

Über eine neue Methode zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität

Von WILFRIED LORENZ, JÜRGEN KUSCHE und EUGEN WERLE

Aus dem Klinisch-Chemischen Institut an der Chirurgischen Klinik der Universität München*
(Direktor: Prof. Dr. Dr. E. Werle)

(Der Schriftleitung zugegangen am 15. Februar 1967)

Herrn Prof. F. Hahn zum 60. Geburtstag gewidmet

Zusammenfassung: 1. Es wird eine neue Methode zur Bestimmung der Diaminoxydase beschrieben. Sie beruht auf der Messung des beim Substratumsatz freiwerdenden Ammoniaks mit Hilfe der Glutamatdehydrogenase-Reaktion.

2. Die Enzymaktivität ist in weiten Grenzen der Enzymmenge direkt proportional. Die Substratkonzentrations-Aktivitätskurven mit Putrescin, Hexamethylendiamin und Benzylamin besitzen kein ausgeprägtes Optimum, im Gegensatz zu denen mit Cadaverin und Histamin.

3. Die optimalen Konzentrationen für die Indikatorreaktion sind: 0,05 m/ Glutamatdehydrogenase (entsprechend 3,2 U), 0,19mm NADH und 5,7mm α -Oxo-glutarsäure.

4. Die wesentlich stärkere Hemmwirkung von Aminoguanidin bei Cadaverin als Substrat gegenüber Histamin als Substrat und die starke Hemm-

wirkung von Semicarbazid bei beiden Substraten war auch an Hand der neuen Methode nachweisbar.

5. 10^{-3} M Chlorpromazin aktiviert die Diaminoxydase bei Cadaverin, Putrescin, Hexamethylendiamin, Benzylamin und Histamin als Substrat maximal bis 450%. Das Indikatorsystem wird durch die Gegenwart von Chlorpromazin nicht beeinflußt.

6. Die Werte für die Diaminoxydase-Aktivität, mit der Glutamatdehydrogenase-Methode und der *o*-Amino-benzaldehyd-Methode gemessen, stimmen gut überein.

7. Nach orientierenden Versuchen eignet sich die Glutamatdehydrogenase-Methode zur Bestimmung der Diaminoxydase auch in tierischen Geweben und im Serum. Sie ist auch zur Bestimmung anderer Enzymaktivitäten geeignet, durch die Ammoniak entwickelt wird, wie z. B. zur Bestimmung der Monaminoxydase und der Urease.

Summary: 1. A new method is described for the determination of diamine oxidase. The ammonia released from the substrate is measured with the aid of glutamate dehydrogenase.

2. Within wide limits, the enzyme activity is directly proportional to the amount of enzyme. The substrate concentration-activity curves with putrescine, hexamethylene diamine and benzylamine have no marked optimum, unlike those with cadaverine and histamine.

3. The optimal concentrations for the test reaction mixture are: 0.05 ml glutamate dehydrogenase

(equivalent to 3.2 U); 0.19mm NADH; 5.7mm α -oxoglutaric acid.

4. With the new method, it was possible to show that aminoguanidine inhibits the oxidation of cadaverine more than that of histamine, and the oxidation of both substrates is strongly inhibited by semicarbazide.

5. With the substrates cadaverine, putrescine, hexamethylene diamine, benzylamine and histamine, the diamine oxidase activity is increased up to 450% by 10^{-3} M chlorpromazine. The test system is not affected by chlorpromazine.

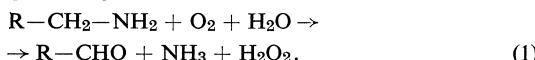
6. There is good agreement between the glutamate dehydrogenase method and the *o*-amino-benzal-

* Postanschrift: Dr. W. LORENZ, 8 München 15, Nußbaumstraße 20.

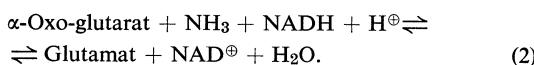
dehyde method for the measurement of diamine oxidase activity.

