

Untersuchungen zur histaminstimulierbaren Radikalproduktion
im Mäusedarm:
Funktionelle und morphologische Darstellung der
Diaminoxidase im muralen Intestinum

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Zahnheilkunde

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Gabriel, Naomi Alexandra Andrea

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1.Berichterstatter: Professor Dr. H. Heinle
2.Berichterstatter: Professor Dr. P. Enck

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	7
1.1. Histamin als multifunktionaler Wirkstoff im Körper	7
1.1.1. Allgemeine Bedeutung von Histamin	7
1.1.2. Bedeutung von Histamin bei allergischen Reaktionen	9
1.1.3. Bedeutung von Histamin im Darm	10
1.1.4. Histaminunverträglichkeit	12
1.2. Diaminoxidase	14
1.3. Histamin und Oxidativer Stress	16
1.4. Anatomie des Mäusedünndarms	17
1.5. Fragestellung	21
2. Material	22
2.1. Geräte	22
2.2. Chemikalien und Materialien	23
2.3. Lösungen	24
2.4. Biologische Materialien	27
3. Methoden	30
3.1. Gewebepräparation für den Nachweis der histaminstimulierbaren Radikalproduktion	30
3.2. Methoden zur Charakterisierung der Radikalquelle bzw. zum Nachweis der Diaminoxidase	30
3.2.1. Stimulation der Radikalproduktion durch Histamin und Putrescin	30
3.2.2. Hemmung der Enzymaktivität durch Antikörper	32
3.2.3. Nachweis des Enzyms mit Hilfe von Western-Blotting	33
3.2.4. Lokalisation des Enzyms in der Darmwand mit Hilfe von immunohistologischen Nachweisverfahren	35
3.3. Antioxidative Eigenschaften der Darmwand	37
3.3.1. Radikalproduktion durch AAPH- Reaktion	37
3.3.2. Hemmung der AAPH-Reaktion durch verschiedene Darmwandpräparate	38

4. Ergebnisse	40
4.1. Radikalproduktion des Darmgewebes	40
4.1.1. Histamininduzierte Radikalproduktion in verschiedenen Gewebepreparaten	41
4.1.2. Putrescininduzierte Radikalproduktion im Dünndarm	44
4.1.3. Hemmung der Histamininduzierten Radikalbildung durch Antikörper	46
4.2. DAO Nachweis mit Hilfe von Western-Blotting	49
4.3. Immunohistochemische Lokalisation der DAO in der Darmwand	50
4.4. Antioxidative Eigenschaften der Darmwand	57
5. Diskussion	59
5.1. Bedeutung der DAO für den Histaminabbau beim Menschen	59
5.2. Nachweis der Diaminoxidase im Darmgewebe	60
5.2.1. Funktioneller Nachweis über Luminol-verstärkte CL	60
5.2.2. Nachweis durch Western Blot	60
5.2.3. Nachweis durch Immunohistochemie	61
5.2.4. Bestimmung der Antioxidativen Kapazität	62
6. Zusammenfassung	63
7. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	65
8. Literaturverzeichnis	66
9. Danksagung	74

Abkürzungsverzeichnis

AAPH	2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid
Ak	Antikörper
AUC His	Area under the curve nach Histaminzugabe
AUC L	Area under the curve vor Histaminzugabe
BG	Bindegewebe
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CL	Chemilumineszenz
DAO	Diaminoxidase
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
E	Epithel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His	Histamin
HIT	Histaminintoleranz
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
HRP	Horse-Raddish-Peroxidase = Meerrettich-Peroxidase
IL 4	Interleukin 4
IgE	Immunglobulin E
L	Lumen
MAO-B	Monoaminoxidase B
M	Muscularis
Mu	Mucosa
OT	Objektträger
PALP	Pyridoxalphosphat
Put	Putrescin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S	Submucosa
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis/ Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
RT	Raumtemperatur
TBS/TWEEN	Tris Buffered Saline/Polysorbate
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
Z	Zotte

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Histamin als multifunktionaler Wirkstoff im Körper

1.1.1 Allgemeine Bedeutung von Histamin

Histamin ist ein vielfältig in der belebten Natur vorkommender Wirkstoff, der in tierischen Organismen und im Menschen als Gewebshormon und Neurotransmitter agiert und darüber hinaus auch im Pflanzenreich und in Bakterien nahezu ubiquitär zu finden ist. (*Vogelreuter 2012, Steimecke 2006*).

Es zählt zu der Gruppe der biogenen Amine und entsteht im Zuge des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels durch Decarboxylierung der basischen Aminosäure Histidin (siehe Abb. 1).

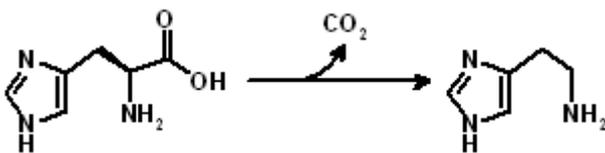


Abb. 1 Decarboxylierung von Histidin zu Histamin

Im Menschen kann Histamin exogen, d.h. über die Nahrung aufgenommen werden, oder aber endogen, also von spezifischen Zellen selbst produziert, gespeichert und sezerniert werden.

Bei diesen Zellen handelt es sich um Mastzellen, basophile Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, Blutplättchen, histaminerge Neurone und enterochromaffine Zellen. Während die Biosynthese von Histamin meist im Golgi-Apparat dieser Zellen erfolgt, dienen die cytoplasmatischen Granula vor allem seiner Speicherung, bevorzugt in Komplexbildung an Heparin. (*Vogelreuter 2012, Aschenbach et al 2009, Maintz und Novak 2007*).

Die Sekretion hängt sehr stark davon ab, an welcher Funktion Histamin beteiligt ist, und wird später noch ausführlicher abgehandelt.

Auf molekularer Ebene vermittelt Histamin seine Wirkungen über eine Aktivierung der G-Protein gekoppelten Histamin-Rezeptoren H₁, H₂, H₃ und H₄.

H₄-Rezeptoren wurden bei dem Versuch, den H₃-Rezeptor zu klonen, erstmals im Jahr 2000 beschrieben, eine genauere Erforschung dieses Rezeptors erfolgte in den Jahren darauf u.a. von *Leurs et al. 2009, Parson und Ganellin 2006*. Da die H₄-Rezeptoren vornehmlich auf Zellen des Immunsystems und auf Mastzellen exprimiert werden, bewirkt ihre Stimulation mit Histamin Entzündungsreaktionen, wie zum Beispiel akute Inflammationen, Asthma, Allergien, Colitis, rheumatische Arthritis und chronischen Juckreiz.

H₃-Rezeptoren sind auf Neuronen im gesamten Nervensystem, insbesondere präsynaptisch, zu finden. Über eine negative Rückkopplung vermitteln sie die Hemmung bzw. Drosselung der weiteren Histamin-Ausschüttung und regulieren zusätzlich die Freisetzung weiterer Neurotransmitter wie zum Beispiel Acetylcholin, Noradrenalin und Serotonin. Diese sind u.a. an Regelkreisen des Schlaf-Wach-Rhythmus, des Hunger- und Durstgefühls, des Blutdrucks und der Körpertemperatur beteiligt.

Die über H₂-Rezeptoren vermittelten Wirkungen betreffen vor allem das Herz (positiv inotrop und chronotrop) und die Steigerung der Magensäureproduktion.

H₁-Rezeptoren sind sowohl im ZNS als auch in inneren Organen zu finden. Ihre Stimulation bewirkt vielfältige Reaktionen wie Übelkeit bis hin zum Erbrechen, Tonussteigerung der glatten Muskulatur in Bronchien, Darm, Uterus und in großen Arterien, hingegen Vasodilatation in Arteriolen mit erhöhter Endothelpermeabilität. Diese Mechanismen haben unter anderem Hautrötungen, Juckreiz, Herzrhythmusstörungen, nasale Obstruktionen und Dyspnoe zur Folge (*Vogelreuter 2012, Leurs et al. 2009, Zampeli and Tiligada 2009, Maintz und Novak 2007, Parsons und Ganellin 2006*).

Für den Abbau von Histamin stehen zwei verschiedene enzymatische Mechanismen zur Verfügung (siehe Abb. 2).

Zum einen extrazellulär über eine oxidative Desaminierung durch die Diaminoxidase, bei der Histamin zu Imidazolacetaldehyd unter Bildung von Ammoniak und Wasserstoffperoxid abgebaut und durch spätere Ribosylierung über die Nieren ausgeschieden wird. Ein alternativer Weg erfolgt intrazellulär über Ringmethylierung durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT). Das dabei entstandene N-Methylhistamin wird durch die MAO-B zu N-Methylimidazolacetaldehyd und weiter

über eine Aldehyddehydrogenase zu N-Methyl-Imidazolessigsäure abgebaut, die ebenfalls über den Harn ausgeschieden wird.

(Vogelreuter 2012, Maintz et al. 2006, Wilflingseder und Schwelberger 2000).

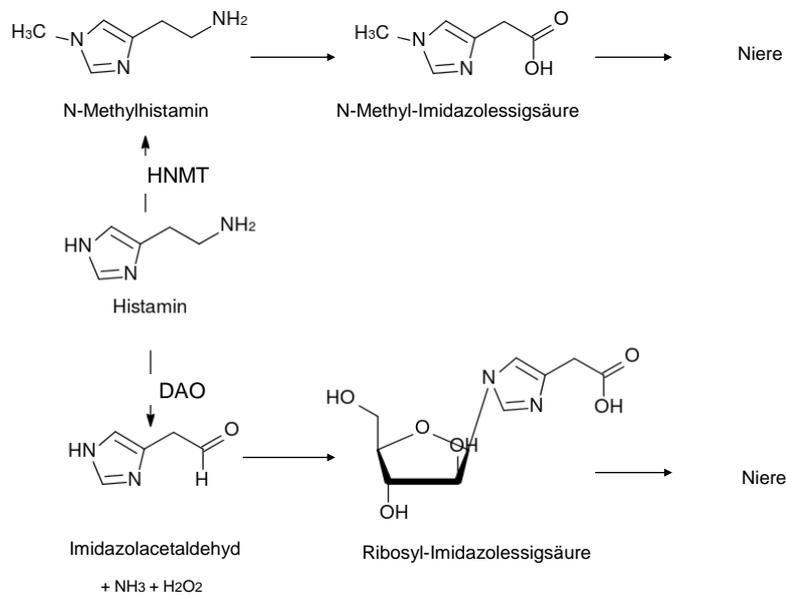


Abb. 2 Schematische Darstellung des Histaminabbaus

1.1.2 Bedeutung von Histamin bei allergischen Reaktionen

Man unterscheidet vier Typen von Allergien. Während die Typen II, III und IV eher selten vorkommen und dadurch gekennzeichnet sind, dass sie durch Immunglobuline, Immunkomplexe und T-Zellen vermittelt werden, spielen bei der allergischen Reaktion des Typ I, auch Soforttyp genannt, Antikörper der IgE-Klasse, Mastzellen und basophile Granulozyten eine große Rolle.

