

Zur Bestimmung der spezifischen Histidindecaboxylase

Von WILFRIED LORENZ und EUGEN WERLE

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

(Der Schriftleitung zugegangen am 25. November 1966)

Zusammenfassung:

1. Für den bereits nach 10 Min. einsetzenden Abfall der Histaminbildung bei Ansätzen mit Schilddrüsenextrakten sind folgende Faktoren verantwortlich:

a) Histaminverbrauch durch Diaminoxidase und Histamin-Methyltransferase (weitgehend hemmbar durch Aminoguanidin und Chlorpromazin); b) Komplexbildung zwischen Histidin und Pyridoxal-phosphat sowie c) Instabilität des Enzyms (durch Glutathion zu verringern) und d) Inkubation unter N_2 -Atmosphäre.

2. Optimale Bedingungen für die Bestimmung der Aktivität der spezifischen Histidindecaboxylase der Schweineschilddrüse sind $6,25 \cdot 10^{-4}M$ Amino-

guanidin, $1,0 \cdot 10^{-3}M$ Chlorpromazin, $10^{-2}M$ Glutathion und $10^{-2}M$ Histidin bei pH 7,0. Unter diesen Bedingungen wurden 12,7 pMole/Min. und mg Zellprotein bzw. 27 μg Histamin/100 mg Protein und 3 Std. gebildet.

3. $1 \cdot 10^{-3}M$ Aminoguanidin und $5 \cdot 10^{-3}M$ Chlorpromazin hemmen die spezifische Histidindecaboxylase zu 90%.

4. Die Bedeutung der Ergebnisse für Nachweis und Messung der Histidindecaboxylaseaktivität verschiedener Organe wird diskutiert. Empfindlichkeit und Spezifität der fluorometrischen Bestimmungsmethoden von Histamin erweisen sich den Tracermethoden als ebenbürtig.

Summary:

1. The decrease in histamine formation 10 min. after the addition of thyroid extracts is caused by the following factors:

a) the consumption of histamine by diamine oxidase and histamine methyltransferase (largely inhibited by aminoguanidine and chlorpromazine); b) the formation of a complex between histidine and pyridoxal phosphate; c) the instability of the enzyme (decreased by glutathione); d) incubation under N_2 (avoided by using O_2).

2. Optimal conditions for determination of specific histidine decarboxylase of thyroid glands are: $6,25 \cdot 10^{-4}M$ aminoguanidine, $1 \cdot 10^{-3}M$ chlorpro-

mazine, $10^{-2}M$ glutathione and substrate saturation ($10^{-2}M$ histidine). Under these conditions about 12,7 pmoles histamine/mg protein and min., i.e. 27 μg histamine/100 mg protein and 3 h were formed, respectively.

3. $1 \cdot 10^{-3}M$ aminoguanidine and $5 \cdot 10^{-3}M$ chlorpromazine inhibit the specific histidine decarboxylase by 90%.

4. The importance of these results for the detection and determination of the specific histidine decarboxylase of various organs, and the sensitivity and specificity of fluorometric and isotopic methods are discussed.

* Postanschrift: Prof. Dr. Dr. E. WERLE, 8 München 15, Nußbaumstraße 20.

Bei der Bestimmung der spezifischen Histidindecaboxylase (EC4.1.1.22, L-Histidin-Carboxy-Lyase) wurden bisher einige Faktoren wenig berücksichtigt, die zu niedrige Werte verursachen können, wie Histaminverbrauch durch ungenügende Hemmung der oxydativen Desaminierung¹ und N-Methylierung², Bildung eines hemmenden Komplexes zwischen Substrat und Coenzym³⁻⁵ und Instabilität des Enzyms während einer Inkubationszeit von 3 Stunden. Daher wurden mit der spezifischen Histidindecaboxylase der Schweineschilddrüse⁶ Inkubationsbedingungen erarbeitet, die eine konstante Histaminbildung über längere Zeit gewährleisten.