7. Comparative studies show that the glutamate dehydrogenase method is also suitable for the meas-

Die oxydative Desaminierung von Diaminen und Monoaminen durch Diaminoxydase* bzw. Monoaminoxydase** verläuft nach folgender Bruttogleichung:



Demnach kann die Aktivität dieser Enzyme durch die Bestimmung des Amin- oder Sauerstoffverbrauchs, des entstehenden Aldehyds, Hydroperoxids oder Ammoniaks gemessen werden¹⁻⁴. Für die Diaminoxydase beschreiben wir im folgenden eine Methode, bei der das entstehende Ammoniak mit Glutamatdehydrogenase (EC 1.4.1.2) als Indikatorenzym im optischen Test⁵ nach Gl. (2) gemessen wird:



Auf Grund der Gleichgewichtslage⁶ der Indikatorreaktion

$$K = \frac{[\alpha\text{-Oxo-glutarat}] \cdot [\text{NH}_3] \cdot [\text{NADH}] \cdot [\text{H}^+]}{[\text{Glutamat}] \cdot [\text{NAD}^+] \cdot [\text{H}_2\text{O}]} = 1,8 \cdot 10^{-13}$$

kann das entstehende Ammoniak praktisch vollständig erfaßt werden.

Methoden

Enzymmaterial und -einheiten

Diaminoxydase aus Erbsenkeimlingen, nach WERLE et al.⁷ angereichert bis zu einer spezif. Aktivität von 0,66 U

* Diamin:O₂-Oxydoreduktase (EC 1.4.3.6).

** Monoamin:O₂-Oxydoreduktase (EC 1.4.3.4).

¹ E. A. ZELLER, Advances in Enzymol. 2, 93 [1942].

² R. OKUYAMA u. Y. KOBAYASHI, Arch. Biochem. Biophysics 95, 242 [1961]; S. OTSUKA u. Y. KOBAYASHI, Biochem. Pharmacol. 13, 995 [1964].

³ N. TRYDING, X. Meeting scand. Soc. clin. Chem. clin. Physiol. 1965, S. 64.

⁴ E. WERLE, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handb. d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, Bd. VIa, S. 681, Springer-Verlag, Heidelberg 1964; E. WERLE u. V. SCHIRREN, Z. ges. exp. Med. 138, 522 [1965].

⁵ O. WARBURG u. W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 287, 291 [1936].

⁶ H. J. STRECKER, Methods in Enzymol. 2, 220 [1955].

⁷ E. WERLE, I. TRAUTSCHOLD u. D. AURES, diese Z. 326, 200 [1961].

urement of diamine oxidase in animal tissues and in serum. It can also be used to measure other enzymatic reactions in which ammonia is produced, e.g. the determination of monoamine oxidase and urease.

($\mu\text{MolNH}_3/\text{Min.})/\text{je mg Protein}$, entsprechend 36 BÜCHER-Einheiten/mg Protein⁸ oder 93 AE/mg Protein ($\mu\text{l O}_2/10 \text{ Min. je mg Protein}$) nach WERLE et al.⁷. Aus der gemessenen Extinktionsabnahme von NADH bei 366 nm/Min. errechnen sich die Einheiten nach Gl. (3):

$$\text{Anzahl U} = (\Delta E/\text{Min.}) \cdot 0,9 \quad (3)$$

Substrate

Als Substrate der Diaminoxydase wurden verwendet: Cadaverin und Histamin der Fa. Fluka, Buchs; Putrescin und Hexamethylendiamin in Form der Dihydrochloride von Dr. Schuchardt, München; Benzylamin (Fluka). Für die Indikatorreaktion verwendeten wir von C. F. Boehringer & Söhne, Mannheim: Glutamatdehydrogenase (GIDH-S), NADH-Na₂ aus enzymatischer Reaktion, Dinatrium- α -oxo-glutarat.

Ansätze

In sorgfältig gereinigte Glasküvetten⁹, Schichtdicke 10 mm, wurden die in Tab. 1 aufgeführten Lösungen in der angegebenen Reihenfolge pipettiert.

Tab. 1. Testmischung zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität.

ml	Lösung	Endkonzentration
2,15	Phosphatpuffer	0,2M KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
0,1	NADH-Na ₂	0,19mm
0,1	α -Oxo-glutarat-Na ₂	5,7mm
0,05	Glutamatdehydrogenase	3,2 U bzw. 175 BÜCHER-Einh./3 ml
0,1	Diaminoxydase-Präp.	0,025—0,1 U/3 ml
0,5	Substrat	0,3mm Cadaverin oder 8mm Putrescin oder 14mm Hexamethylen-diamin oder 16mm Benzylamin oder 1mm Histamin

Die Inkubation erfolgte unter Luft bei 25°C, End-pH 7,4. Start mit 0,5 ml Substratlösung, beim Leerwert mit 0,5 ml Puffer. Der „Schleich“ wurde abgewartet.