Bei einem Erstkontakt des Allergens mit T- und B-Lymphozyten wird das Antigen erkannt und über eine anschließende Kreuzreaktion Interleukin-4 (IL4) freigesetzt, das nun die Differenzierung der B-Lymphozyten in IgE-Antikörper-produzierende Plasmazellen vermittelt. Die IgE-Ak werden zu zellständigen Antikörpern, indem sie an basophile Granulozyten und Mastzellen binden.

Kommt es zu einem Zweitkontakt, so bindet das Allergen an den zellständigen IgE-Antikörper, was zu einer Degranulation der Zellen und zur Freisetzung diverser

Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Leukotriene und Histamin führt. (Ladetzki-Baehs et al. 2004, Müller-Werdan und Werdan 1999 und Raithel et al. 1999) Das freigesetzte Histamin ruft innerhalb der ersten sechzig Minuten (Ladetzki-Baehs et al. 2004) die typischen Symptome einer Allergie hervor: Über H1-Rezeptoren kommt es zu Quaddelbildung, Rötungen und Juckreiz auf der Haut, Bindehautentzündungen im Auge, Bronchokonstriktion mit Atemnot, Kreislaufdysregulation bis hin zum anaphylaktischen Schock.

Neben diesen typischen allergischen Reaktionen gibt es aber auch einen IgE-unabhängigen Mechanismus, der zur Degranulation und somit zur Histaminausschüttung aus Mastzellen und Granulozyten führt. Stimuli sind dabei alle Mechanismen, die die intrazelluläre cAMP Konzentration senken (Vogelreuter 2012, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006) oder wie im Falle des Calciumionophor A23187 den zytosolischen Kalziumspiegel erhöhen. (Mehrle 2004).

Solche nichtallergischen Histaminliberatoren können einerseits endogen sein, wie zum Beispiel bestimmte Zytokine (IL-1 und IL-3) und Komplementfaktoren (C5a, C3a), physiologische Faktoren wie das Neuropeptid Substanz P, Vasoaktives intestinales Polypeptid (VIP) oder das Hormon Somatostatin. (Gross 2007, Schwengberg 1998). Andererseits auch exogen, wie Medikamente, beispielsweise bestimmte Diuretika mit dem Wirkstoff Amilorid oder Antibiotika mit den Wirkstoffen Cefuroxim, Isoniazid und Chloroquin aber auch Röntgenkontrastmittel, Insektengifte (Mellitin, Mastoparan) oder Hypoxie können exogene Histaminliberatoren darstellen. (Vogelreuter 2012, Gross 2007, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006, Schwengberg 1998).

Die IgE unabhängige Aktivierung ist im Gegensatz zu der IgE abhängigen nach zwei Minuten abgeschlossen. (Mehrle 2004).

1.1.3 Bedeutung von Histamin im Darm

Histamin erfüllt im Magen-Darm-Trakt vielfältige Aufgaben, zu den drei wohl am wichtigsten gehören die Steigerung der Magensäureproduktion, die Regulierung der Magen-Darmmotilität und die Steigerung der Dünndarmsekretion (Byung et al. 2013, Sander et al. 2006).

Histamin kommt im gesamten Gastrointestinaltrakt vor allem in ECL-Zellen, in geringerem Maße in der Basis der Magenmucosa, in Mastzellen und Nervenfasern des enterischen Nervensystems vor. Produziert wird es vornehmlich in ECL-Zellen und gespeichert in Mastzellen. Hinzu kommen darmeigene Bakterien, die ebenfalls in der Lage sind Histamin zu produzieren.

Die entsprechenden Histamin-Rezeptoren der Darmwand werden unter anderem auf Enterozyten, Bindegewebszellen, Muskelschichten, Blutgefäßen, Immunzellen und Ganglienzellen des Myentericusplexus exprimiert.

Es gibt mehrere Möglichkeiten, wie es zu erhöhten Histaminspiegeln im Darm kommen kann:

Zum einen über die Zufuhr histaminreicher Nahrung: hierzu zählen vor allem Lebensmittel mit einem hohen Gehalt an Bakterien und Hefen, die eine hohe L-Histidin-Decarboxylase-Aktivität besitzen und somit das vorhandene Histidin schon vor dem Verzehr zu Histamin abgebaut haben. Beispiele hierfür sind: unter anderem lang gereifte Käsesorten (Bsp. Emmentaler), bestimmtes Gemüse (Bsp. Sauerkraut), Pökelfleisch, Thunfisch, Makrelen und Rotwein. (*Vogelreuter 2012, Böttcher und Klimek 2008, Maintz und Novak 2007 Rosler 2007, Maintz et al. 2006*).

Eine andere Möglichkeit für erhöhte Histaminspiegel im Darm ist das Vorkommen von solchen Darmbakterien, die das biogene Amin selber produzieren. Von den bis zu über 100 verschiedenen Bakterienspezies im Darm gehören unter anderem *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Lactobacillus reuteri*, *Pediococcus*, *Proteus* und der Hefepilz *Candida albicans* zu den histaminproduzierenden. (*Steimecke 2006, Sarkadi 2004, Bodmer et al. 1999*). Bezüglich der Mikrobiologie des Darms gibt es sicher noch viel zu forschen, doch spricht Vieles dafür, dass jeder Mensch durch die Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und intestinalen Bakterien quasi in symbiotischer Weise die für ihn gesunde individuelle Bakterienpopulation kultiviert. Wird dieser Zustand gestört, zum Beispiel durch Antibiotika oder kontaminierte Nahrung, kann es vorkommen, dass sich die Darmflora verändert und es zu Fehlbesiedelungen kommt, bei denen die histaminproduzierenden Bakterien überhand nehmen. (*Steimecke 2006, Blatz 1999, Müller et al 1989*).

Eine dritte Ursache für eine Erhöhung von Histamin liegt in einer gesteigerten Freisetzung durch allergische Reaktionen im Darm selber.

Grundlage hierfür ist die Tatsache, dass dieser auch ein wichtiges Organ des Immunsystems darstellt und dass alle wichtigen Zellen der Immunabwehr in der

Darmwand vorhanden sind (siehe Kap. 1.3). So können durch Bakterien ausgelöste allergische Reaktionen Mastzellen und Granulozyten zur Histaminausschüttung anregen oder Allergene, die über die Nahrung in den Darm gelangt sind, die darmeigene Histaminausschüttung stimulieren.

Da Histamin bei einem Histaminüberschuss aus dem Darm in den Blutkreislauf gelangen (*Aschenbach et al. 2009, Ahrens et al. 2005, Bodmer et al. 1999, Wollin et al. 1998, Wolvekamp et de Bruin 1994*) und dort einen pathologischen Plasmaspiegel herbeiführen kann, sind nicht selten allgemeine Folgen eines zu hohen Histaminspiegels allergieähnliche Symptome wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Schwindel, Flush, Fließschnupfen, nasale und bronchiale Obstruktion, Juckreiz, Arrhythmien und Hypotonie. (*Vogelreuter 2012, Böttcher und Klimek 2008, Maintz und Novak 2007, Rosler 2007*).

Die Auswirkungen erhöhter Histaminspiegel auf die Darmfunktion selbst sind Störungen von Sekretion und Resorptionsvorgängen sowie der peristaltischen Motilität und verursachen damit Flatulenzen, Diarrhoe, diffuse Bauchmerzen und Koliken. (*Vogelreuter 2012, Maintz und Novak 2007, Sarkadi 2004*).

1.1.4 Histaminunverträglichkeit

Ca. 1% der Bevölkerung ist von einer Histaminintoleranz (HIT) betroffen, davon sind die Mehrheit, ca. 80%, Frauen mittleren Alters. Die Krankheitssymptome verschwinden während einer Schwangerschaft, da die DAO-Produktion erhöht ist, nach Beendigung der Schwangerschaft treten die Symptome jedoch meist wieder auf. (*Vogelreuter 2012, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006*).

Die Histamin-Intoleranz, auch Histaminose genannt, beschreibt die Unverträglichkeit von mit der Nahrung aufgenommenem Histamin. Im Vergleich zu einer Allergie handelt es sich bei der Histaminintoleranz allerdings um eine Pseudoallergie. (*Vogelreuter 2012, Böttcher und Klimek 2008, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006*).

Die Ursache wird in Verbindung mit einem Mangel der Histamin abbauenden Enzyme bzw. in einem Missverhältnis zwischen Zufuhr und Abbau des Histamins vermutet. (*Böttcher und Klimek 2008, Maintz und Novak 2007, Rosler 2007, Maintz et al. 2006, Sattler et al. 1988*).

Eine verminderte Aktivität der Diaminoxidase, dem hauptverantwortlichen Enzym des Histaminabbaus, kann entweder durch eine Darmerkrankung verursacht sein (Colitis ulcerosa, Morbus Crohn und Karzinomen), bei welcher die Enterozyten geschädigt oder vermindert sind, oder aber durch die Gegenwart anderer biogener Amine wie Putrescin und Tyramin, oder Alkohol und Medikamente wie z.B. Röntgenkontrastmittel, Narkotika mit Wirkstoff Thiopental und Amilorid Diuretika, die die DAO kompetitiv hemmen.

Neuerdings wird die Möglichkeit einer genetischen Disposition diskutiert, welche zu einer verringerten DAO Produktion führt. Auch bei Erkrankungen wie chronischem Nierenversagen, Mastozytose, Virushepatitis und fortgeschrittener Leberzirrhose konnte eine reduzierte DAO-Aktivität festgestellt werden. (*Vogelreuter 2012, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006, Steimecke 2006*).