Methodik

Ansätze: Zur Enzymbestimmung wurden Rohextrakte verwendet: Schilddrüsen wurden in 2 Vol. dest. Wasser homogenisiert, 1 Min. bei 1800 × g zentrifugiert, der Überstand diente als Enzymlösung. Die Ansätze in WARBURG-Gefäßen enthielten im *Hauptgefäß* 0,8 ml Extrakt, entsprechend 0,3 g Gewebe bzw. 30 mg Zellprotein (²/₃ des Gewebsproteins wurden als extracelluläres Speicherprotein [Thyroglobulin] abgezogen^{6a}), 1,5 ml 0,4M Phosphatpuffer (KH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7,0 und verschiedene Zusätze, gelöst in dest. Wasser s. S. 321. Im *Kipper* befanden sich 0,5 oder 0,3 ml L-Histidinlösung (Endkonzentration im Ansatz 1×10^{-2} M). Gesamt-Endvolumen 3,0 ml; *Pufferendkonzentration* 0,2M⁶, End-pH 7,0⁶. Die Ansätze wurden 10 Min. bei Raumtemperatur am Manometer entweder mit N₂ (Ansätze mit Amino-guanidin allein) oder O₂ begast, nach Substratzugabe bei 37°C in der WARBURG-Apparatur inkubiert und die Reaktion nach 5, 15, 30 oder 180 Min. durch Zugabe von 0,5 ml 3N HClO₄ unterbrochen. Als Maß für die Enzymaktivität diente das neugebildete Histamin.

¹ E. WERLE, in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, Bd. VIa, S. 678, Springer-Verlag Heidelberg 1964.

² D. D. BROWN, J. AXELROD u. R. TOMCHICK, Nature [London] **183**, 680 [1959]; J. biol. Chemistry **234**, 2948 [1959].

³ H. F. SCHOTT u. W. G. CLARK, J. biol. Chemistry **196**, 449 [1952].

⁴ P. HOLTZ u. E. WESTERMANN, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **231**, 311 [1957].

⁵ E. WERLE u. D. AURES, Psychiat. Neurol. [Basel] **140**, 227 [1960].

⁶ E. WERLE u. W. LORENZ, Biochem. Pharmacol. **15**, 1059 [1966].

^{6a} J. GRAB, Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Pathol. Pharmacol. **172**, 586 [1933].

Histaminbestimmung: Aus den eiteiweißen Ansätzen wurde Histamin nach SHORE et al.⁷ in der Modifikation von BURKHALTER⁷ mit alkalisiertem Butanol/Chloroform 3:2 extrahiert, nach Waschen mit 0,1N NaCl-gesätt. NaOH mit Hilfe von 15 ml n-Heptan in 0,1N HCl übergeführt und als Kondensat mit o-Phthaldialdehyd im Zeiss-Spektrafluorometer gemessen. Bei Kontrollversuchen wurden so 80–85% des eingesetzten Histamins wiedergefunden. Die fluorometrischen Meßergebnisse stimmten dabei wie in früheren Untersuchungen⁶ mit gelegentlich am isolierten Meer-schweinchenileum durchgeführten Histaminbestimmungen überein. Bei diesen biologischen Tests auf Histamin wurde die dem Histamin zugeschriebene Aktivität durch Antistin vollständig gehemmt.

Proteinbestimmung: Der Eiweißgehalt der Extrakte wurde mit der Biuretreaktion nach WEICHSELBAUM⁸ bestimmt.

Enzymaktivität: Entsprechend den Richtlinien der IUB⁹ wird die spezif. Enzymaktivität in pMol Histaminneubildung je mg Zellprotein und Min. (μU/mg Protein) angegeben. (Bisher übliche Enzymeinheiten μg Histaminneubildung je 100 mg Protein und 3 Std.).

Verwendete Reagentien s. l. c.⁶: Chlorpromazin (2-Chlor-10- [3-dimethylamino-propyl]-phenothiazinhydrochlorid) verdanken wir den Farbenfabriken Bayer.

Ergebnisse

Es gelang, die einleitend erwähnten Störfaktoren auf folgende Weise auszuschalten:

1. Ungenügende Hemmung der Diaminoxidase

Die Schilddrüse enthält Diaminoxidase (EC 1.4.3.6)¹⁰. Entgegen der bisher geltenden Meinung ist $1 \cdot 10^{-4}$ M Aminoguanidin¹¹ nicht ausreichend, um die Diaminoxidase wirksam zu hemmen. Nach unseren Messungen ist eine Konzentration von $6,25 \cdot 10^{-4}$ M notwendig; $1 \cdot 10^{-3}$ M Aminoguanidin hemmt die Histidindecaboxylase um 90%, bezogen auf den optimalen Wert.

