pH 7,0 und 8,0) bei 0° aufgefangen [Säulenfraktionen].

Reagentien

Histamindihydrochlorid und 1—Histidin Hoffmann—La Roche, Pyridoxalphosphat Hoffman—La Roche und Fluka AG, Antistin Ciba AG, Aminoguanidinsulfat Fa. Schuchardt, Achromycin in Reinsubstanz Fa Lederle, München, α -Methyl dopa und α -Methylhistidin Merck, Sharp & Dohme, West Point, *o*-Phtaldialdehyd Fluka AG, TRIS- und TRA-Puffer C.F. Boehringer & Soehne, Mannheim, Dopamin Fluka AG, Dopa und Iproniazid (Marsilid) Hoffman—La Roche.

Ansätze. Zur Bestimmung der Histidindecaboxylase—Aktivität (EC 4.1.1.22) wurden, wenn nicht anders angegeben, in der Warburgapparatur folgende Ansätze bei 37° inkubiert.

Im *Hauptgefäß* 2,0 ml Rohhomogenat (entsprechend 0,35 g Frischgewebe), 0,1 ml Aminoguanidin (Endkonzentration 5×10^{-4} M), 0,1 ml Tetracyclin (20 μ g/ml Ansatz), 0,3 ml 0,2 M Phosphatpuffer, 1 Tropfen Benzol (20 mg; nur beim unspezifischen Enzym).

Im *Kipper* 0,5 ml 1—Histidin (Endkonzentration 10^{-2} M).

Die Zusätze wurden in 0,05 M Phosphatpuffer pH 7,45, α -Methyl dopa und α -Methylhistidin in 0,2 M Phosphatpuffer gelöst. Einstellung der pH-Werte mit 1 N HCl oder NaOH, Endvolumen 3,0 ml, Pufferendkonzentration 0,06 M. Die Ansätze wurden 10 min bis zur Substratzugabe mit durch Pyrogallol gereinigtem N₂ begast. Nach 3 Std. wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5 ml 3N Perchlorsäure gestoppt und das neugebildete Histamin bestimmt. Nullwert: Histaminmenge in Ansätzen mit säureinaktiviertem Enzym plus Substrat; Leerwert: Histaminmenge in Ansätzen mit aktivem Enzym ohne Substratzusatz; Hauptwert; Histaminmenge in Ansätzen mit Enzym plus Substrat. Die Angaben beziehen sich jeweils auf 1 g Frischgewebe. Der Histamingehalt der Organe wurde aus Nullwerten mit und ohne Substrat ermittelt, um die Reinheit es verwendeten Histidins zu prüfen. Nullwerte mit und ohne Inkubation wurden verglichen, um eine etwaige nicht enzymatische Histaminbildung oder -zerstörung zu erfassen.

In Versuchen zur Ermittlung der günstigsten Pufferverhältnisse und in Ansätzen mit Rinder-, Ratten- und Meerschweinchenthymus sowie Ratten- und Meerschweinchenschilddrüsen, ferner bei Dial- und UZ-Extrakten wurden 0,8 ml Enzymlösung verwendet. Puffervolumen 1,5 ml; alle Zusätze in aqua dest. gelöst. Für Ansätze mit Säulen-Fraktionen wurden 1,5 ml Durchlauf und 0,7 ml Puffer verwendet, Zusätze waren in 0,9 % NaCl gelöst.

Nach Enteiweissen der Ansätze mit Perchlorsäure wurde Histamin nach Shore *et al.* in der Modifikation nach Burkhalter¹⁵ extrahiert und im Spektrofluorimeter als Kondensat mit *o*-Phthaldialdehyd gemessen. Anregung bei 360 m μ , Fluoreszenz bei 450 m μ . Die Strahlungsintensität ist im Bereich von 0,005–0,5 μ g/ml 0,1 N-HCl der eingesetzten Histaminmenge proportional. In jeder Versuchsreihe von 6 Ansätzen wurden einer Probe zur Ausbeutebestimmung 5 μ g Histamin zugesetzt. Sie betrug $64 \pm 3,4$ %. Die fluorimetrischen Messergebnisse stimmten mit gelegentlich durchgeführten Histaminbestimmungen am isolierten Meerschweinchenileum überein. Die dem Histamin zugeschriebene Aktivität wurde jeweils durch 1 μ g Antistin pro 12 ml Badflüssigkeit vollständig gehemmt.

Als Mass für die Ionenstärke bei verschiedenen Pufferkonzentrationen und verschiedenem pH-Wert wurde die Leitfähigkeit mit einem WTW-Leitfähigkeitsmesser Typ LBR bestimmt. Die Zellenkonstante (*k*) betrug 0,586, die spezifische Leitfähigkeit wurde nach $\kappa = k \times S$ ($S \times \text{cm}^{-1}$) errechnet.

Zur Prüfung auf Dopa-Decarboxylase (EC 4.1.1.26) wurden die Schilddrüsen von Schwein (1: 3) und Hund (1: 8) mit aqua dest. homogenisiert, 3 Std. gegen fließendes, eiskühles Leitungswasser dialysiert und 30 min bei 30,000 g zentrifugiert. Der Überstand diente zur Inkubation der Ansätze in der Warburgapparatur.

Im *Hauptgefäß* 1,0 ml Extrakt; 0,1 ml Iproniazid (Endkonzentration 10^{-4} M); 0,1 ml Pyridoxalphosphat (Endkonzentration $6,25 \times 10^{-5}$ M); 1,5 ml 0,4 M Phosphatpuffer pH 7,0 bzw. 8,0.

Im *Kipper* 0,2 ml DOPA (2 mg/3 ml Ansatz).