Die klinische Relevanz der DAO-Abbaustörung mit dem Krankheitsbild einer HIT ist umstritten, da ein klarer Zusammenhang offen bleibt. Tatsächlich gibt es aber Menschen mit histamininduzierten Beschwerden, und es besteht eine Korrelation zwischen einer verminderten DAO-Aktivität und einem erhöhten Histaminspiegel im Blut. (*Maintz und Novak 2007, Kuefner et al. 2004*).

Wichtig für die Diagnose der Histamin-Intoleranz ist eine detaillierte Anamnese, in welcher abgeklärt wird, ob nicht die Einnahme von Medikamenten oder eine Krankheit die Ursache für einen erhöhten Histaminwert oder eine eingeschränkte Enzymaktivität ist. Zusätzlich sollte ein Mangel an Kupfer und an Pyrodoxalphosphat (PALP), der aktiven Form des Vitamin B6, ausgeschlossen werden, da diese Kofaktoren der DAO sind und bei einem entsprechenden Mangel der Abbau nicht stattfinden kann. Ebenso sollten ein Hautpricktest und eine Bestimmung des allergenspezifischen IgE erfolgen, um sicher zu gehen, dass keine Nahrungsmittelallergie vorliegt. (*Vogelreuter 2012, Böttcher und Klimek 2008, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006*).

Nach der Abklärung kann eine Blutanalyse bezüglich der Diaminoxidaseaktivität im Serum und eine Urinbestimmung der Methylhistaminkonzentration (Normwert im 12 Stunden Urin 5 – 25 µg) durchgeführt werden. Liegt der Wert der DAO unter 3 U/ml so ist, laut einigen Autoren, eine Histaminintoleranz anzunehmen, da das Enzym nur eine geringe Aktivität aufweist; bis 10 U/ml ist eine Histaminintoleranz wahrscheinlich und bei Werten über 10 U/ml ist eine Histaminintoleranz eher unwahrscheinlich, da hier das Enzym eine normale Aktivität aufweist (*Vogelreuter*

2012, SCiOTEC 2011, Böttcher und Klimek 2008, Maintz et al. 2006). Nach einer 14tägigen strengen histaminfreien Diät wird der Bluttest wiederholt; leidet der Patient an einer HIT, so sind die Histaminwerte nach diesen 14 Tagen gesunken und der DAO-Spiegel gestiegen.

Wurde eine Histaminintoleranz diagnostiziert, so sind zum einen Histamin freisetzende Medikamente und Nahrungsmittel zu meiden, zum anderen gibt es als therapeutische Maßnahmen das Medikament DAOsin, ein Nahrungsergänzungspräparat, welches aus einem DAO Proteinextrakt, das aus Schweinenieren stammt, besteht und vor jedem Essen eingenommen werden soll. Auch Mastzellstabilisatoren wie die Dinatriumcromoglicinsäure kommen zum Einsatz. Für eine sofortige Linderung der Symptome werden meist Antihistaminika der dritten Generation eingesetzt, welche vornehmlich an H1-Rezeptoren angreifen und die Sekretion und Wirkung von Histamin abschwächen oder gar aufheben. Die Diaminoxidase als histaminabbauendes Enzym spielt somit eine nicht unerhebliche Rolle sowohl in der Symptomatik einer HIT als auch in der Diagnose einer solchen.

1.2 Diaminoxidase

Die Diaminoxidase wurde ursprünglich lediglich als histaminabbauendes Enzym beschrieben, weswegen sie lange Zeit als Histaminase bezeichnet wurde. Mittlerweile ist bekannt, dass sie auch beim Abbau anderer Amine wie Cadaverin, Putrescin und Spermidin, welche eine wichtige Rolle bei Zellproliferation und Zelldifferenzierung spielen, beteiligt ist. (Wilflingseder und Schwelberger 2000, Raithel et al. 1998, Mizuguchi et al. 1994, Sessa und Perin 1994, Mennigen et al. 1989).

Synonyme der Diaminoxidase sind DAO, DAO1, DAOX, Diamino oxhydrase, Amiloride binding Protein (ABP), ABP1, AOC1, Amiloridsensitive Aminoxidase, Kidney amine oxidase (KAO) und Histaminase, wobei es sich bei ABP1, AOC1 und DAO1 um die Gennamen der DAO handelt. (Bruchhausen et al. 1999, Nakos und Gossrau 1994, sigmaaldrich, uniprot).

Strukturell betrachtet handelt es sich bei der Diaminoxidase um ein lösliches, homodimeres Glykoprotein, bestehend aus 751 Aminosäuren (Schwelberger 2004,

uniprot). Zu den Angaben bezüglich des Molekulargewichtes der DAO gibt es Abweichungen bei den Autoren. So wird die menschliche DAO in „Hagers Handbuch“ (*Bruchhausen et al. 1999*) als ein 253kDa schweres Enzym mit einer UE von 80kDa beschrieben, wohingegen andere Autoren sie mit einem Molekulargewicht von 200kDa darstellen und eine UE zwischen 70-125kDa angeben. (*Maintz und Novak 2007, Wilfingseder und Schwelberger 2000, Mizuguchi et al. 1994*). Bei der DAO der Ratte wird ein Molekulargewicht von 182kDa und 92kDa als UE beschrieben, wobei die Untereinheiten sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen über Disulfidbrücken untereinander verbunden sind. (*Wilfingseder und Schwelberger 2000, Bruchhausen et al. 1999, Mizuguchi et al. 1994, uniprot*) Sie besitzt das für Kupfer-abhängige Oxidasen spezifische Topaquanon im aktiven Zentrum (*Schwelberger 2004, Wilfingseder und Schwelberger 2000, uniprot*), als Kofaktoren dienen Pyridoxalphosphat (PALP) (*Vogelreuter 2012, SCiOTEC 2011, Maintz et al. 2006*), sowie ein Kupferion und zwei Kalziumionen. (*Schwelberger 2004, uniprot*). Das pH-Optimum liegt beim menschlichen Enzym bei 7.2, bei dem aus Schwein bei 7.4 (*Schwelberger 2004*).

Die Lokalisation des humanen DAO-Gens ist auf dem Chromosom 7q36.1 (*HGNC 2013*) und besitzt 5 Exons und 4 Introns (*Schwelberger (EHRS 2013), Chassande et al. 1994*).

Die Diaminoxidase ist bei Säugetieren in zahlreichen Organen nachzuweisen, die Hauptbildungsorte sind aber der Dünndarm, die Leber, die Nieren, Leukozyten und bei Schwangeren zusätzlich die Plazenta. (*Vogelreuter 2012, SCiOTEC 2011 Bruchhausen et al. 1999, Schwelberger et al. 1998a und b*).

Im Darm konnte gezeigt werden, dass die DAO in sekretorischen Vesikeln in den Epithelzellen gespeichert vorliegt, welche sich nahe der basolateralen Plasmamembran befinden und nach Stimulation, v.a. durch Heparin, kontinuierlich DAO nach extrazellulär freisetzen. (*Schwelberger 2004, Wilfingseder und Schwelberger 2000, Daniele und Quaroni 1990*). Aufgrund eines klassischen Signalpeptides am N-Terminus ist ihr dieser sekretorische Weg möglich. (*Schwelberger (EHRS 2013), Wilfingseder und Schwelberger 2000*).

Einige Autoren beschreiben, dass die DAO in die Lamina propria abgegeben und dort an basolaterale Zellmembrane gebunden wird. Von dort gelangt sie über die Lymphbahn in den Blutkreislauf, wo sie an Endothelzellen der Blutgefäße angelagert wird. (*Wollin et al. 1998, Wolvekamp und de Bruin 1994*). Diese Bindungsstellen der

Endothelzellen sind mit einem Heparansulfat Proteoglykan-ähnlichen Rezeptor versehen. (*Baenziger 1994, Sessa und Perin 1994*). Im Schweinedarm kommt die DAO nicht nur basolateral, sondern zusätzlich auch apikal in den Epithelzellen vor. (*Schwelberger et al. 1998b*).

Im Rahmen des Abbaus von Aminen, die für Zellproliferationen und Zelldifferenzierungen wichtig sind, übt die DAO auch einen protektiven Mechanismus als Antiproliferationsenzym aus. (*Küfner et al. 2008, Raithel et al. 1998, Schwelberger und Bodner 1998c, Wollin et al. 1998, Mizuguchi et al. 1994, Sessa und Perin 1994, Wolvekamp und de Bruin 1994, Mennigen et al. 1989, Luk et al. 1980*). Es besteht daher eine Korrelation zwischen einer reduzierten DAO-Aktivität und Erkrankungen wie ulcerative Colitis, Colonadenom, einer erhöhten Karzinomrate und Morbus Crohn. Auch fand man heraus, dass häufig chronisches Nierenversagen, Virushepatitis, fortgeschrittene Leberzirrhose und chronische Urticaria mit einer reduzierten DAO-Aktivität einhergingen. (*Vogelreuter 2012, Küfner et al. 2008, Maintz und Novak 2007, Maintz et al. 2006, Mennigen et al 1986*).

1.3 Histamin und Oxidativer Stress

Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung pathologischer Veränderungen im Darm, könnte der Zusammenhang zwischen einer verminderten DAO-Produktion und dem somit verbundenen pathologischen Histaminüberschuss sein, welcher zu oxidativem Stress und damit zu Krankheiten führen könnte.

Oxidativer Stress ist im Allgemeinen durch ein vermehrtes Vorkommen an freien reaktiven Sauerstoffmetaboliten (reactive oxygen species, ROS) gekennzeichnet und beschreibt den Zustand eines Ungleichgewichtes zwischen Prooxidantien (Substanzen, die eine radikalische Wirkung verstärken) und Antioxidantien (Substanzen, die eine radikalische Wirkung schwächen), wobei das Gleichgewicht auf Seiten der Prooxidantien verschoben ist.

Er ist ein wichtiger Bestandteil vieler physiologischer Prozesse (mitochondriale Atmungskette, Purinabbau uvm.) und wird häufig als Ursache für die Entstehung und das Fortschreiten von Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, Arteriosklerose, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht.

(*Siems et al. 2005, Gutteridge und Halliwell 1994*). Auch bei Schädigungen der Darmschleimhaut spielen oxidative Reaktionen und Histamin eine bedeutende Rolle (*Boros et al. 1991*).