⁸ G. BEISENHERZ, H. J. BOLTZE, Th. BÜCHER, R. CZOK, K. H. GABARDE, E. MEYER-ARENDE u. G. PFLEIDERER, Z. Naturforsch. 8b, 555 [1953].

⁹ E. KIRSTEN, C. GEREZ u. R. KIRSTEN, Biochem. Z. 337, 312 [1963]; L. K. REICHELT, E. KVAMME u. B. TVEIT, Scand. J. clin. Lab. Invest. 16, 433 [1964].

Die Extinktionsabnahme von NADH bei 366 nm wurde im Photometer „Eppendorf“ mit automatischem Küvettenwechsler und Registrierschreiber aufgenommen, der Küvettenwechsel erfolgte 15–45 Min. lang alle 30–60 Sek. Die Berechnung des zugehörigen $\Delta E/\text{Min}$. erfolgte durch Verbinden der einzelnen Extinktionswerte und Bildung des Quotienten aus Gesamtextinktionsabnahme/Anzahl der Minuten. Die Enzymaktivität wurde bestimmt als konstantes $\Delta E/\text{Min}$. bei 366 nm zwischen Haupt- und Leerwert. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ für NADH bei 366 nm beträgt $3,3 \cdot 10^6 [\text{cm}^2/\text{Mol}]^{10}$.

Die Proteinbestimmung erfolgte nach WARBURG und CHRISTIAN¹¹.

Zusätze

Aminoguanidinsulfat von Dr. Schuchardt, Semicarbazidhydrochlorid und *o*-Amino-benzaldehyd von E. Merck, Darmstadt, Chlorpromazin (= 2-Chlor-10-[3-dimethylamino-propyl]-phenothiazin-hydrochlorid) der Farbenfabriken Bayer.

Ergebnisse

1. Ermittlung der optimalen Bedingungen für das Indikatorssystem zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität

Für das Indikatorssystem erwiesen sich die folgenden Konzentrationen als optimal (Tab. 2): 0,05 ml Glutamatdehydrogenase (3,2 U/Ansatz), 0,19 mM NADH, 5,7 mM α -Oxo-glutarat. Höhere NADH-Konzentrationen setzen die Glutamatdehydrogenase-Aktivität herab, was teilweise auf der durch NADH verursachten Dissoziation der Glutamatdehydrogenase in Untereinheiten beruhen könnte¹². Mit Cadaverin als Substrat erhält man für die gekoppelten Reaktionen ein pH-Optimum bei pH 7,4 und ein zweites in etwa gleicher Höhe bei pH 8,0, das nicht sehr ausgeprägt ist. Da das pH-Optimum der Diaminoxydase mit Cadaverin als Substrat bei pH 7,5 liegt¹³, bevorzugen wir pH 7,4. Eine günstige Pufferkonzentration ist 0,2 M Phosphat.

2. Enzymkonzentration und Reaktionsverlauf

Abb. 1 zeigt, daß die Reaktion bei gegebener Substratkonzentration in den Ansätzen mit 0,05 und 0,1 U vom Start weg linear verläuft, mit 0,35 und

Tab. 2. Ermittlung der optimalen Bedingungen für das Indikatorssystem und des optimalen pH-Werts zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität. Die Konzentrationen der Diaminoxydase (0,07 U/Ansatz) und des Cadaverins (0,3 mM) waren in allen Ansätzen gleich. Die beim Variieren einer Inkubationsbedingung jeweils konstant gehaltenen Bedingungen waren: pH 7,4; Glutamatdehydrogenase 3,2 U/3 ml Ansatz; NADH 0,19 mM; α -Oxo-glutarat 5,7 mM; Phosphat 0,2 M. Weitere Angaben s. unter Methodik.

während dessen konstant gehalten	Inkubationsbedingungen		
	variiert	im Bereich von	als optimal befunden
pH, [NADH], [α -OG], [Phosphat]	[GIDH]	0,16 bis 3,6 U	3,2 U
pH, [GIDH], [α -OG], [Phosphat]	[NADH]	0,09 bis 1,11 mM	0,19 mM
pH, [GIDH], [NADH], [α -OG], [Phosphat]	[α -OG]	1,5 bis 17,1 mM	7,5 mM
[GIDH], [NADH], [α -OG], [Phosphat]	pH	6,0 bis 8,5	7,4; 8,0
pH, [GIDH], [NADH], [α -OG]	[Phosphat]	0,067 bis 0,5 M	0,2 M