Endvolumen 3,0 ml, N₂-Atmosphäre, 37°. Alle Zusätze in aqua dest. gelöst, Dopa in 0,01 N HCl. Zur Ausbeutebestimmung wurden einem Ansatz 0,5 mg Dopamin zugesetzt. Nach 10 min Vorinkubation wurde das Substrat zugekippt und die Reaktion nach 3 Std. mit 0,5 ml 3N Perchlorsäure gestoppt, zentrifugiert und mit NaOH neutralisiert. Der Überstand diente zur biologischen Bestimmung von Dopamin am Blutdruck des narkotisierten Hundes. Kontrollansätze ohne Dopa (Leerwert), mit Dopa, aber säureinaktiviertem Enzym (Nullwert) wurden mitgeführt.

ERGEBNISSE

Histamingehalt der untersuchten Organe

Die Schilddrüse der untersuchten Säugetiere enthält mit Ausnahme des Hundes erhebliche Mengen Histamin (Tab. 1).

TABELLE 1. HISTAMINGEHALT DER SCHILDDRÜSEN VERSCHIEDENER SÄUGETIERE

Tierart	Histamingehalt		Schilddrüsengew.		Tiergew.	Versuchsz.
Hund	4,6 \pm 2,0*	1,2–12,6†	2,3 \pm 0,5	0,6– 6,0	10	11
Rind	17,1 \pm 1,7	13,3–21,6	11,0 \pm 0,7	9,6–12,8	800	5
Schwein	20,9 \pm 5,4	7,2–46,0	8,2 \pm 0,7	6,2–12,0	100	8
Ratte	32,0‡		0,08		0,3	2
Meerschweinchen	20,8§		0,11		0,4	2

Histamingehalt in μ g/g Frischgewebe, Schilddrüsengewicht in g Frischgewicht, Tiergewicht in kg Lebendgewicht, * Mittelwert \pm Standardabweichung, † Extremwerte, ‡ Organe von 8 Tieren gemischt, § Organe von 10 Tieren gemischt.

Thymusrohhomogenate enthielten etwa halb so viel Histamin wie die von Schilddrüsen (Tab. 2).

TABELLE 2. HISTAMINGEHALT UND HISTIDINDECARBOXYLASEN DES THYMUS

Tierart	Histamin- gehalt	Histaminneubildung		Thymusgew.	Tiergew.	Versuche
		bei pH 7,0	pH 8,0			
Ratte	15,1*	3,9	2,6	0,33	0,28	3
Rind	8,5†	3,3	2,9	560	800	1
Meerschweinchen	11,7‡	1,6	0,0	0,33	0,35	2

Histamingehalt und Histaminneubildung in $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe, Thymusgewicht in g Frischgewicht, Tiergewicht in kg Lebendgewicht, * Organe von 7 Tieren; † von 2 Tieren; ‡ von 10 Tieren verarbeitet.

Der Histamingehalt der *Epithelkörperchen* von Ratte und Schwein betrug 9,1 bzw. 2,0 $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe (in 2 Versuchen Organe von 8 bzw. 3 Tieren verarbeitet).

Histidindecaboxylasen der untersuchten Organe

Die Inkubation von Rohhomogenaten der *Schilddrüse* mit Histidin ergab eine deutliche Histaminneubildung bei pH 7,0 und 8,0 (Tab. 3).

TABELLE 3. HISTIDINDECARBOXYLIERUNG IN ANSÄTZEN VON SCHILDDRÜSENHOMOGENAT PLUS SUBSTRAT

Tierart	Histaminneubildung				Drüsengew.	TGW	Versuche
	pH 7,0		pH 8,0				
Hund	2,5 \pm 1,3*	0,1– 4,6†	2,2 \pm 0,1*	0,3–4,6†	2,5 \pm 0,5 *	10*	10
Rind	2,1 \pm 0,4	1,2– 2,5	2,4 \pm 0,6	1,6–3,7	11,0 \pm 0,9	800	3
Schwein	5,6 \pm 2,0	2,2–11,5	4,9 \pm 1,6	2,7–8,1	7,9 \pm 0,5	100	6

Histaminneubildung in $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe, Drüsengewicht in g Frischgewicht, Tiergewicht (TGW) in kg Lebendgewicht, * Mittelwert \pm Standardabweichung, † Extremwerte.

Auch die Leerwerte ohne Histidinzusatz ergaben—vor allem nach Pyridoxal-phosphat-Zusatz (s. unten!)—eine messbare Decarboxylierung bei pH 7,0 und 8,0, die auf einen reichlichen Gehalt an freiem Histidin im Homogenat schliessen lassen (Tab. 4).

Mono- und Dijodhistidin, die in der Schilddrüse vorkommen^{17, 18}, hemmen 5×10^{-3} molar die unspezifische Histidindecaboxylase zu 50 %;¹⁹ möglicherweise sind deshalb die im Homogenat gemessenen Enzymaktivitäten zu niedrig. Ob diese Substanzen decarboxyliert werden, ist nicht bekannt.

Auch die Thymi von Ratte und Rind decarboxylieren bei pH 7,0 und 8,0 zugesetztes Histidin; Meerschweinchenthyms nur bei pH 7,0 (Tab. 2). Im Thymus der Ratte war Histidindecaboxylierung auch im Leeransatz nachweisbar. In den *Epithelkörperchen* der Ratte (Tab. 4) war sie nur nach Histidinzusatz messbar (3,1 μg Histamin pro g Frischgewebe pro 3 Std.).

Der Zusatz von 10^{-2} M Histidin führt beim spezifischen Enzym zu wesentlich grösserer Histaminbildung als beim unspezifischen Enzym. Dass der Histaminzuwachs beim Leerwert gegenüber dem Nullwert einer enzymatischen Reaktion entstammt, ergibt sich aus dessen Zeitabhängigkeit. So betrug z. B. der Leerwert beim Meerschweinchenfundus nach 15 min 2,6 μg Histamin pro g Frischgewebe, nach 180 min dagegen 4,3 μg (s. Tab. 4).