⁷ P. A. SHORE, A. BURKHALTER u. V. H. COHN jr., J. Pharmacol. exp. Therapeut. **127**, 182 [1959]; A. BURKHALTER, Biochem. Pharmacol. **11**, 315 [1962].

⁸ T. E. WEICHSELBAUM, Amer. J. clin. Pathol. **10**, 40 [1946].

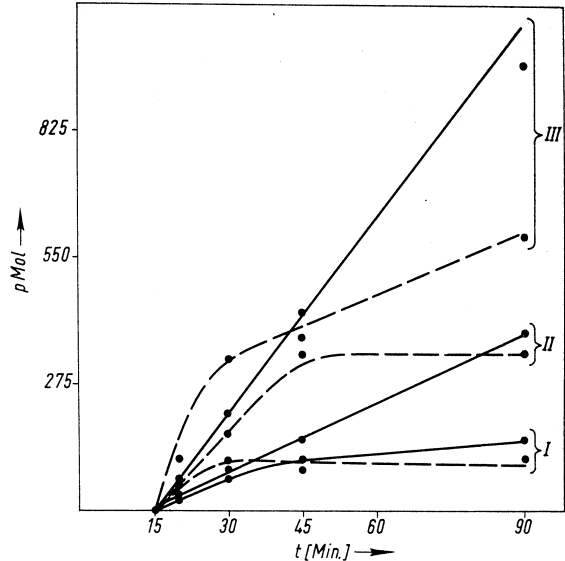
⁹ Report Commission Enzyme, JUB-Sympos. Series 20, Pergamon Press, Oxford 1961.

¹⁰ W. LORENZ, J. KUSCHE u. E. WERLE, Pharmakologisches Colloquium Freiburg, 10. 2. 1967.

¹¹ H. SCHIEVELBEIN u. E. WERLE, unter Mitarbeit von W. LORENZ, in Hoppe-Seyler/Thierfelder, Handb. d. physiol.- u. pathol.-chem. Analyse, Bd. VIc, S. 515, Springer-Verlag, Heidelberg 1966.

Histidindecaboxylaseaktivität bei Inkubation in O_2 - bzw. N_2 -Atmosphäre. Ordinate: Gebildete Menge Histamin in pMol. ● ——— ●: N_2 -Atmosphäre; ● ——— ●: O_2 -Atmosphäre.

Der nach 15 Min. Vorinkubation bei $37^\circ C$ erreichte Wert wurde als Nullwert abgezogen. Kurvenpaar I: Vorinkubation mit Substrat, dann Zugabe von GSH; Kurvenpaar II: Vorinkubation mit GSH, dann Zugabe von Substrat; Kurvenpaar III: Vorinkubation ohne GSH und Substrat, dann beides zugesetzt. Sonstige Inkubationsbedingungen s. S. 320 mit den unten angegebenen Zusätzen.



2. Histaminverbrauch durch *N*-Methylierung

Die Histamin-Methyltransferase (EC 2.1.1.8) der Schilddrüse¹² ist durch $1 \cdot 10^{-3} M$ Chlorpromazin² zur Bestimmung der Histidindecaboxylase optimal hemmbar. Bei $5 \cdot 10^{-3} M$ Chlorpromazin hat die Histidindecaboxylase nur noch $1/10$ dieses optimalen Wertes.

3. Instabilität des Enzyms

Auch in Gegenwart optimaler Aminoguanidin- und Chlorpromazinkonzentrationen biegt die Zeit-Umsatz-Kurve nach 15–30 Min. noch um, infolge Komplexbildung zwischen Histidin und Pyridoxalphosphat, wodurch die Histidindecaboxylase rasch gehemmt wird^{3–5,13}, und infolge Instabilität des Enzyms. Beides kann durch $1 \cdot 10^{-2} M$ Glutathion stark vermindert werden. Die unspezif. Histidindecaboxylase der Leber und Niere wird im Gegensatz zur hier untersuchten spezif. Histidindecaboxylase durch Glutathion gehemmt¹⁴.