Inwieweit eine Hemmung bzw. verminderte Aktivität der DAO im Darm, und der damit entstehende Überfluss an His, zum oxidativen Stress führt, ist jedoch noch nicht hinreichend geklärt. Eine eingehende Recherche in PubMed ergab vergleichsweise wenige Arbeiten zu diesem Thema. Dissertationen aus der eigenen Arbeitsgruppe konnten jedoch Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Histamin und oxidativem Stress liefern. Dabei konnten zum einen Mastzellen (*Jandaghi 2011*), zum anderen Präparate aus der Dünndarmwand durch Histamin zur Radikalproduktion stimuliert werden (*Jandaghi 2011, Merkel 2010*). Auch konnte gezeigt werden, dass ROS direkt die Motilität des Ileums beeinflussen können (*Hagelauer 2007*). Die genaue Lokalisation der zellulären Quelle ist bislang nicht klar. Es scheint jedoch denkbar, dass über diese Mechanismen Histamin zu oxidativem Stress in der Darmwand führt und so bei Histaminüberangebot oder allergischer Reaktion zur Pathologie beitragen kann.

1.4 Anatomie des Mäusedünndarms

Der Darm, als wichtigster Teil des Verdauungstraktes, wird in Dünn- und Dickdarm, die in weitere Abschnitte gegliedert werden, unterteilt.

Der Aufbau der Darmwand ist zunächst in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen histologische Quer- und Längsschnitte des Mäusedünndarms.

Die innerste Schicht zum Lumen hin wird von der Mukosa (=Schleimhaut) gebildet. Diese wird unterteilt in die Lamina epithelialis mucosae (hier befinden sich Becherzellen, Lieberkühn-Krypten, tubuläre Drüsen, Enterozyten, Panethkörnerzellen, enteroendokrine Zellen und intraepitheliale Lymphozyten), die Lamina propria mucosae (bestehend aus retikulärem Bindegewebe (Kollagen Typ III), Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten und Plasmazellen) und die Lamina muscularis mucosae (glatte Muskelzellen), die die Abgrenzung zur darmliegenden

Submucosa bildet. Kontraktionen der Lamina muscularis mucosae führen zu Schleimhautbewegungen, welche wiederum die Ausformung von längs- und querverlaufenden Falten bewirken. Ausgelöst werden diese Kontraktionen durch mechanische Reizung der Schleimhaut, wobei der Druck des Chymus meist ausreicht. Zweck des Ganzen ist das Mischen des Chymus mit dem Pankreassaft. Zur Vergrößerung der Resorptionsfläche ist die Mucosa in sog. Zotten aufgefaltet.

Die darauffolgende Schicht ist die Tela submucosa (=Submucosa).

Diese Schicht besteht vornehmlich aus lockerem Bindegewebe (BG) und ist sehr gefäßreich. In der Submucosa befindet sich der sog. Meißner Nervenplexus = Plexus submucosus, er stellt einen Teil des so genannten Enterischen Nervensystems dar und innerviert die Darmschleimhaut primär unabhängig vom Zentralen Nervensystem, jedoch unter dem Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus; außerdem gibt es dort Rezeptoren, die die Wanddehnung messen und über den Auerbachplexus die peristaltischen Bewegungen in Gang setzen.

Die nächste Schicht ist die Tunica muscularis (= Muskelschicht). Sie wird unterteilt in eine innere Ringmuskulatur und eine äußere Längsmuskulatur; dazwischen liegt der Plexus myentericus oder auch Auerbachplexus genannt, welcher für die Innervation der Darmmuskulatur verantwortlich ist. Kontraktionen der Längsmuskulatur führen zu den sog. Pendelbewegungen, welche wiederum zusammen mit der Kontraktion der Ringmuskulatur Mischbewegungen auslösen.

Die äußerste Schicht bildet die Tunica serosa. Sie gehört dem Peritoneum/Bauchfell an, welches die inneren Organe überzieht. Da sie aus einer sehr dünnen Epithelschicht besteht, kann sie nur mikroskopisch dargestellt werden.

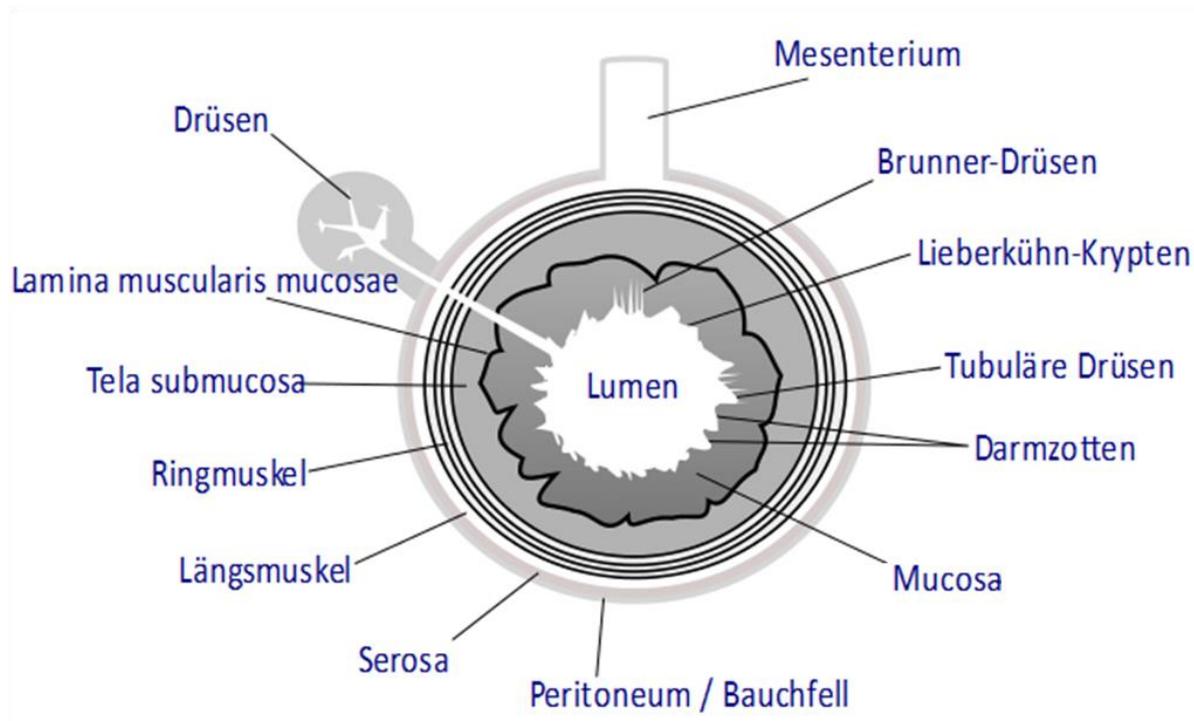


Abb. 3 Schematische Darstellung eines Dünndarmquerschnittes. (Schema ist Wikipedia entnommen; Urheber: Auawise at en.wikipedia).

Zur Veranschaulichung des oben Geschriebenen folgen die Abbildungen 4 (Querschnitt) und 5 (Längsschnitt) eines Mäusedünndarms in HE-Färbung.

In der Schichtfolge sind erkennbar:

Die Tunica muscularis, welche sich in die außen liegende Längsmuskelschicht und in die innen liegende Ringmuskelschicht gliedert.

Darauf folgt, als hellgefärbte Schicht dargestellt, die Tela submucosa.

Als innerste Schicht folgt die Mukosa, bestehend aus der Lamina muscularis mucosae, welche auf diesen Bildern nicht zu erkennen ist, der Lamina propria und der Lamina epithelialis mucosae.

Die Zotten werden aus dem Epithel, der darunterliegenden Basalmembran und der Lamina propria gebildet.

Die Serosa ist auf den Abbildungen 4 und 5 nicht dargestellt.

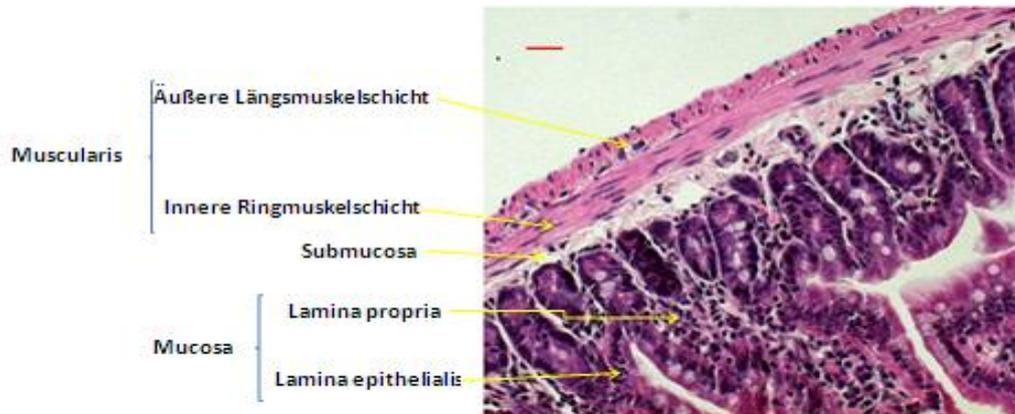


Abb. 4 Querschnitt eines Mäusedünndarms in HE-Färbung. Roter Strich entspricht einem Maßstab von ca. 20µm.

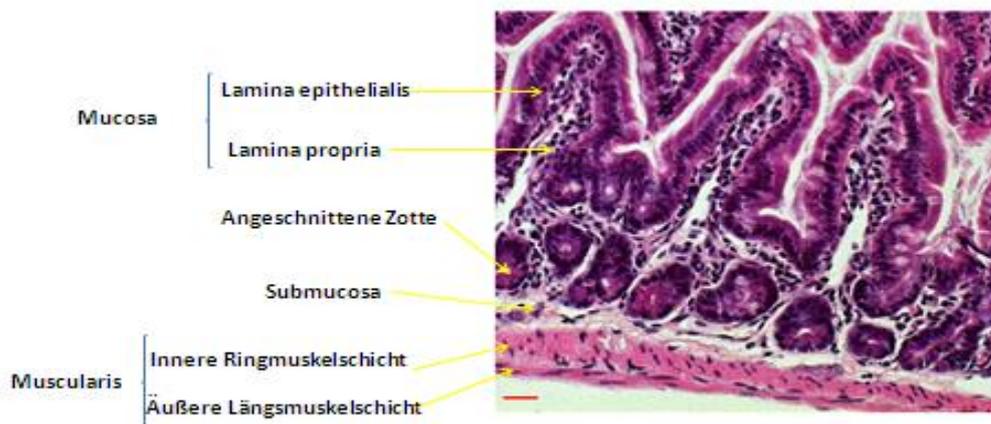


Abb. 5 Längsschnitt eines Mäusedünndarms in HE-Färbung. Der rote Strich entspricht einem Maßstab von ca. 20µm.