TABELLE 4. HISTAMINNEUBILDUNG AUS ORGANEIGENEM SUBSTRAT

Organe	Tierart	Histaminneubildung bei	
		pH 7,0	pH 8,0
Schilddrüse	Hund	1,3 (4,6)	
	Schwein		2,1 (3,2)*
	Ratte	3,2 (5,6)†	3,5 (3,9)†
Thymus	Ratte	3,3 (7,1)	
Epithelkörper	Ratte	0,0 (3,1)	
Magen	Ratte	0,0 (20,0)	0,0 (3,0)
Fundus	Meerschweinchen		2,6 (2,7)
			4,3 (6,9)
Restmagen	Meerschweinchen		1,5 (1,6)

Histaminneubildung in $\mu\text{g/g}$ Frischgewebe, in Klammern die Aktivität der Enzyme bei Substratzusatz. Bezugsgröße ist der "Nullwert", also der Ansatz mit säureinaktiviertem Enzym. * und † = Mittelwert aus 3 Versuchen.

Differenzierung der Histidindecaboxylasen der Schilddrüse

Die Bestimmung der *pH-Abhängigkeit* der Histaminbildung im Schilddrüsenhomogenat von Rind und Schwein ergab Aktivitätsgipfel bei pH 7,0 und 8,0 (s. Abb. 1). Der flachere Verlauf zum ersten und der steilere zum zweiten Gipfel stimmen

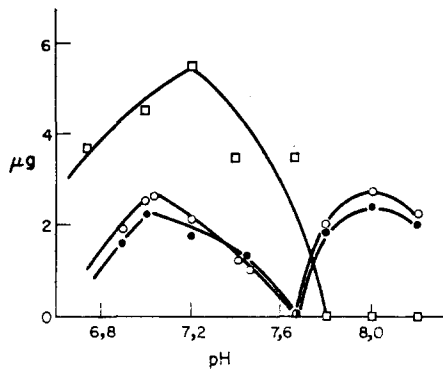


Abb. 1. pH-Abhängigkeit der Histidindecaboxylierung durch Schilddrüsenhomogenat. Ord. = Histaminbildung/g Frischgewebe —○— Rinderschilddrüse, —●— Schweineschilddrüse, —□— Schweineschilddrüse mit α -Methyl dopa 10^{-3} M in jedem Ansatz (Mittelwerte aus zwei Kurven) Ansätze s. Methodik!

mit den pH-Aktivitätskurven der spezifischen Histidindecaboxylase (Optimum 6,5–7,2) und der unspezifischen Histidindecaboxylase (Optimum 7,5–9,5) überein.^{6a, 6b, 20, 21} Den Begriff "unspezifische Histidindecaboxylase" verwenden wir hier im Hinblick auf Eigenschaften des Enzyms, die von Weissbach *et al.*²¹ beschrieben wurden.

Danach soll die unspezifische Histidindecaboxylase alle natürlichen aromatischen 1-Aminosäuren angreifen.²¹ Bei höher gereinigten Enzympräparaten aus verschiedenen Organen hat sich diese Aussage jedoch nicht bestätigen lassen.^{22, 23} Es muss deshalb für jedes Organ die Substratspezifität bestimmt werden. Die Frage, ob Schilddrüsenhomogenat bei pH 8,0 auch DOPA zu decarboxylieren vermag, untersuchten wir mit Hilfe der biologischen Bestimmung von Dopamin am Blutdruck des narkotisierten

Hundes. Dabei störte bei der Schweinethyreoidea die feste Bindung von Histamin an hochmolekulare Substanzen (bei dreistündiger Dialyse diffundierten nur etwa 30 per cent der vorhandenen Histaminmenge ab. Die i. v. Injektion aliquoter Volumina der Ansätze von Null-, Leer- und Hauptwert bei pH 7,0 wirkte blutdrucksenkend, die des Hauptwerts bei pH 8,0 leicht blutdrucksteigernd. Beim Hund, dessen Schilddrüse wenig Histamin enthält, konnte beim Hauptwert pH 8,0 ein Blutdruckanstieg festgestellt werden, der einer Dopaminbildung von etwa 2,5 mg/g Frischgewebe/3 Std. entsprach (Abb. 2).

Zur Differenzierung der spezifischen und unspezifischen Histidindecaboxylase wurden als *Hemmstoffe* α -Methyldopa und α -Methylhistidin bei Rohhomogenaten und UZ-Extrakten geprüft. α -Methyldopa hemmte 1×10^{-3} molar das unspezifische Enzym zu 100 %, das spezifische zu 0 %. α -Methylhistidin 5×10^{-3} molar war bei beiden Enzymen ohne Einfluss; 1×10^{-2} molar hemmte es das spezifische Enzym bei pH 7,0 zu 50 %, das unspezifische bei pH 8,0 zu 0 %. α -Methyldopa verschiebt das pH-Optimum der spezifischen Histidindecaboxylase von 7,0 nach 7,2 (Abb. 1); deshalb war hier auch bei pH 7,65 noch Histidindecaboxylierung feststellbar. Benzol hemmte das spezifische Enzym in Dial-Extrakten zu 40 %. Der Effekt ist nicht durch Einfluss des Benzols auf die Histaminbestimmung vorgetäuscht.

Auch der *Einfluss verschiedener Pufferarten und -konzentrationen* auf die Aktivität der Histidindecaboxylasen kann zur Differenzierung der beiden Enzyme herangezogen werden.

TABELLE 5. AKTIVITÄT DER HISTIDINDECABOXYLASEN DER HUNDESCHILDDRÜSE BEI VERSCHIEDENEN PUFFERLÖSUNGEN

pH	Phosphat	TRIS-Maleat	TRA-Puffer	Signifikanz				
7,0	2,5 \pm 1,14*	4,6†	0,8 \pm 0,8	0,0	1,3 \pm 0,69	3,0	Phos.: TRIS	
		4,2	0,0	3,2				1,8
		0,9	0,0	0,0				0,4
		0,1	0,0	0,0				0,0
8,0	3,9	4,6	3,4	3,6	4,8	3,6	Phos.: TRA	
		3,2	3,2	3,2				6,0

Aktivität in μ g neugebildetes Histamin/g Frischgewebe, pH 7,0 entspricht dem spezifischen Enzym, pH 8,0 dem unspezifischen, * Mittelwert \pm Standardabweichung, † Einzelwerte.