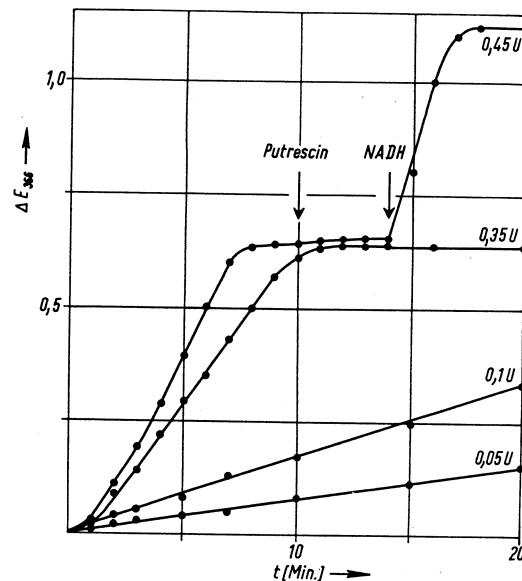


Abb. 1. Enzymkonzentration und Reaktionsverlauf. Diaminoxydase-Aktivität in ΔE (Extinktionsabnahme von NADH/Min.), Putresinkonzentration 8 mM, weitere Bedingungen s. unter Methodik. Versuchsbeschreibung s. Text.

¹⁰ H. J. HOHORST, Biochem. Z. 328, 509 [1956].

¹¹ O. WARBURG u. W. CHRISTIAN, Biochem. Z. 310, 384 [1942].

¹² E. BÄSLER in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Handb. d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, Bd. VIa, S. 683, Springer-Verlag, Heidelberg 1964.

¹³ R. KAPELLER-ADLER, Federat. Proc. 24, 742 [1965].

0,45 U in der typischen Form einer Konsekutivreaktion¹⁴: Induktionsperiode bis 3 Min., linearer Kurventeil bis 7 Min., anschließend Plateaubildung. Letztere beruht nicht auf der Erschöpfung des Substrats der Diaminoxydase, sondern auf Mangel an NADH, was sich daraus ergibt, daß die Reaktion nach Zusatz von 0,1 mM NADH wieder in Gang kommt, nicht aber nach Zugabe von 5 mM Putrescin. NADH ist somit der limitierende Faktor unter den gegebenen Bedingungen.

3. Reaktionsgeschwindigkeit bei steigender Enzymkonzentration in Gegenwart verschiedener Pufferarten und -konzentrationen und Substrate

Im Bereich von 0,025–0,5 mg Enzymprotein und höher (z. B. 2 mg) ist die Reaktionsgeschwindigkeit direkt proportional der Enzymkonzentration, un-

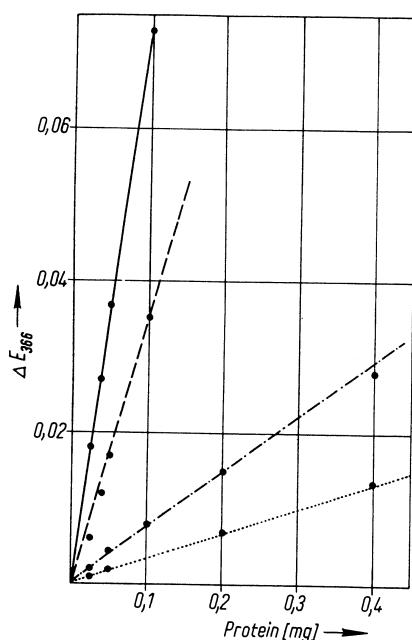


Abb. 2. Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge. Diaminoxydase-Aktivität in ΔE (Extinktionsabnahme von NADH/Min.), weitere Bedingungen s. unter Methodik.

- : 0,3 mM Cadaverin, 0,2 M Phosphatpuffer
 - - - : 0,3 mM Cadaverin, 0,067 M Phosphatpuffer
 - · - : 8 mM Putrescin, 0,25 M Trispuffer
 - · · : 0,1 mM Histamin, 0,067 M Phosphatpuffer
- Jeweils Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

¹⁴ H. M. BERGMEYER, Methoden d. enzymat. Analyse, S. 11, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstraße 1962.

abhängig von verschiedenen Substraten, Puffern und Pufferkonzentrationen (Abb. 2).

4. Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender Substratkonzentration

Von den Substraten Cadaverin, Putrescin, Hexamethylenediamin, Benzylamin und Histamin wird Cadaverin am raschesten umgesetzt. Optimale Konzentrationen der genannten Reihenfolge: 0,3 mM, 8 mM, 14 mM, 16 mM und 0,1 mM. Mit Ausnahme vom Histamin liegen die Konzentrations-Optima bei allen Substraten um so niedriger und sind um so ausgeprägter, je rascher die Substrate umgesetzt werden (Abb. 3).