1.5 Fragestellung

Ausgehend von den in unserer Arbeitsgruppe erhobenen Befunden, dass in der Darmwand eine histaminstimulierbare Quelle für Reaktive Sauerstoffspezies vorhanden ist und diese höchstwahrscheinlich mit der Aktivität des Enzyms DAO korreliert, sollte mit der vorliegenden Dissertation vor allem die Lokalisation dieser Radikalquelle untersucht werden.

Dazu sollte an unterschiedlich präparierten Gewebeproben aus Dünndarm zunächst mit luminolverstärkter Chemilumineszenzmessung die Radikalquelle funktionell lokalisiert werden. Danach sollte mit immunologischen Methoden und spezifischen Antikörpern gegen DAO die Reaktion weiter charakterisiert werden, wobei sowohl der Proteinnachweis im Western Blot als auch die Immunohistochemische Lokalisation der DAO im Gewebeschnitt verwendet wurden.

Letztlich sollte noch untersucht werden, inwieweit die Antioxidative Eigenschaft des Darmwandgewebes mit der funktionellen Nachweismethode interferieren könnte.

2 Material

2.1 Geräte

- AxioCamHRc, Zeiss, Oberkochen
- Axioplan2, Zeiss, Oberkochen
- Blottingkammer, Bio Rad, Mini-Protean Tetra System,
- Digital-pH-Meter Typ 643-1, Knick, Berlin
- Eppendorf centrifuge 5417 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Magnetrührer IKAMAG REO, Staufen
- Mikrotommesser, Feather, A 35; FEATHER® Safety Razor Co. Ltd., Japan
- Mikrotom Leica RM 2255; Leica Biosystems, Nussloch
- Multibiolumat LB 9505C (6 Kanäle), Berthold Technologies, Bad Wildbad
- Operationsbinokular mit Beleuchtungseinheit, Zeiss, Oberkochen
- Rotilabo-Block-Heater H 250. Roth, Karlsruhe
- Super Frost Plus Objektträger, R. Langenbrinck;
- Vortex-Genie, Bender und Hohbein, Zürich, Schweiz
- Waage BP 121 S, Sartorius, Göttingen
- Western Blot Apparatur, Mini Trans-Blot System, Bio-Rad, München, Deutschland

2.2 Chemikalien und Materialien

- AAPH (2,2-Azobis (2-Amidinopropane)hydrochloride, Polyscience, Warrington, USA
- ABC-Komplex, Vector Laboratories, Burlingame, UK
- Amersham ECL Select Western blotting detection reagent, GE Healthcare Life Science, Buckinghamshire, UK
- Antikörper
 1. Anti-ABP1 antibody (ab100872), abcam, Cambridge UK
 2. Anti-ABP1 antibody produced in rabbit (HP031032), Sigma, Steinheim, Deutschland
 3. Anti-rabbit-HRP, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
 4. α/β -Tubulin Antibody, Cell Signaling Technology Inc., Danvers, USA
- Bradford, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Cetirizine dihydrochloride, Biotrend, Zürich, Schweiz
- Citratpuffer Anatomie, Biogenex, Hamburg, Deutschland
- DAB (3,3-Diamino-benzidine tetrahydrochlorid), Serva, Heidelberg, Deutschland
- EDTA Di-Natriumsalz, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Glucose, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Heparin Natrium-Salz, Sigma, Steinheim, Deutschland
- HEPES , Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Histamin-Dihydrochlorid (2-(4-Imidazolyl)ethylamin-Dihydrochlorid), Sigma, Steinheim, Deutschland
- Luminol (5-Aminophthalhydrazid, $C_8H_7N_3O_2$), Merck, Darmstadt, Deutschland
- Milchpulver, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumchlorid (NaCl), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumhydrogencarbonat ($NaHCO_3$), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Natriumhydroxid (NaOH), Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Nitrocellulosemembran, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Putrescin dihydrochlorid, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Proteaseinhibitorcocktail, Roche, Basel, Schweiz
- Proteinmarker V, peqlab, Erlangen, Deutschland
- Salzsäure (HCl), Merck, Darmstadt, Deutschland

- Schweineserum, PAA: The cell culture company, Cölbe, Deutschland
- TBS/Tween, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Triton X-100, Sigma, Taufkirchen, Deutschland
- Trizma- BASE, Sigma, Steinheim, Deutschland
- Wasserstoffperoxid (H₂O₂) Merck, Darmstadt, Deutschland
- Ziegenserum, PAA: The cell culture company, Cölbe, Deutschland

2.3 Lösungen

AAPH- Lösung

Es wurde eine AAPH Lösung der Konzentration 0,5M in Wasser hergestellt.

ABC-Komplex

Avidin Biotin Complex

15µl Lösung A und 15µl von Lösung B des Test-Kits wurden unter Schütteln in 1470µl PBS gelöst und vor Verwendung 30 Minuten im Kühlschrank belassen.

Antikörper- Verdünnungspuffer

In 9,5ml PBS-Lösung werden 500µl Ziegenserum und 50µl TritonX dazugegeben.

DAB-Lösung

3mg DAB werden in 10ml PBS gelöst; anschließend wird filtriert und 50µl 30% H₂O₂ zu pipettiert.

Histamin- Lösung

Es wurde eine Histaminstammlösung von 5 mM in Wasser hergestellt.

Durch weitere Verdünnungen mit Tyrode entstand eine Endkonzentration von 50 µM.

Luminol- Lösung

Für die 11,3 mM Lösung wurden 2,0 mg Luminol in 1,0 ml DMSO im Dunkeln gelöst und in Aliquots zu 200µl bei -20°C aufbewahrt.

Loading buffer

SDS	4%
2-Mercaptoethanol	10%
Glycerol	20%
Bromphenol	0,004%
Tris HCl	0.125 M

Lyse-Puffer

1l des Lyse-Puffers enthielt 50mM Tris (pH 7,4), 150mM NaCl, 1% Triton-X 100 (v/v), 0,5% Natriumhydrogenphosphat (w/v), 0,5% β-Mercaptoethanol (v/v) und Proteaseinhibitorcocktail.

PBS-Lösung

Für eine 10mM PBS Lösung wurden 14g NaCl, 5,7g Na₂HPO₄ und 0,8g KH₂PO₄ in 2l destilliertem Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Präinkubationspuffer

In 9,5ml PBS-Lösung werden 500µl Ziegenserum, 50µl TritonX und 0,1g BSA dazugegeben.

Putrescin dihydrochlorid

Es wurde eine Putrescinstammlösung von 500 mM hergestellt.

Durch weitere Verdünnungen mit Tyrode entstand eine Endkonzentration von 5mM.

8% SDS PAGE = Polyacrylamid-Gel

	8%iges Trenngel (20 ml)
H ₂ O	9,3 ml
30%ige Acrylamid/Bis-Lösung	5,3 ml
1,5 M TRIS pH 8,8	5,0 ml
1 M TRIS pH 6,8	-
10% (w/v) SDS	0,2 ml
10% (w/v) Ammoniumpersulfat	0,2 ml
TEMED	0,012 ml

Tris-EDTA-Lösung

Für eine Tris-EDTA-Lösung mit 0,05% Tween20 und einem pH-Wert von 9 wurden 1,21g TrisBase (=10mM) und 0,37g EDTA (=1mM) in 1000ml Wasser und 0,5ml Tween20 gelöst.

Tris-HCl-Puffer

Für 100ml eines 0,1 M Puffers mit einem pH von 7,4 wurden 25ml Tris(hydroxymethyl)amino-methan mit 20,7ml 0,1N HCl auf 100ml destilliertem Wasser aufgefüllt.

Tyrode Lösung als physiologische Salzlösung

NaCl	118,9 mM
KCl	5,0 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	1,5 mM
Glucose-Monohydrat	5,0 mM
HEPES	10,0 mM

Die Lösung wurde mit NaOH 8M auf den physiologischen pH von 7,4 eingestellt.

2.4 Biologische Materialien

Für die Experimente wurde der gesamte Dünndarm von Wildtyp-Mäusen verwendet. Die Mäuse entstammten aus institutsinternen Weiterzuchtungen und wurden nach den gesetzlichen Richtlinien in Tierräumen des Physiologischen Institutes der Universität Tübingen (offene Gemeinschaftskäfige, 12/12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus, Standardfutter und Wasser ad libitum) gehalten. Die Untersuchungen wurden beim Regierungspräsidium Tübingen angezeigt und erfolgten mit entsprechender Genehmigung. Zur Entnahme des Darms wurden die Tiere nach Isofluraninhalation bis zur Asphyxie durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das Peritoneum eröffnet, der Dünndarm entnommen, Fett und Blut entfernt, das Darmlumen mit Tyrode gespült um den Chymus zu entfernen und entweder gleich für die nachfolgend beschriebenen Versuche verwendet oder in mit Tyrode gefüllten Eppendorfcups überführt und tiefgefroren. Bereits bei der Entnahme wurde auf die proximalen und distalen Abschnitte des Dünndarms geachtet, so dass diese bei den späteren Versuchen gut zu unterscheiden waren.

Das Kontrollgewebe für die Immunohistochemie (humane Niere und Kolon) wurde vom Anatomischen Institut der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

3 Methoden

3.1 Gewebepräparation für den Nachweis der histaminstimulierbaren Radikalproduktion

Für den Nachweis der histaminstimulierbaren Radikalproduktion wurde der nach 2.4 gewonnene Dünndarm durch verschiedene Vorgehensweisen aufgearbeitet, so dass unterschiedliche Gewebepräparate erhalten wurden.

Für die weitere Präparation wurden verschiedene Vorgehensweisen eingesetzt.

1) Ringpräparate aus intaktem Darm

Der nach 2.4 erhaltene, gereinigte und präparierte Dünndarm wurde in ca. 0,5cm lange Ringe geschnitten. Diese Darmringe wurden nicht weiter disseziert, sondern so für die Messungen verwendet.