Während die Pufferart die Aktivität der unspezifischen Histidindecaboxylase in Haupt- und Leerwert wenig beeinflusste, verringerte TRA-Puffer die des spezifischen Enzyms annähernd signifikant, TRIS-Maleat hoch signifikant. Die Nullwerte stimmten in allen drei Puffern überein, weshalb Störungen der Histaminmessung ausgeschlossen erscheinen.

Die Enzymaktivität bei Änderung der Ionenkonzentration untersuchten wir anhand verschiedener Phosphatkonzentrationen (Abb. 3). Sie war für das spezifische Enzym bei 0,2 M, für das unspezifische bei 0,4 M Phosphatpufferlösung optimal.

Die überzeugendste Differenzierung der Histidindecaboxylasen der Schilddrüse gelang durch ihre *Trennung durch Gelfiltration* mit Sephadex. Wie oben beschrieben

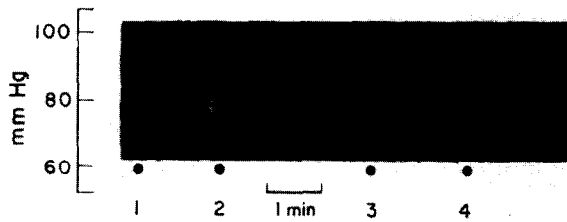


ABB. 2. Dopadecarboxylierung durch Homogenat von Hunde—Thyreoidea (1:8 homogenisiert)
 Ansätze s. Methodik! Hund, 8 kg, Morphinum—Pernoctonnarkose, künstliche Beatmung, Carotis-
 blutdruckkurve mit Ludwigschem Quecksilbermanometer: I.v. Injektion bei 1. 1 ml Ansatz mit
 Dopa und säureinaktiviertem Homogenat. 2. mit Dopa und intaktem Homogenat bei pH 8,0.
 3. wie 2., aber bei pH 7,0. 4. mit Dopamin (0,5 mg/Ansatz).

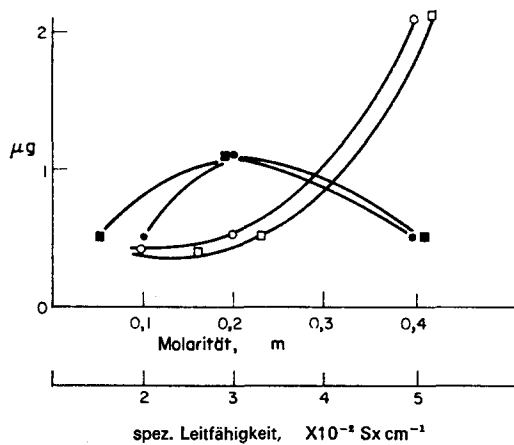


Abb. 3. Abhängigkeit der Histidindecaboxylasen der Schweineschilddrüse von Pufferkonzentration und Leitfähigkeit. Mittelwert aus zwei Versuchen, Ord. = Histaminbildung/g Frischgewebe, Abszisse = Phosphatpufferkonzentration (○) und spez. Leitfähigkeit (□). —●— spezifische Histidindecaboxylase, —○— unspezifische Histidindecaboxylase (Ansätze s. Methodik!).

wurden UZ-Extrakte auf eine Säule aufgetragen und Durchflussvolumina von je 5,5–6,0 ml für Ansätze verwendet. Die Bestimmung der Aktivität der Histidindecaboxylasen bei pH 7,0 und 8,0 nach Zusatz von Pyridoxalphosphat ($6,25 \times 10^{-5}$ M) ergab die in Abb. 4 wiedergegebene Verteilung. Mit Sephadex G 75 liess sich das

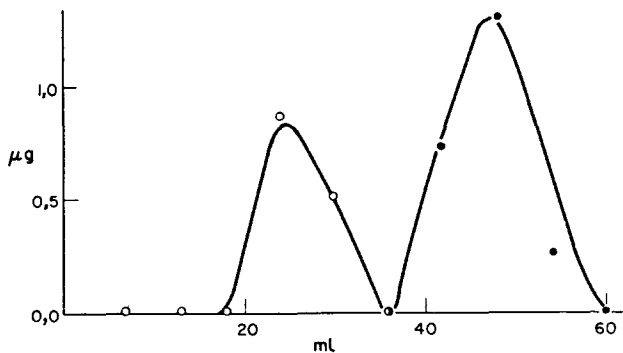


Abb. 4. Trennung der Histidindecaboxylasen der Schweineschilddrüse mit Sephadex G 100. Inkubationsdauer 60 min Ord. = Histaminbildung/1,5 ml Durchlauf, Absz. = Durchflussvolumen. Der erste Gipfel entspricht der unspez. Histidindecaboxylase (Aktivität bei pH 8,0, keine bei pH 7,0), der zweite der spezifischen Histidindecaboxylase (Aktivität bei pH 7,0, keine Aktivität bei pH 8,0) Versuchsbedingungen s. Methodik!

unspezifische Enzym teilweise, mit Sephadex G 100 vollständig vom spezifischen Enzym abtrennen. Die unspezifische Histidindecaboxylase erscheint im Durchfluss zuerst, hat also ein höheres Molekulargewicht als die spezifische Histidindecaboxylase, sofern sie nicht als Symplex mit einer anderen Substanz vorliegt. Die Histaminbestimmung der Ansätze mit den höchsten Decarboxylase-Aktivitäten am isolierten Meerschweinchenileum ergab Übereinstimmung der Messwerte mit der Fluorimetrie, die Nullwerte ergaben keine Histaminneubildung.

Aktivität der Histidindecaboxylasen der Schweineschilddrüse in Gegenwart von Pyridoxalphosphat

In vitro werden nach Bergeret *et al.*²⁴ Pyridoxalphosphatenzyme der Ratte, z. B. die Dopa-Decarboxylase der Leber, durch Schilddrüsenhormone gehemmt; *in vivo* wird aber nach Bjurö *et al.*^{25a} die Histidindecaboxylase des Magens aktiviert. Wir untersuchten den Einfluss von Pyridoxalphosphat bei der Schilddrüse des Schweines. In Rohhomogenaten wurde die spezifische Histidindecaboxylase aktiviert, die unspezifische gehemmt. Im Dial- und UZ-Extrakt wurden dagegen beide Enzyme aktiviert (s. Tab. 6).