5. Hemmung der Diaminoxydase durch Aminoguanidin und Semicarbazid

Die starke Hemmung der Diaminoxydase durch Aminoguanidin und Semicarbazid¹⁵ läßt sich auch anhand der neuen NADH-Methode nachweisen. Bei Putrescin als Substrat hemmte Aminoguanidin 10^{-6} M noch zu 100%, 10^{-7} M noch zu 50%. Auch Semicarbazid hemmte 10^{-5} M noch zu 100%. Bei Histamin als Substrat hemmte Aminoguanidin 10^{-4} M nur zu 80%, erst $5 \cdot 10^{-4}$ M hemmten 100% der Aktivität.

Die Aktivität der Glutamatdehydrogenase wird in Gegenwart von 10^{-4} M Ammoniumacetat als Substrat durch $5 \cdot 10^{-4}$ M Aminoguanidin und 10^{-3} M Semicarbazid nicht beeinflußt.

6. Aktivierung der Diaminoxydase durch Chlorpromazin

In Gegenwart von Chlorpromazin fanden wir einen erhöhten NADH-Verbrauch. Ansätze mit dem Indikatorssystem allein und verschiedenen Konzentrationen von Ammoniumacetat ergaben, daß das Indikatorssystem durch Chlorpromazin in den verwendeten Konzentrationen nicht beeinflußt wird. Chlorpromazin aktiviert also die Diaminoxydase aus Erbsenkeimlingen, und zwar maximal in 10^{-3} M Konzentration um 230–450% (Tab. 3).

7. Vergleichende Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität mit der Glutamatdehydrogenase-Methode und der Methode von Holmstedt und Tham¹⁶

Ein Mol NH_3 entspricht nach Gl. (1) einem Mol Aldehyd und einem Mol O_2 , vorausgesetzt, daß das

¹⁵ W. SCHULER, Experientia [Basel] 8, 230 [1952].

¹⁶ B. HOLMSTEDT u. R. THAM, Acta physiol. scand. 45, 152 [1959].

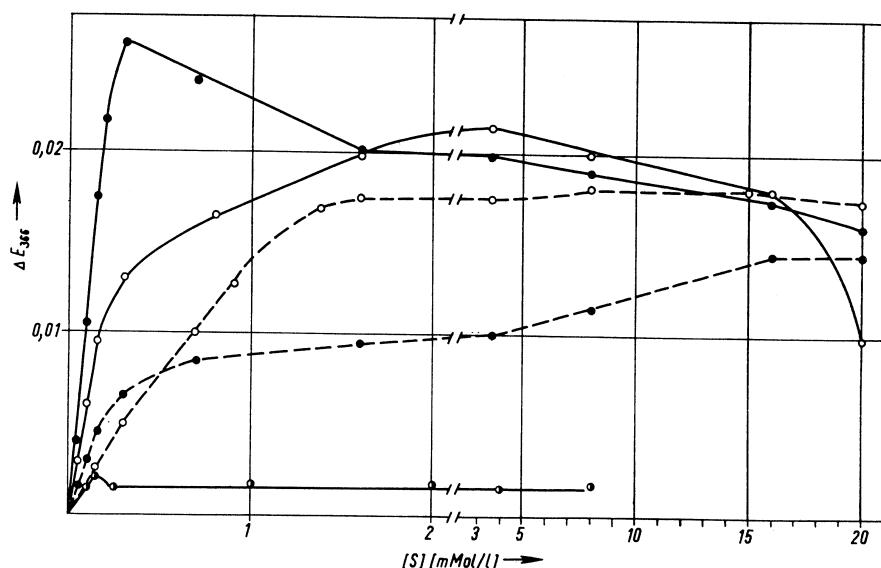


Abb. 3. Reaktionsgeschwindigkeit und Substratkonzentration. Diaminoxydase-Aktivität in ΔE (Extinktionsabnahme von NADH/Min.), 0,033 U Diaminoxydase (0,05 mg Protein). Weitere Bedingungen s. unter Methodik.
 ●—●: Cadaverin, ○—○: Putrescin, ●---●: Benzylamin, ○---○: Hexamethylendiamin, ○—○: Histamin.
 Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Tab. 3. Aktivierung der Diaminoxydase durch Chlorpromazin. Die Enzymaktivität wird als Extinktionsabnahme von NADH bei 366 nm angegeben, die Substrate waren in den oben beschriebenen optimalen Konzentrationen zugesetzt, %-Angaben bedeuten Aktivierung in %. Weitere Angaben s. unter Methodik.