2) Ringpräparate der Submucosa

Der nach 2.4 erhaltene Darmabschnitt wurde in eine mit Tyrodelösung befüllten Petrischale überführt, mit einer Pinzette fixiert und mit einer abgewinkelten Mikroskopierschere vorsichtig nach beiden Seiten ausgestreift. Dabei blieben die strukturell festeren Schichten (Tunica muscularis und Tela submucosa) erhalten, während der restliche Chymus und die Tela mucosa ausgestrichen wurden. Die Tela mucosa wurde vorsichtig mit einer Pinzette aufgenommen und separat in Tyrode gelagert. Durch weiteres vorsichtiges Streichen wurde die Muscularis vollständig von der Submucosa gelöst. Anschließend wurde das weitestgehend aus Submucosa bestehende schlauchförmige Präparat in 0,5cm lange Ringe disseziert. Für die Testungen wurden sowohl die aufpipettierte Mucosa als auch die Submucosa eingesetzt.

3) Streifenpräparate

Nach dem Ausspülen wurde der Darmabschnitt längs aufgeschnitten und mit der stumpfen Rückseite einer Mikroskopierschere auf der luminalen Oberfläche ausgestrichen, so dass Chymus und Mukosa entfernt wurden. Die Mukosa wurde separat aufgenommen und in Tyrode gelagert. Anschließend wurde die Submucosa von Epithel- und Muscularisresten durch stumpfes Abstreifen befreit und für die Messung in 0,5cm lange Abschnitte geteilt.

Allerdings hat sich bei histologischen Untersuchungen gezeigt, dass die Lamina propria mit diesen Methoden 1 und 2, nicht vollständig von der Tela submucosa trennbar ist und immer Reste dieser Schicht in der Submucosa zurückblieben. Um die mögliche Aktivität störender Pankreasproteasen auszuschließen, wurde diese Präparationsart in Gegenwart von bovinem Serum statt PBS wiederholt.

4) Gewebepräparate nach EDTA-Inkubation

Mit dieser Methode sollte der Gewebeverband durch Ca^{2+} - Komplexierung gelöst werden. Dazu wurde der nach 2.4 erhaltene Darmabschnitt in einer EDTA-haltigen (2mM) Tyrodelösung mit pH 8 für 15-20 Minuten inkubiert. Diese führte zu einer Auflösung des Gewebeverbandes, so dass die Epithelschicht und Submucosa getrennt für die Messung eingesetzt werden konnten.

3.2 Methoden zur Charakterisierung der Radikalquelle bzw. zum Nachweis der Diaminoxidase

3.2.1 Stimulation der Radikalproduktion durch Histamin und Putrescin

Bei der Umsetzung von Histamin zu Imidazolacetaldehyd bzw. von Putrescin zu Aminobutyraldehyd durch das Enzym DAO entsteht unter anderem Wasserstoffperoxid (Abb.6). Letzteres kann Luminol oxidieren, wobei 5-Aminophthalsäure, Stickstoff und Wasser entstehen und Licht der Wellenlänge 425nm emittiert wird (Abb.7).



Abb. 6 Allgemeine Reaktionsgleichung der DAO für oxidative Desaminierung von aliphatischen Diaminen.

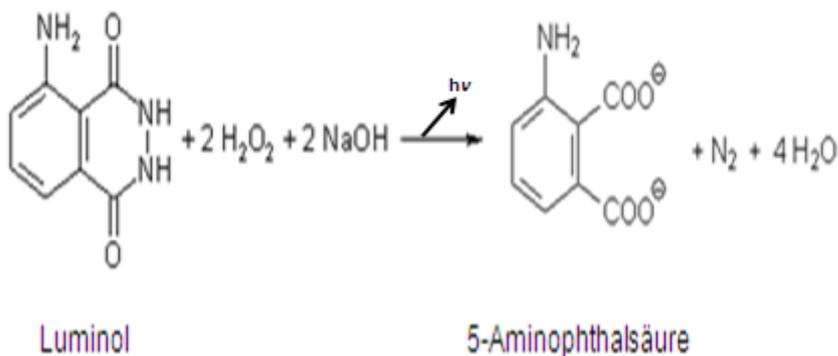


Abb. 7 Reaktionsgleichung für die Chemilumineszenzreaktion von Luminol.

Für die Durchführung wurden zunächst 485µl Tyrode- und 5µl Luminol-Lösung in eine Messküvette pipettiert (siehe Tab.1). Nach Zusatz des Gewebepräparates wurde die basale CL bei 37°C im Biolumat für 10 Minuten gemessen, anschließend wurde die Substratlösung hinzugefügt und die CL für weitere 20 Minuten gemessen.

Tab. 1 Reaktionsansatz für die Luminol-verstärkte CL-Messung

Lösung	Konzentration Stammlösung	Pipettier- Volumen	Endkonzentration
Tyrode-Lösung		490 µl	
Luminol-Lösung	11,3 mM	5 µl	113 µM
Histamin-Lösung oder Putrescin-Lösung	5 mM	5 µl	50 µM
Gewebepräparat			

Die Chemilumineszenz wurde einerseits nach ihrer Intensität zeitabhängig in counts per minute (cpm) graphisch dargestellt, andererseits standen die pro Messpunkt ermittelten Intensitätswerte auch als Exceldatei zur Verfügung. Um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können, wurde zunächst die „area under the curve“ (AUC) vor, sowie nach der Stimulation über einen Zeitraum von je 10 Minuten durch Integration ermittelt. Die Stimulierbarkeit wurden dann nach $S = \frac{AUC_{HIS}}{AUC_L}$ errechnet.

Ein Wert von 1 heißt, dass keine Stimulation stattgefunden hat, während beispielsweise ein Wert von +6 eine Stimulierbarkeit um das Sechsfache bedeutet. Abb. 8 zeigt eine Originalregistrierung einer CL-Messung mit einem Beispiel einer solchen Berechnung.

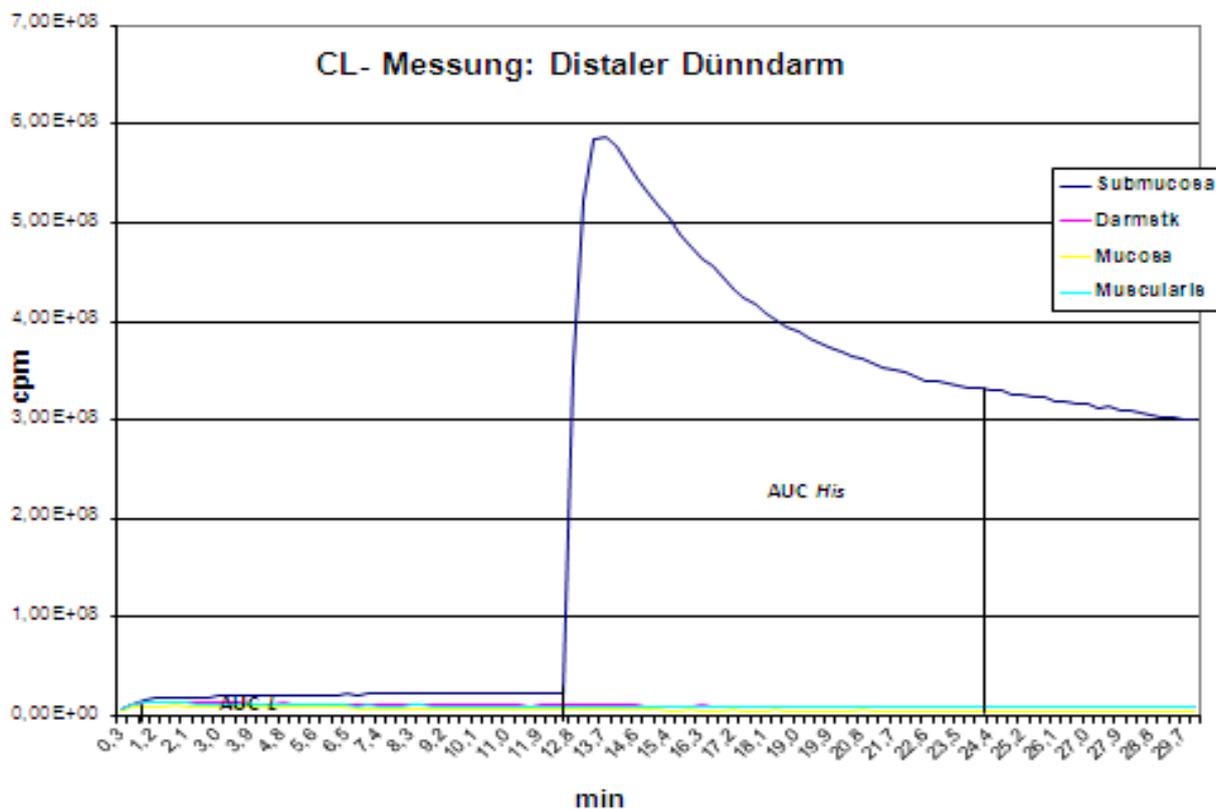


Abb. 8 Stimulation von distalen Dünndarmpräparaten der Maus mit Histamin (50 μ M). Originalregistrierung einer CL-Messung.

Die Versuche wurden mit Präparaten aus proximalem und distalem Dünndarm durchgeführt, die nach Methode 1, 2 und 3 hergestellt worden waren.

3.2.2 Hemmung der Enzymaktivität durch Antikörper

Vor dem Hintergrund, dass viele Beobachtungen dafür sprachen, dass es sich bei der Histamin-stimulierbaren Radikalquelle um DAO handelt, wurde untersucht, inwieweit der in 3.2.1 beschriebene Test durch spezifische Antikörper gegen dieses Enzym hemmbar ist.

Dazu wurden die Darmpräparate in Ampuwa für 40 Minuten bei 37°C in einem Heizblock mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert, die in unterschiedlichen Verdünnungen (siehe Tabelle 2) zum Einsatz kamen.

Zum einen wurde der Antikörper Anti-ABP1 (HPA031032) der Firma sigma verwendet, zum anderen der Anti-ABP1 Antikörper (ab100872) der Firma abcam.