TABELLE 6. EINFLUSS VERSCHIEDENER PYRIDOXALPHOSPHAT-KONZENTRATIONEN AUF DIE AKTIVITÄT DER HISTIDINDECABOXYLASEN DER SCHWEINESCHILDDRÜSE

PALP-Zugabe in $\times 10^{-5}$ M	Rohhomogenat				Dial-Extrakt		UZ-Extrakt	
	pH 7,0 Leerwert	pH 8,0	pH 7,0 Hauptwert	pH 8,0	pH 7,0 Hauptwert	pH 8,0	pH 7,0 Hauptwert	pH 8,0 Hauptwert
0,0	3,2 μ g =100 %	3,5 =100 %	6,5 =100 %	3,9 =100 %	0,0	0,5	0,0	0,4
0,63	+120		+ 9	- 18				
1,25	+180		+ 20	- 54				
2,50		-100			1,0	1,7	0,3	1,0
3,13			+ 70	-100				
3,75				- 44	6,3	7,7	2,9	2,7
6,25		- 77			4,5			
12,50								

Bei Homogenaten Aktivierung bzw. Hemmung ausgedrückt in + bzw. - % des Ausgangswertes, bei Extrakten in μ g neugebildetes Histamin/g Frischgewebe. Ansatz bei pH 7,0 entspricht dem spezifischen, bei 8,0 dem unspezifischen Enzym. PALP = Pyridoxalphosphat.

Auch die Säulenfraktionen wurden mit $6,25 \times 10^{-5}$ M Pyridoxalphosphat bei pH 7,0 und 8,0 versetzt und ergaben die in Abb. 4 angegebenen Werte. Die Restaktivität des unspezifischen Enzyms nach der Dialyse ist auf die festere Bindung von Co- und Apo enzym, im Verhältnis zum spezifischen Enzym, zurückzuführen.²⁰ Die grössere Aktivierung bzw. Hemmung durch Pyridoxalphosphat im Leerwert zeigt, dass die Wirkung des Pyridoxalphosphats von der Substratkonzentration abhängt. Die Hemmung der spezifischen Histidindecaboxylase durch $12,5 \times 10^{-5}$ M Pyridoxalphosphat im Dial-Extrakt wird durch die überoptimale Konzentration verursacht, wie früher schon gezeigt.³ In Dial- und UZ-Extrakten erfolgt zunächst ein geringer, dann ein steiler Anstieg der Aktivität mit aufsteigender Pyridoxalphosphat-Konzentration (s. Tab. 6). Wahrscheinlich wird ein Teil des Pyridoxalphosphats durch Komplexbildung mit dem Substrat oder durch Bindung an andere Enzyme verbraucht (s. Diskussion).

DISKUSSION

(a) Histamin und andere biogene Amine in der Schilddrüse

Der Histamingehalt der Schilddrüse des Hundes ist sehr viel niedriger als der von Rind und Schwein. Der Anteil des Organs am Gesamtkörpergewicht ist beim Hund rund 0,025 %, beim Schwein 0,008 % und beim Rind 0,0014 %. Der Vergleich des Grundumsatzes der drei Tierarten, 1550, 2200 und 2250 Cal/g/Tag¹⁶ für Schwein,

Rind und Hund lässt keine Beziehung zum relativen oder absoluten Schilddrüsen-gewicht oder zum Gesamthistamingehalt des Organs, ebensowenig zwischen Histamin-konzentration und Grundumsatz erkennen.

Die Lokalisation von Histamin in der Schilddrüse war bisher nicht untersucht. Der Mastzellgehalt des Organs ist von Tier zu Tier verschieden³⁴; er ist beim Menschen und Meerschweinchen gering,³⁵ bei Ratte und—im Gegensatz zum Histamingehalt—beim Hund sehr hoch.^{34, 36} Da die Zahl der Mastzellen bei Hund und Meerschweinchen mit dem Histamingehalt nicht parallel verläuft, kommt wie in Speicheldrüsen und Magen^{3, 4} auch in der Schilddrüse Histamin wahrscheinlich noch in anderen Zellen vor. Auch das Kolloid könnte im Ausschwemmungs- und evtl. auch im Neubildungsstadium Histamin binden, da die grösseren Vakuolen wie die Mastzellen Metachromasie aufweisen.¹² Sie enthalten saure Mucopolysaccharide (zu ihrer Bedeutung für die Histaminspeicherung^{3, 4}). Im Kolloid kommt nach Graumann³⁷ nur noch ein fest an Thyreoglobulin gebundenes, nicht metachromotropes Mucopolysaccharid vor.

Ausser Histamin wurde in der Schilddrüse noch Serotonin nachgewiesen.³⁸ Da zahlreiche Geflechte überwiegend sympathischer Nerven^{12, 39} die Schilddrüse durchziehen, ist auch das Vorkommen von Adrenalin, das bisher nicht untersucht wurde, sehr wahrscheinlich, neben Spuren von Phenyläthylamin und Dopamin.⁴⁰ Die Schilddrüsenhormone beeinflussen den Umsatz und die Wirkung der biogenen Amine erheblich. Die Hyperthyreotiker sind gegenüber Adrenalin besonders empfindlich und neigen zu anaphylaktischen Reaktionen.^{41, 42} Auch beim Meerschweinchen erhöht Thyreoideaextrakt die Empfindlichkeit gegenüber Anaphylaxie und Histaminintoxikation.⁴³ Thyroxin verringert die Histamin- und Serotoninresistenz der Maus,⁴⁴ während Methyluracil sie erhöht.⁴⁵ Thyroxin sensibilisiert die Ratte gegen Dextran, Eiweiss, Polymyxin B, 48/80, Histamin und Serotonin, hauptsächlich durch Hemmung der Darmhistaminase.^{25b} Nach Bjurö *et al.*^{25a} ist die erhöhte Histaminausscheidung im Urin eine Folge vermehrter Histaminbildung im Magen. Die Erhöhung des Histaminspiegels der Haut im Hyperthyreoidismus von Mensch und Ratte wird mit verminderter Histaminaseaktivität erklärt.^{46, 47} Bei der Hypothyreose der Ratte steigt die Monaminoxidase-Aktivität der Leber stark an;⁴⁸ das Enzym wird wie die Diaminoxidase durch Thyroxin gehemmt. Die Aktivität der Dopadecarboxylase der Rattenleber ist als Folge der Senkung des Pyridoxalphosphat—Gewebsspiegels bei Thyreotoxikose vermindert.²⁴ Thymektomie erhöht die Empfindlichkeit der Ratte gegen Histamin nicht signifikant.⁴⁹