Chlor-promazin [Mol/l]	Substrat					
	Cadaverin		Putrescin		Hexa-methylen-diamin	
	$\Delta E/$ Min.	%	$\Delta E/$ Min.	%	$\Delta E/$ Min.	%
0	0,046	—	0,048	—	0,044	—
10^{-5}	0,060	30	0,056	15	0,046	5
10^{-4}	0,070	50	0,064	30	0,052	20
10^{-3}	0,160	250	0,168	250	0,144	230
					0,0122	455

H_2O_2 nicht durch Katalase gespalten wird. Die Beziehung NH_3 -Bildung zu NADH-Verbrauch kann deshalb zum Vergleich verschiedener Methoden der Diaminoxydasebestimmung herangezogen werden^{1,4} (Abb. 4).

Im Bereich unserer Messungen ist die Extinktionsabnahme von NADH direkt proportional der eingesetzten NH_4^+ -Menge. Mit $\epsilon_{NADH, 366 \text{ nm}} = 3,3 \cdot 10^6 \text{ [cm}^2/\text{Mol]}$ und $E = \epsilon \cdot c \cdot d$ (wobei

$d = \text{Schichtdicke in cm und } E = 0,1$), errechnet sich ein NH_4^+ -Gehalt von $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ Mol } NH_4^+/\text{l}$, der sich auch aus den Messungen der Eichkurve ergibt (Abb. 4).

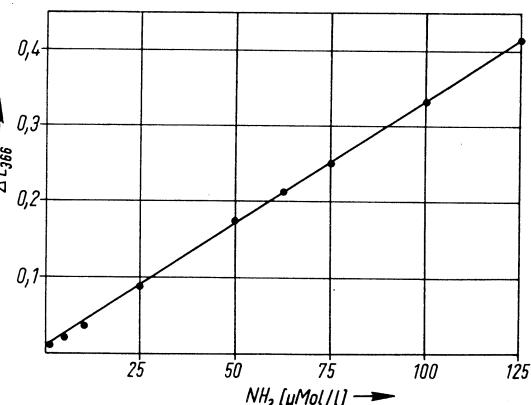


Abb. 4. Beziehung zwischen NH_3 -Konzentration und Extinktionsabnahme von NADH bei 366 nm. Zusatz von Ammoniumacetat in 10^{-6} bis $2,5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ Endkonzentration. Mittelwerte aus 3 Bestimmungen, Messungen nach KIRSTEN et al.⁹ als Endpunktsbestimmungen. Direkte Proportionalität ist bis $1 \cdot 10^{-7} \text{ M } NH_4^+$ zu erreichen. Weitere Bedingungen s. unter Methodik.

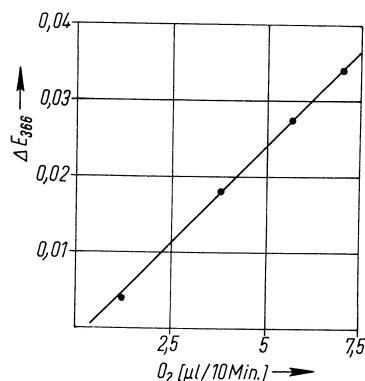


Abb. 5. Vergleich der Glutamatdehydrogenase-Methode mit der *o*-Amino-benzaldehyd-Methode. Ordinate: Ergebnisse mit der Glutamatdehydrogenase-Methode, in ΔE (Extinktionsabnahme von NADH/Min.); Abszisse: Ergebnisse der *o*-Amino-benzaldehyd-Methode, geeicht am O_2 -Verbrauch in der WARBURG-Apparatur, in AE nach WERLE et al.⁷. 1 AE ist die Enzymaktivität, durch die $1 \mu l O_2/10 \text{ Min.}$ verbraucht wird. Weitere Bedingungen s. unter Methodik. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen.

Die Ammoniakbestimmung mit der Glutamatdehydrogenase-Methode ist somit quantitativ zuverlässig.