Unter diesen Bedingungen wird eine spezif. Enzymaktivität von $12,7 \mu U/mg$ Zellprotein (bzw. $27 \mu g$ je $100 mg$ Protein und 3 Std.) gemessen, eine spezif. Aktivität also, die zu den höchsten in Säugerorganen gehört.

¹² J. AXELROD, P. P. LEAN, R. W. ALBERS u. H. WEISSBACH, in S. S. KETY u. J. ELKES, Regional Neurochemistry, p. 307, Pergamon Press, Oxford 1961.

¹³ E. WERLE u. W. LORENZ, diese Z. 338, 251 [1964].

¹⁴ E. WERLE u. K. KRAUTZUN, Biochem. Z. 296, 315 [1938].

4. Inkubation unter N_2

Aus der Abbildung ist zu sehen, daß Inkubationen in O_2 -Atmosphäre nach Vorinkubation ohne Histidin und Glutathion von den angegebenen Bedingungen am günstigsten sind.

Auf Grund dieser Befunde schlagen wir für die Bestimmung der spezif. Histidindecaboxylase der Schweineschilddrüse vor:

1. $10^{-2} M$ Histidin;
2. Zusätze in Endkonzentrationen: Aminoguanidin $5 \cdot 10^{-4}$ bis $6,25 \cdot 10^{-4} M$, Chlorpromazin $1 \cdot 10^{-3} M$, Glutathion $1 \cdot 10^{-2} M$.
3. O_2 -Atmosphäre, 15 Min. Vorinkubation bei $37^\circ C$ ohne Histidin und Glutathion, Messung nur im Bereich der linearen Zeit-Aktivitätskurve, also bis 60 Min.
4. Die Enzymaktivität wird angegeben als Differenz von Haupt- und Nullwert (= Ansatz mit säureinaktiviertem Enzym) in $\mu U/mg$ Zellprotein.

Ob diese Bedingungen auch für andere Organe gelten, muß im einzelnen überprüft werden.

Diskussion

Im Schilddrüsenextrakt wird die Messung der Aktivität der Histidindecaboxylase vor allem durch Diaminoxidase und Histamin-Methyltransferase gestört, die durch Aminoguanidin und Chlorpromazin hemmbar sind. Da diese Stoffe auch die Histidindecaboxylase hemmen können, mußten

ihre Konzentrationen so gewählt werden, daß die Histidindecaboxylaseaktivität nicht schwerwiegend beeinflußt wird. Das ist der Fall bei $6,25 \cdot 10^{-4}M$ Aminoguanidin und $1 \cdot 10^{-3}M$ Chlorpromazin. Der Nachweis der Histaminbildung im Leeransatz⁶, also nur mit endogenem Histidin, zeigt, daß die Fluoreszenzverfahren zur Messung der Enzymaktivität den Tracermethoden an Empfindlichkeit kaum nachstehen. Hinsichtlich der Spezifität können auch Methoden, die zur Bestimmung der Histidindecaboxylaseaktivität das ^{14}C -carboxylmarkierte Histidin als Substrat verwenden¹⁵, zu

¹⁵ D. AURES u. W. G. CLARK, *Analyt. Biochem.* [New York] **9**, 35 [1964].

falschen Schlüssen führen, dann nämlich, wenn die Decarboxylierung erst nach Transaminierung¹⁶ erfolgt, oder wenn, wie z. B. in Leberextrakten, zusätzlich Histidase¹⁷ über Ringöffnung und Decarboxylierung von Glutaminsäure¹⁸ zur $^{14}CO_2$ -Entwicklung beitragen.

¹⁶ G. WOLF, P. L. WU u. W. W. HECK, *J. biol. Chemistry* **222**, 159 [1956].

¹⁷ E. LEUTHARDT, *Lehrbuch der Physiologischen Chemie*, 5. Auflage, S. 404, Verlag W. de Gruyter & Co., Berlin 1961.

¹⁸ E. B. CHAIN, M. M. COHEN u. F. POCCHIARI, *Proc. Roy. Soc. [London]*, Ser. B **156**, 163 [1963].