(b) Histidindecaboxylasen

Die Histidindecaboxylasen werden durch Pyridoxalphosphat unterschiedlich beeinflusst.^{3, 20, 50, 51} Geringe Zusätze im Bereich von 10^{-5} bis 10^{-6} M aktivieren die *spezifische Histidindecaboxylase*, grössere hemmen. Das Mass von Aktivierung und Hemmung hängt ausser von methodischen Voraussetzungen vom Coenzymgehalt der einzelnen Organe ab.⁵² Auch der Gehalt der Ansätze an Histamin und Histidin spielt eine Rolle, da beide mit Pyridoxalphosphat Kondensate bilden.⁵³ Ein anfänglicher "Verbrauch" von Pyridoxalphosphat wurde in Dial- und UZ-Extrakten nachgewiesen (s. oben).

Obwohl die Aktivität der *unspezifischen Histidindecaboxylase* durch Dialyse stark abnimmt, bleibt das Coenzym zum grossen Teil am Apoenzym²⁰ gebunden. Diesen

Widerspruch konnten Awapara *et al.*⁵⁴ für die Dopadecarboxylase aufklären: Nach teilweiser Reinigung des Enzyms mit Sephadex-DEAE war die Bande für Pyridoxalphosphat bei 415 m μ zwar noch vorhanden und wurde durch Pyridoxalphosphat-Zugabe nicht verstärkt; trotzdem wurde die Aktivität des Enzyms stark gesteigert. Die Schiffische Base wird also von der Dialyse und dem nachfolgenden Pyridoxalphosphat-Zusatz offenbar nicht betroffen, der Cofaktorbedarf hängt somit nicht allein vom Pyridoxalphosphat als prosthetischer Gruppe ab. Dem entspricht die Aktivierung der unspezifischen Histidindecaboxylase durch Codecarboxylase³ in Speicheldrüsenhomogenaten und Schilddrüsenextrakten. Die Hemmung des Enzyms in Rohhomogenaten der Thyreoidea lässt sich durch Bildung eines Hemmstoffs aus Pyridoxalphosphat und einer dialysablen Substanz erklären, z. B. durch Jodhistidin, Histamin oder Thyroxin;¹⁹ die Reslitrone dürfte über eine Zyklisierung der Schiffischen Base zwischen Pyridoxalphosphat und Hemmstoff zustandekommen.⁵⁵

Die Reaktion zwischen Pyridoxalphosphat, Apoenzym, Substrat und Hemmstoff verläuft bei der aromatischen Aminosäuredecarboxylase sicher an mehreren Angriffspunkten, wie die Darstellung von Udenfriend zeigt.⁵⁶

Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang, dass eine Gruppe antithyreoidaler Substanzen, die Thioimidazole, starke Histidindecaboxylasehemmer sind.^{57, 58} Bedeutsame Vertreter, wie 2-Mercaptoimidazol und Ergothionein⁵⁷ wurden von Mackay¹⁹ als Hemmstoffe *beider* Histidindecaboxylasen erkannt. Jodkali⁵⁷ hemmt nur das unspezifische Enzym,²⁹ Hesperidinmethylchalon, das die Jod¹³¹-Aufnahme steigert,⁵⁷ hat keinen Effekt.⁵⁹ Dagegen wirkt auch Antistatin antithyreoidal.⁵⁷ Phosphatpuffer schützt offenbar, wie bei der Glutaminsäuredecarboxylase,^{27, 30} das Coenzym vor Phosphatasen. Höhere Phosphatpuffer-Konzentrationen hemmen kompetitiv oder nicht kompetitiv das Enzym.²⁷ TRIS-Puffer, nach Krebs *et al.*²⁸ für Homogenate ohnehin ungeeignet, wurde auch für die Dopadecarboxylase der Leber abgelehnt.²³ Weissbach *et al.*²¹ verwandten ihn aber 0,1 M für die unspezifische Histidindecaboxylase verschiedener Organe; die der Schilddrüse wird nach unseren Befunden ebenfalls nicht beeinträchtigt.

(c) Bedeutung des Histamins in oberen Verdauungstrakt

Die Bedeutung von Histamin in der Schilddrüse ist—wie auch bei anderen Organen—unbekannt. Ebenso ist ungeklärt, ob die Erhöhung des Grundumsatzes durch Histamin^{43, 60, 61} über die Schilddrüse, die Nebenniere oder durch peripheren Einfluss des biogenen Amins zustandekommt. Vermuten kann man aber auf Grund seines Vorkommens, seiner pharmakologischen Wirkungen bei Magen, Speicheldrüsen und auf Grund von Modellversuchen hin sichtlich seiner Membranwirkung,⁶² dass Histamin bei Sekretionsvorgängen, vor allem im oberen Verdauungstrakt, eine physiologische Rolle spielt.