Die nach der Glutamatdehydrogenase-Methode ermittelten Aktivitäten der Diaminoxydase stimmen mit den an Hand der *o*-Amino-benzaldehyd-Methode ermittelten¹⁶ überein (Abb. 5). Wegen der Unbeständigkeit des jeweils entstehenden Aldehyds wird die *o*-Amino-benzaldehyd-Methode an Hand des O_2 -Verbrauchs geeicht, gemessen in der WARBURG-Apparatur. Unter Standardbedingungen⁷ entsprechen nach der Gleichung¹⁷:

$$\text{Molvolumen } V = R \cdot T/p$$

z. B.:

$$5 \text{ AE} = 5 \mu l O_2/10 \text{ Min.}$$

$$= 1,97 \cdot 10^{-8} \text{ Mol } O_2/\text{Ansatz je Min.};$$

$$5 \text{ AE} = 0,024 \Delta E/\text{Min.}$$

$$= 7,2 \cdot 10^{-6} \text{ Mol } NH_4^{\oplus}/l \text{ je Min.}$$

$$= 2,15 \cdot 10^{-8} \text{ Mol } NH_4^{\oplus}/\text{Ansatz je Min.}$$

Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmen somit gut überein (Differenz 9%).

Diskussion

Bei der relativ großen Zahl von Substraten und Produkten der Diaminoxydasereaktion sind viele Bestimmungsmethoden für das Enzym möglich:

¹⁷ H. KOBLET, Physikalische Begriffe in der klinischen Biochemie, S. 213, G. Thieme, Stuttgart 1964.

a) Mit Histamin als Substrat: 1. Biologische Bestimmung des nach gemessener Reaktionszeit noch vorhandenen Histamins am isolierten Meerschweincheneileum¹⁸ oder am Blutdruck der narkotisierten Katze¹⁹. 2. Fluorometrische, polarographische²⁰ oder spektrophotometrische Bestimmung²¹.

b) Messung des O_2 -Verbrauchs gasvolumetrisch in der WARBURG-Apparatur²² oder spektrophotometrisch durch Messung der Hämoglobinbildung²³.

c) Mit Cadaverin, Putrescin oder Hexamethylenediamin als Substrat, Messung der Aldehyde spektrophotometrisch nach Cyclisierung und Kondensation mit *o*-Amino-benzaldehyd¹⁶.

d) Messung des entstehenden Ammoniaks nach VAN SLYKE und CULLEN²⁴, FOLIN²⁵, der PARNASCHEN Vakuumdestillation²⁶ und Diffusionsanalyse nach CONWAY^{7, 27}.

¹⁸ S. EDLBACHER u. E. A. ZELLER, Helv. chim. Acta **20**, 717 [1937]; F. WICKSELL, Acta physiol. scand. **17**, 359 [1949]; A. AHLMARK, ebenda **9**, Suppl. 28 [1944]; G. V. ANREP, M. S. AYADI, G. S. BARSOUM, J. R. SMITHU, N. M. TALAAT, J. Physiology **103**, 155 [1944]; F. HAHN, W. SCHMUTZLER, G. SESEKE, H. GIERTZ u. W. BERNAUER, Biochem. Pharmacol. **15**, 155 [1966]; E. WERLE u. G. EFFKEMANN, Arch. Gynäkol. **170**, 82 [1940]; R. M. GESLER, M. MATSUBA u. C. A. DRAGSTEDT, J. Pharmacol. exp. Therapeut. **116**, 356 [1956].

¹⁹ C. H. BEST, J. Physiology **67**, 256 [1929]; G. ALBUS, Klin. Wschr. **24**, 858 [1939]; N. EMMELIN, G. KAHLSON u. F. WICKSELL, Acta physiol. scand. **2,2**, 123 [1941].

²⁰ K. UOZUMI, J. NAKAHARA, T. HIGASHI u. Y. SAKAMOTO, J. Biochemistry [Tokyo] **56**, 601 [1964].

²¹ A. C. DODGE, Amer. J. Obstetr. Gynecol. **63**, 1213 [1952].

²² C. H. BEST u. E. W. McHENRY, J. Physiology **70**, 1349 [1930]; E. GEBAUER-FUELLNEGG u. A. C. ALT, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **29**, 531 [1932]; E. A. ZELLER, H. BIRKHÄUSER, H. MISLIN u. M. WENK, Helv. chim. Acta **22**, 1381 [1939].

²³ B. MONDOVI, G. ROTILIO u. M. T. COSTA, Proc. Symp. Chem. Biol. Aspects of Pyridoxal Catalysis, p. 415, Pergamon Press, Oxford 1963; M. LASKOWSKI, J. biol. Chemistry **145**, 457 [1942].