Tab. 2: Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Pipettiervolumen
sigma	1:50	196µl Ampuwa+ 4µl Ak
	1:200	199µl Ampuwa+ 1µl Ak
abcam	1:100	198µl Ampuwa + 2µl Ak
	1:300	299µl Ampuwa + 1µl Ak

Zur Messung der Effekte auf die histaminstimulierbare Radikalproduktion wurden diese Präparate wie nach Tab. 1 in Abschnitt 3.2.1 dargestellt verwendet.

3.2.3 Nachweis der DAO mit Hilfe von Western-Blotting

Beim Western Blot, oder Immunblot, werden Proteine auf eine Trägermembran übertagen, welche im Anschluss daran über spezifische Reaktionen nachgewiesen werden können.

Zunächst wurden die nach Methode 2 in Abschnitt 3.1 erhaltenen Streifenpräparate des Mäusedünndarms gereinigt, mit 2ml Lysepuffer (Tris-HCL pH 7,5) versetzt und homogenisiert. Die Zellysate wurden für 30 Minuten bei 16000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert.

Bevor die Proteinlösungen mit SDS versetzt und für 5 Minuten bei 95°C denaturiert wurden, wurde zur Bestimmung des Proteingehaltes ein Bradford Test durchgeführt. Anschließend wurden 30µl Proteinlösung einer jeden Probe auf die 8%ige PAGE(=Trägermatrix = Polyacrylamid-Gel) überführt und in einer Gel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe und Ladung aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran überführt.

Um die freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran für die Antikörperbindungen zu blocken, wurde die Membran für 1 h bei RT in 5%igem Milchpulver in TBS + 0,1% Tween20 (TBST) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Proteinbanden mit Hilfe spezifischer Ak (Anit-ABP1 HPA031032 Ak von sigma 1:500 und ein α/β -Tubulin Ak 1:1000) markiert und über Nacht bei 4 Grad inkubiert.

Hiernach wurde die Membran mit einem an den Sekundärantikörper (mouse –anti-rabbit Ak der Firma cell signaling, 1:2000) gekoppelten Meerrettich-Peroxidase Konjugat (HRP) für 1h bei RT inkubiert. Nach 3 Waschgängen mit TBS/TWEEN für je 30 Minuten wurde die Membran für 5 Minuten bei RT mit dem ECL Detektionsreagenz (Amersham) inkubiert und anschließend belichtet. Ein peqGOLD-Protein-Marker V, der in den Versuchen mitgeführt wurde, diente als Kontrolle zur näherungsweisen Bestimmung des Molekulargewichtes.

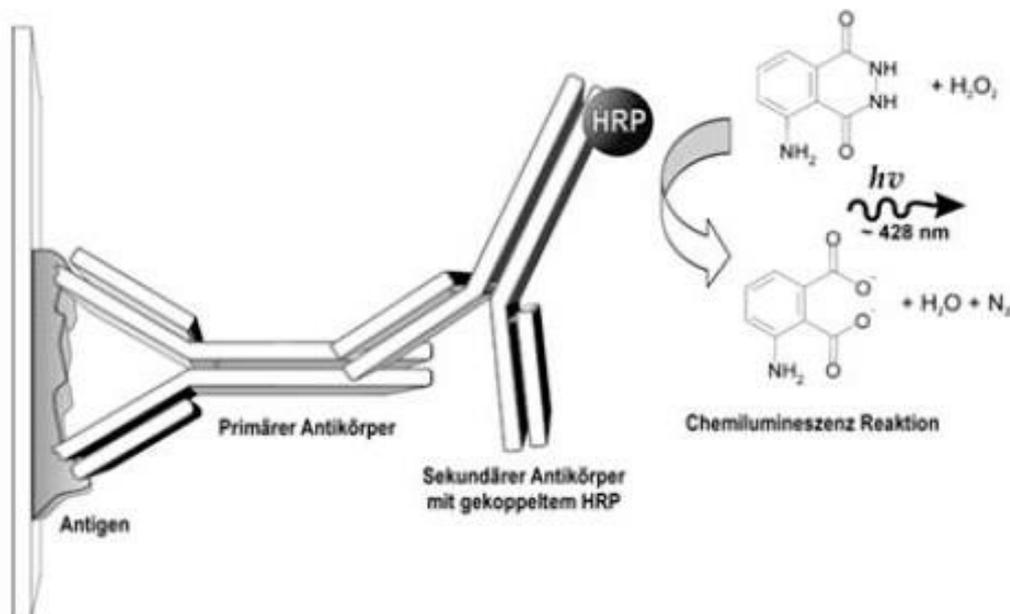


Abb. 9 Schematische Darstellung zur immunologischen Untersuchung des Western-Blots. An dem Nitrocellulosegel befindet sich das Antigen, der primäre Ak der gegen das Antigen gerichtet ist, bindet an dieses Antigen. Der zweite Ak ist an eine Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppelt und richtet sich gegen den ersten Ak. Die HRP oxidiert das Luminol, die dadurch entstehende Lumineszenz kann detektiert werden.

[Grafik ist Wikipedia entnommen]

3.2.4 Lokalisation der DAO in der Darmwand mit Hilfe von immunohistologischen Nachweisverfahren.

Zum Nachweis der DAO im Darm wurde die immunohistologische „ABC-Methode“ angewandt. Dazu wurde das frisch entnommene Gewebe mehrfach gespült und in einer wässrigen Formalinlösung (4%) über 14h bei 6°C fixiert. Anschließend folgt die Entwässerung in einer Alkoholreihe aufsteigender Konzentration. Danach wird das Einbettungsblöckchen hergestellt, in ein Mikrotom eingespannt und das in paraffineingebundene Gewebe in ca. 5µm dicke Scheiben geschnitten.

Die Schnitte werden entspannt, gestrafft und auf Objektträgern platziert, welche im Anschluss über Nacht in einen Brutkasten bei 37°C zum Trocknen kommen.

Anschließend werden die Schnitte zum Bewässern und Entparaffinieren 10 Minuten lang in Xylol und in eine absteigende Alkoholreihe überführt.

Um die Antigenität des Gewebes wieder herzustellen ist ein „Retrieval“ nötig. Dazu werden die Schnitte entweder (*Methode 1*) in eine Küvette mit Citratpuffer pH 6 gestellt und dreimal für 5 Minuten in der Mikrowelle erhitzt oder (*Methode 2*) in eine Küvette mit Tris-EDTA pH 9,0 bei 600 Watt zweimal für 5 Minuten in der Mikrowelle erhitzt.

Nach einer 20 minütigen Abkühlphase werden die Schnitte zunächst mit H₂O, dann mit PBS-Lösung gespült. Danach wird die im Gewebe vorhandene Peroxidase für 25 Minuten mit 0,3%igem H₂O₂ inaktiviert.

Im Anschluss an drei weitere Spülgänge werden die Schnitte für 30 Minuten mit einem Präinkubationspuffer (Ziege) inkubiert. Je nachdem, ob man den Schnitt als Kontrolle nimmt oder als Nachweis, kommt nun der mit dem Antikörperverdünnungspuffer 1:100 verdünnte Antikörper (Anti-ABP1 HPA 031032 der Firma sigma) oder nur der Antikörperverdünnungspuffer auf die Objektträger. Bevor der Sekundärantikörper (goat anti- rabbit IgG biotinyliert) auf die davor über Nacht bei 4°C im Kühlschrank gelagerten OT aufgetragen werden kann, müssen die OT abermals dreifach mit PBS gespült werden.

Im Anschluss an den Auftrag der Antikörper werden die OT 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um anschließend nach weiterem dreifachen Spülen mit einem ABC-Komplex, der davor min. 30 Minuten im Kühlschrank war, versehen zu werden. Die OT werden wieder mit einem Deckel verschlossen und bei Raumtemperatur für 45 Minuten inkubiert. Nach wiederholtem dreifachem Spülen

werden die OT nun mit einem 0,05M Tris-HCl-Puffer für 10 Minuten und anschließend, je nach Präparat, 6-10 Minuten mit DAB benetzt.

Um eine bessere Übersicht zu erhalten werden die Präparate kurz in eine Hämalaunfärbung getaucht. Zum Haltbarmachen der Präparate kommen sie in eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol. Am Ende werden sie mit DePeX eingedeckelt. In einem weiteren Versuch mit humanem Kolon und Mäusedünndarm wurde dieses Verfahren leicht modifiziert angewandt (*Methode 3*). Hierbei wurden die Schnitte nach dem Entparaffinieren und waschen in PBS lediglich 2x5 Minuten in der Mikrowelle mit einem Citratpuffer pH 6 gekocht, der Präinkubationspuffer war im Gegensatz zu den Versuchen davor vom Schwein und nicht von der Ziege, der Primärantikörper (Anti-ABP1 HPA 031032 der Firma sigma) war beim humanen Gewebe 1:200 und beim tierischen Gewebe 1:100 verdünnt, der Sekundärantikörper kam ebenfalls vom Schwein und die Färbung mit DAB betrug lediglich ca. 3 Sekunden.

3.3 Antioxidative Eigenschaften der Darmwand

3.3.1 Radikalproduktion durch AAPH- Reaktion

Zur Bestimmung der antioxidativen Eigenschaften der Darmgewebe wurde die AAPH-Reaktion eingesetzt.

AAPH (2,2'-Azobis(2-amidinopropan)dihydrochlorid) gehört zu der Gruppe der Azoradikalbildnern und besitzt die Eigenschaft, spontan in zwei Radikale zu zerfallen. Diese Radikale können mit Luminol unter Photonenbildung reagieren. (Siehe Abbildung 10).

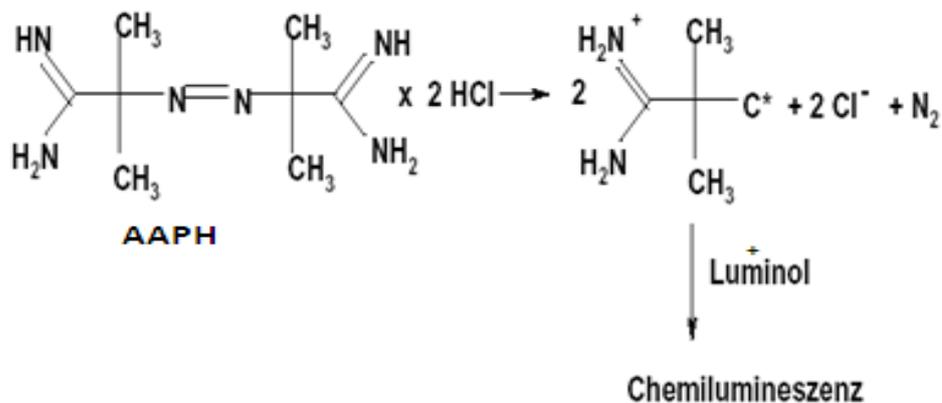


Abb. 10 Spontanzerfall von AAPH und CL-Detektion der Radikale durch Luminol.