Zusammenfassung—In der Schilddrüse von Hund, Rind und Schwein finden sich im Durchschnitt 4,6; 17,1 bzw. 20,9 μ g Histamin/g Frischgewebe, im Thymus von Ratte und Rind 8,8 bzw. 8,5 μ g. Beziehungen der Histaminkonzentration zur Höhe des Grundumsatzes sind nicht erkennbar. In der Schilddrüse von Hund, Rind und Schwein wurden zwei ziemlich aktive Histidindecaboxylasen nachgewiesen, durch pH-Optimum bei 7,0 und 8,0, α -Methyldopa und α -Methylhistidin und durch Benzol als spezifische und unspezifische Histidin decarboxylase charakterisiert. Auch im Thymus von Ratte

und Rind wurde Histidin bei pH 7,0 und 8,0 decarboxyliert. Pyridoxalphosphat aktiviert in Rohhomogenat von Schweineschilddrüsen in $1,25\text{--}3,75 \times 10^{-5}$ M Konzentration die spezifische Histidindecaboxylase, hemmt die unspezifische, in Abhängigkeit von der Substratkonzentration. In dialysierten und ultrazentrifugierten Extrakten sowie in Sephadex Säulenfraktionen aktiviert es in $3,13\text{--}6,25 \times 10^{-5}$ M Konzentration beide Enzyme, hemmt erst bei $1,25 \times 10^{-4}$ M Konzentration die spezifische Histidindecaboxylase. In Phosphatpuffer (0,1 M) zeigt das spezifische Enzym eine höhere Aktivität als in TRA- und vor allem TRIS-Puffer. Das unspezifische Enzym ist in seiner Aktivität unverändert. Für die spezifische Histidindecaboxylase ist 0,2 M Phosphatpuffer die günstigste Konzentration, für die unspezifische 0,4 M. Hinsichtlich des Einflusses der Ionenstärke verhalten sich beide Enzyme entgegengesetzt. Über Sephadex G 75 bzw. G 100 erfolgt eine Trennung der beiden Enzyme. Die unspezifische Histidindecaboxylase hat ein grösseres Molekulargewicht als die spezifische, es handelt sich um zwei verschiedene Enzyme, nicht um zwei verschiedene Aktivitätszentren am gleichen Protein. Homogenate von Schweine- und Hundethyreoidea decarboxylieren bei pH 8,0 auch Dopa zu Dopamin. Beim Hund konnte eine Neubildung von 2,5 mg Dopamin/g Gewebe/3 Std. nachgewiesen werden. Die Lokalisation des Histamin, die Beziehungen der Schilddrüsenhormone zu Umsatz und Wirkung von Histamin, Serotonin und Adrenalin, die Wirkung von Pyridoxalphosphat auf die Histidindecaboxylasen und die Bedeutung des Histamin für die Physiologie des oberen Verdauungstrakts werden diskutiert. Vor allem wird auf die Beziehung zwischen antithyreoidalen Substanzen und Histidindecaboxylasehemmstoffen hingewiesen.

LITERATUR

1. I. MOTA, W. T. BERALDO, A. G. FERRI und L. C. U. JUNQUEIRA, in *Ciba Foundation Symposium on Histamine* (Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME und C. M. O'CONNOR) s. 47, Churchill, London, (1956).
2. S. G. SANDERS und M. S. JACKSON, *J. oral Surg.* **13**, 191 (1955).
3. E. WERLE und W. LORENZ, *Z. Physiol. Chem.* **338**, 251 (1964).
4. C. F. CODE, *Ciba Foundation Symposium on Histamine* (Eds. G. E. W. WOLSTENHOLME und C. M. O'CONNOR), s. 189, Churchill, London (1956).
5. G. KAHLSON, E. ROSENGREN, D. SVAHN und R. THUNBERG, *J. Physiol., Lond.* **167**, 45 (1963).
6. (a) R. W. SCHAYER, *Am. J. Physiol.* **189**, 533 (1957).
(b) J. M. TELFORD und G. B. WEST, *J. Pharm. Pharmac.* **13**, 75 (1961).
7. E. WERLE und W. LORENZ, *Archs Int. Pharmacodyn. Ther.* (im Druck).
8. G. KAHLSON, E. ROSENGREN, D. SVAHN und R. THUNBERG, *J. Physiol., Lond.* **174**, 400 (1964).
9. G. W. HARRIS, D. JACOBSON und G. KAHLSON, *Ciba Foundation, Colloquia on Endocrinology* **4**, 186 (1952).
10. H. M. ADAM, *Regional Neurochemistry* (Eds. S. S. KELLY und J. ELKES), s. 300. Pergamon Press, Oxford (1961).
11. PH. STÖHR, v. W. MÖLLENDORF und K. GOERTTLER, *Lehrbuch der Histologie und Mikroskopischen Anatomie des Menschen*, s. 262, Fischer, Stuttgart (1963), D. STARK, *Embryologie*, s. 456, Thieme Verlag, Stuttgart (1965), J. E. RALL, J. ROBBINS und C. G. LEWALLEN, *The thyroid*, in *The Hormones*, (Eds. G. PINCUS, K. V. THIMANN und E. B. ASTWOOD), s. 161, Band V, Academic Press, New York und London (1964).
12. W. BARGMANN, *Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen*, s. 2–136, Inners. Drüsen I. (1939).
13. A. BENNINGHOFF, K. GOERTTLER, *Lehrbuch der Anatomie der Menschen*, s. 352, Urban & Schwarzenberg (1960).
14. E. KOLB, in H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Band II, Springer-Verlag (1964), s. 342 und 384.
15. P. A. SHORE, A. BURKHALTER und V. H. COHN JR., *J. Pharmac. exp. Ther.* **127**, 182 (1959).
A. BURKHALTER, *Biochem. Pharmac.* **11**, 315 (1962).
16. H. JOST, *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie* (Ed. A. Beske, G. v. BERGMANN, G. EMBDEN, A. ELLINGER) Band V, (1930) s. 383.
17. J. ROCHE, S. LISSITZKY und R. MICHEL, *Biochim. Biophys. Acta* **8**, 339 (1952).
18. R. J. BLOCK, R. H. MANDL und S. KELLER, *Archs Biochem.* **75**, 508 (1958).