²⁴ W. E. McHENRY u. G. GAVIN, Biochem. J. **26**, 1365 [1932].

²⁵ S. EDLBACHER u. E. A. ZELLER, Helv. chim. Acta **20**, 717 [1937].

²⁶ E. A. ZELLER, Helv. chim. Acta **21**, 880 [1938].

²⁷ E. A. ZELLER, Klin. Wschr. **20**, 220 [1941]; G. C. COTZIAS u. V. P. DOLE, J. biol. Chemistry **196**, 235 [1952]; R. KAPELLER-ADLER, Biochem. J. **44**, 70 [1949]; C. M. McEWEN, J. biol. Chemistry **240**, 2003 [1965]; M. LASKOWSKI, J. M. LENLEY u. C. K. KEITH, Arch. Biochemistry **6**, 105 [1945].

e) Messung von Hydroperoxid an Hand der Entfärbungszeit einer gegebenen Menge Indigo²⁸, photometrische Bestimmung des nach definierter Zeit noch vorhandenen Farbstoffs²⁹, Titration mit KMnO₄³⁰ (vgl. dagegen l. c.^{30a}), durch Farbstoffentwicklung mit *o*-Dianisidin³¹.

f) Isotopenmethoden mit [¹⁴C]Putrescin als Substrat^{2,3}.

Von diesen Methoden zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität sind die, welche sich auf die Histaminbestimmung gründen, meist nicht spezifisch genug, da Histamin im Gewebe und möglicherweise auch im Blut noch durch andere Enzyme umgesetzt wird, vor allem durch Histaminnucleotidbildung (Histamin + NAD⁺ → Histaminadenin-dinucleotid⁺ + Nicotinsäureamid)³², Histamin-

²⁸ E. A. ZELLER, Helv. chim. Acta **21**, 1645 [1938].

²⁹ E. A. ZELLER, Helv. chim. Acta **23**, 1502 [1940]; Schweiz. med. Wschr. **71**, 1349 [1941]; B. B. LOZZIO, A. D. MARENCI u. M. ROYER, Rev. farmacéutica [Buenos Aires] **102**, 53 [1960].

³⁰ R. KAPELLER-ADLER, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **22**, 291 [1956]; R. KAPELLER-ADLER u. R. RENSWICK, Clin. chim. Acta [Amsterdam] **1**, 197 [1956].

^{30a} E. A. ZELLER, Federat. Proc. **24**, 766 [1965].

³¹ P. N. AARSEN u. H. KEMP, Nature [London] **204**, 1195 [1964].

³² H. TABOR, Handb. Exp. Pharmakol. Bd. XVIII, S. 684, Springer-Verlag, Heidelberg 1966.

transaminase³³ und Histaminmethyltransferase (EC 2.1.1.8)³⁴. Die O₂-Messungen sind für die Verhältnisse im tierischen Gewebe und Blut nicht empfindlich genug, teilweise auch die *o*-Aminobenzaldehyd-Methode.

Die bisherigen Bestimmungsmethoden auf der Basis der Ammoniakmessung sind zwar sehr empfindlich¹, erfassen aber das Ammoniak nicht selektiv⁹. Mit der enzymatischen Mikrobestimmung von Ammoniak glauben wir eine Methode zu besitzen, mit der man spezifisch, empfindlich und rasch die Aktivität der Diaminoxydase bestimmen kann. Die Empfindlichkeit ließe sich mit der fluorometrischen Bestimmung von NAD⁺ oder NADH³⁵ noch erheblich erhöhen, so daß sie derjenigen der Isotopenmethoden nahekäme. Die Glutamatdehydrogenase-Methode eignet sich zur Bestimmung der Diaminoxydase-Aktivität im tierischen Organismus und im Schwangerenserum³⁶ sowie zur Aktivitätsbestimmung der Monoaminoxydase und Urease³⁶.

³³ R. ITO, T. ITO u. K. NAKAZAWA, Nippon Univ. J. Med. **2**, 259 [1960].

³⁴ D. D. BROWN, J. AXELROD u. R. TOMCHICK, J. biol. Chemistry **234**, 2948 [1959].

³⁵ S. UDENFRIEND, in N. O. KAPLAN u. H. A. SCHERAGA, Molecular Biology, Vol. III, Fluorescence Assay in Biology and Medicine, p. 172, Academic Press, New York 1962.

³⁶ W. LORENZ, K. KUSCHE u. E. WERLE, Pharmakologisches Sympos. Freiburg, 10. 2. 1967.