19. D. MACKAY und D. M. SHEPHERD, *Br. J. Pharmac.* **15**, 552 (1960).
20. H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE, unter Mitarbeit von W. LORENZ, Histidindecaboxylase, In HOPPE-SEYLER'S *Handbuch physiologisch und pathologisch Chemischen Analyse*, Band VI C, s. 515 (im Druck).
21. H. WEISSBACH, W. LOVENBERG und S. UDENFRIEND, *Biochim. Biophys. Acta* **50**, 177 (1960).
22. P. HAGEN, *Br. J. Pharmac.* **18**, 175 (1962).
23. J. AWAPARA, T. L. PERRY, C. STANLY und E. PECK, *Clin. chim. Acta.* **10**, 286 (1964).
24. B. BERGERET, I. LABUESSE und F. CHATAGNER, *Biochim. Biophys. Acta.*
I. LABUESSE, F. CHATAGNER und B. JOLLES-BERGERET, *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 372 (1960).
25. (a) T. BJURÖ, H. WESTLING und H. WETTERQUIST, *Br. J. Pharmac.* **17**, 479 (1961).
(b) PARRATT und G. B. WEST, *Gland. int. Archs. Allergie* **16**, 288 (1960).
27. E. ROBERTS und D. G. SIMONSON, *Biochem. Pharmac.* **12**, 113 (1963).
28. H. A. KREBS, W. BARTLEY, D. E. GRIFFITHS und L. A. STOCKES, in H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Band II, Springer-Verlag (1964) s. 525.
29. G. CLASGENS, Dissert. Chir. Klinik Düsseldorf (1940).
30. H. SCHIEVELBEIN, E. WERLE, unter Mitarbeit von W. LORENZ, Glutaminsäuredecarboxylase, in *Hoppe-Seyler's Handbuch physiologisch und pathologisch Chemischen Analyse*, Band VI C, s. 512 (im Druck).
32. W. ELLENBERGER und H. BAUM, *Handbuch der vergleichenden Anatomie der Haustiere*, s. 496 Hirschwald Berlin (1912).
33. R. HAKANSSON, *Chem. Pharm.* **12**, 1289 (1963).
34. H. SELYE *The Mastcells*, Butterworths, Washington, s. 92, 104 (1965).
35. C. A. EKMAN und B. NAUMANN, *Acta path. microbiol. scand.* **22**, 271 (1945).
M. STAEMMLER, *Frankf. Z. Path.* **25**, 391 (1921).
J. JANES und J. R. McDONALD, *Archs Path.* **45**, 622 (1948).
36. L. ARVY und D. QUIVY, *C. R. Soc. Biol.* **149**, 658 (1955).
37. W. GRAUMANN, *Handbuch der Histochemie*, Band II, (1964) s. 275.
38. M. K. PAASONEN, N. T. KARKI und S. MOLLKA, *Ann. med. Exp., Biol. Fenni* **39**, 405 (1961).
39. W. BRAEUCKER, *Anat. Anz.* **56**, 225 (1922).
40. U. SAMMARTINO, *Biochem. Z.* **131**, 219 (1922).
41. J. G. WISWELL, G. E. HURWITZ, V. CORONHO, O. H. L. BING und D. L. CHILD, *J. Clin. Endocr. and Metab.* **23**, 1102 (1963).
42. L. FARMER, *Am. J. Clin. Path.* **13**, 365 (1943).
43. W. A. SELLE, *Texas Reports* **4**, 168 (1946).
44. P. S. J. SPENCER und G. B. WEST, *Br. J. Pharmac. Chemoth.* **17**, 137 (1961).
45. P. S. J. SPENCER und G. B. WEST, *Archs Int. Pharmacodyn.* **148**, 31 (1964).
46. F. R. GOTZL und C. A. DRAGSTEDT, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* **45**, 688 (1940).
47. W. FELDBERG und A. A. LOESER, *J. Physiol.* **126**, 286 (1954).
48. M. H. ZILE, *Fed. Proc.* **18**, 359 (1959).
49. A. S. WELTMAN und A. M. SACKLER, *Nature, Lond.* **192**, 460 (1961).
50. D. AURES und W. G. CLARK, *Analyt. Biochem.* **9**, 35 (1964).
51. A. SCHAUER, D. METZINGER und H. GIELOW, unveröffentlicht.
52. A. E. BRAUNSTEIN, Pyridoxal Phosphate in *The Enzymes* (Eds. P. D. BOYER, H. LARDY und K. MYRBÄCK) s. 126, Academic Press, New York (1960).
53. H. F. SCHOTT und W. G. CLARK, *J. biol. Chem.* **196**, 449 (1952).
54. J. AWAPARA, R. P. SANDMAN und C. STANLY, *Archs. Biochem. Biophys.* **98**, 520 (1962).
55. D. MACKAY und D. M. SHEPHERD, *Biochim. Biophys. Acta* **59**, 553 (1962).
56. S. UDENFRIEND, Chem. and Biol. Aspects of Pyridoxal Catalysis, *Proceedings of a Symposium of the International Union of Biochemists*, s. 267, Pergamon Press, Oxford (1963)
57. G. HILLMANN, *Biosynthese und Stoffwechselwirkungen der Schilddrüsenhormone*, *Biochemie und Klinik*, s. 35, Georg Thieme, Stuttgart (1961).
58. L. S. GOODMAN, *The Pharmacological Basis of Therapy*, MacMillan, New York (1960) s. 1548.
59. G. J. MARTIN, M. GRAFF, R. PAENDEL und J. M. BEILER, *Archs. Biochem.* **21**, 177 (1949).
60. H. W. KNIPPING und I. STEIGER, *Z. ges. exp. Med.* **64**, 594 (1929).
61. U. v. EULER und G. LILJESTRAND, *Scand. Arch. Physiol.* **55**, 1 (1929).
62. R. HIRT und R. BERCHTOLD, *Experientia* **XI**, 7, 273 (1955).
M. K. LINDAHL, *Ark. Kemi* **9**, 495 (1956).