Prooxidativ wirksame Substanzen verstärken die Chemilumineszenz durch zusätzliche Bildung von Radikalen während antioxidativ wirksame Substanzen die Chemilumineszenz unterdrücken, indem sie Radikale abfangen. Durch prooxidative Substanzen steigt also die messbare CL an, durch antioxidative fällt sie ab und steigt erst dann wieder an, wenn die Antioxidantien verbraucht sind. Die Zeit zum Wiederanstieg liefert als Auslöschzeit ein Maß für die antioxidative Kapazität. (Siehe auch Abb.11).

3.3.2 Hemmung der AAPH-Reaktion durch verschiedene Darmwandpräparate

Um die antioxidative Kapazität der Darmwand zu demonstrieren, wurden die verschiedenen Präparate quasi als Antioxidans der AAPH-Reaktion zugefügt. Der Reaktionsansatz ist in Tab. 3 dargestellt. Gemessen wurde bei 37°C in einem Biolumat. Die Gesamtmesszeit betrug 30 Minuten, wobei die Darmpräparate erst nach dem Erreichen der konstanten Radikalbildungsrate des AAPHs hinzugefügt wurden.

Tab. 3

Kontrolle A	Substrat B	
Tyrode 485 µl	Tyrode	485 µl
Luminol 5 µl	Luminol	5 µl
AAPH 10 µl	AAPH	10µl
	<i>Streifenpräparat</i>	<i>Ringpräparat</i>
	Mucosa	Darmstück
	Submucosa	

Abbildung 11 zeigt einen typischen Reaktionsverlauf einer solchen Messung: zunächst erfolgt eine Zunahme der AAPH-induzierten CL, welche dann, nachdem sich eine konstante Radikalbildungsrate eingestellt hat, durch Zugabe des Gewebes ausgelöscht wird.

Zur Bestimmung des antioxidativen Potentials der Darmschichten wurde die Auslöschzeit herangezogen, d.h. die Zeit, die vom Absinken bei Probenzugabe bis zum Wiederanstieg bis zum Halbmaximum des vorherigen Plateaus gebraucht wird (siehe Abb. 11).

Die Dauer der Auslöschzeit liefert Informationen über den Gehalt an Antioxidantien im Präparat und ist damit ein Maß für die antioxidative Kapazität des Gewebes.

Um rein die Auslöschzeit der Präparate zu bekommen, wurde die Auslöschzeit der Kontrolle A von der Auslöschzeit des Substrates B abgezogen.

Beim Kontrollansatz A handelt es sich lediglich um Tyrode, Luminol und AAPH, während bei Substrat B zusätzlich noch ein Gewebepräparat (Ringpräparate und Streifenpräparate wie in 3.1 unter Methoden beschrieben) hinzugefügt wurde. (Siehe Tabelle 3).

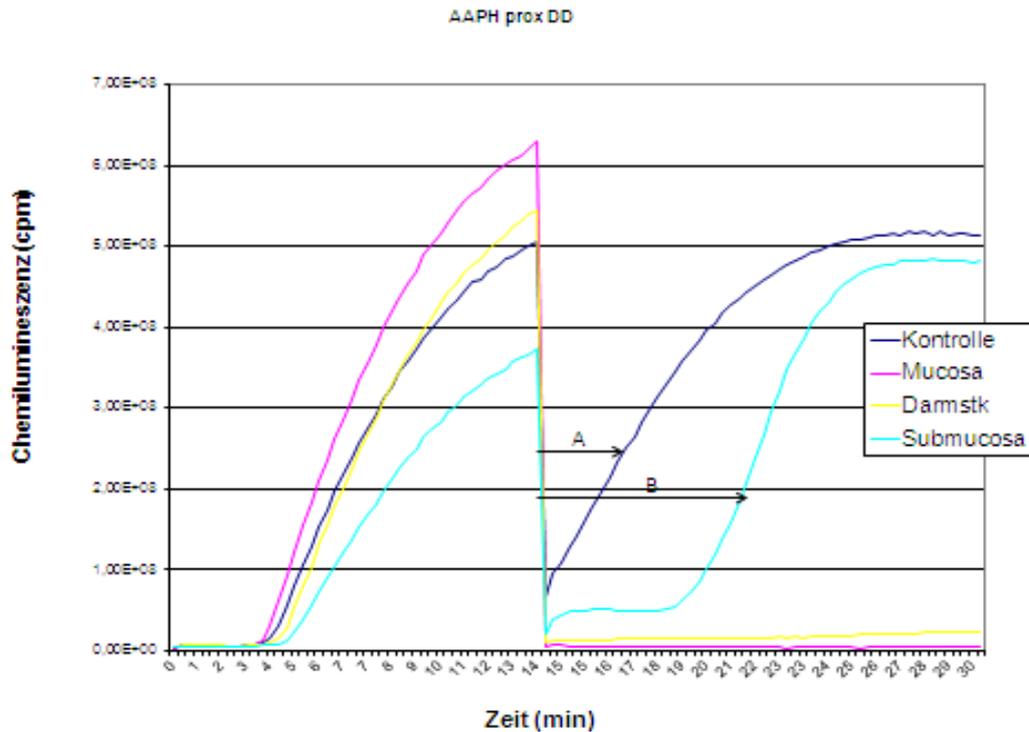


Abb. 11 AAPH-Reaktion: Bestimmung der Auslöschzeit

Alle Messküvetten wurden zum Zeitpunkt der Gewebezugabe gevortext. Der steile Abfall der CL- Kurven ist mit diesem Stoppen und Öffnen der jeweiligen Kanäle zu erklären.

4 Ergebnisse

4.1 Radikalproduktion des Darmgewebes

Der Verlauf der Luminol-verstärkten CL Reaktion mit Darmgewebe (s. Abb. 12) zeigt, dass die spontane Radikalbildung vor dem Zusatz von Histamin sehr gering ist und praktisch dem Leerwert entspricht. Bei diesem Versuchsansatz wird die Radikalproduktion erst durch Hinzufügen des Substrates induziert.

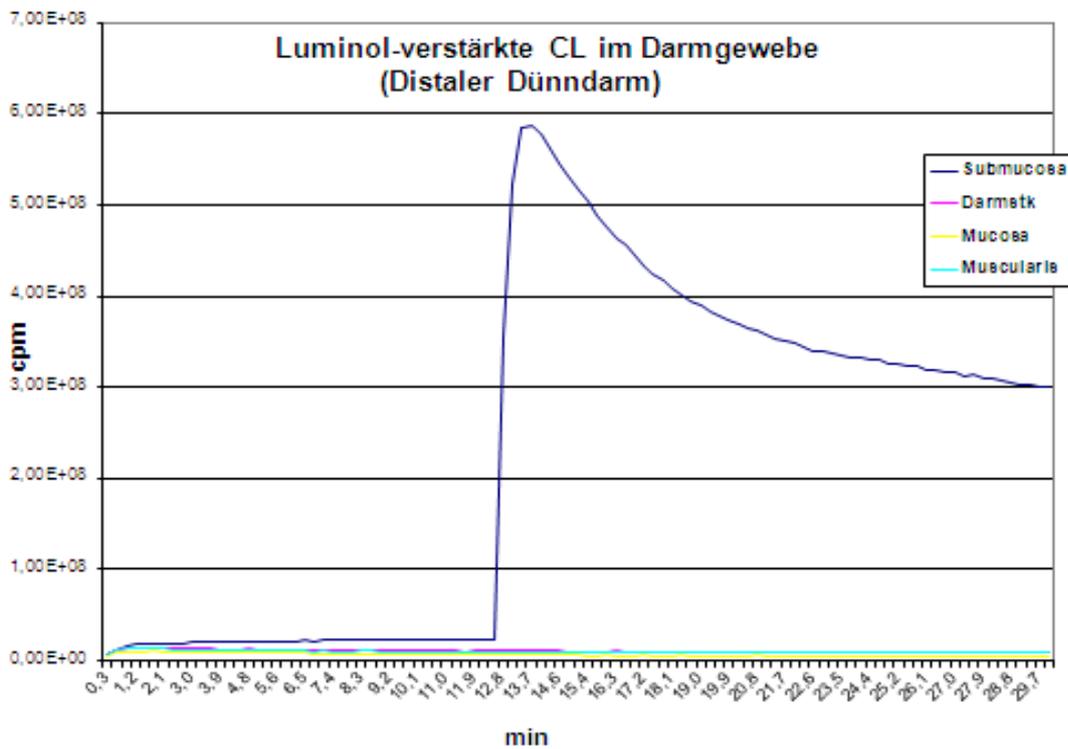


Abb. 12 Basale und histaminstimulierbare Radikalproduktion von Präparaten aus distalen Dünndarm der Maus. Originalregistrierung einer CL-Messung.

4.1.1 Histamininduzierte Radikalproduktion in verschiedenen Darmpräparaten

Bei den Messungen mit den verschiedenen Darmpräparaten zeigte sich, dass in der intakten Darmwand und den Präparaten aus Mucosa und Muscularis, sowohl des proximalen als auch des distalen Dünndarms praktisch keine Stimulierbarkeit durch Histamin nachgewiesen werden kann, während diese in der Submucosa (und Muscularis des proximalen DD) sehr stark auftritt (siehe Abb. 13 und 14).

Die Radikalproduktion konnte durch Histamin im proximalen Dünndarm in der Submucosa um das ca. 8fache und in der Muscularis um das ca. 6fach gesteigert werden (siehe Abb. 13). In der Submucosa des distalen Dünndarms konnte durch die Histaminstimulation eine Steigerung um das ca. 10fache gemessen werden, während in der Muscularis kaum eine Stimulation erfolgte (siehe Abb.14). Zudem waren der intakte Darm und die Mucosa beider Dünndarmabschnitte nur um ca. das 1fache steigerbar.

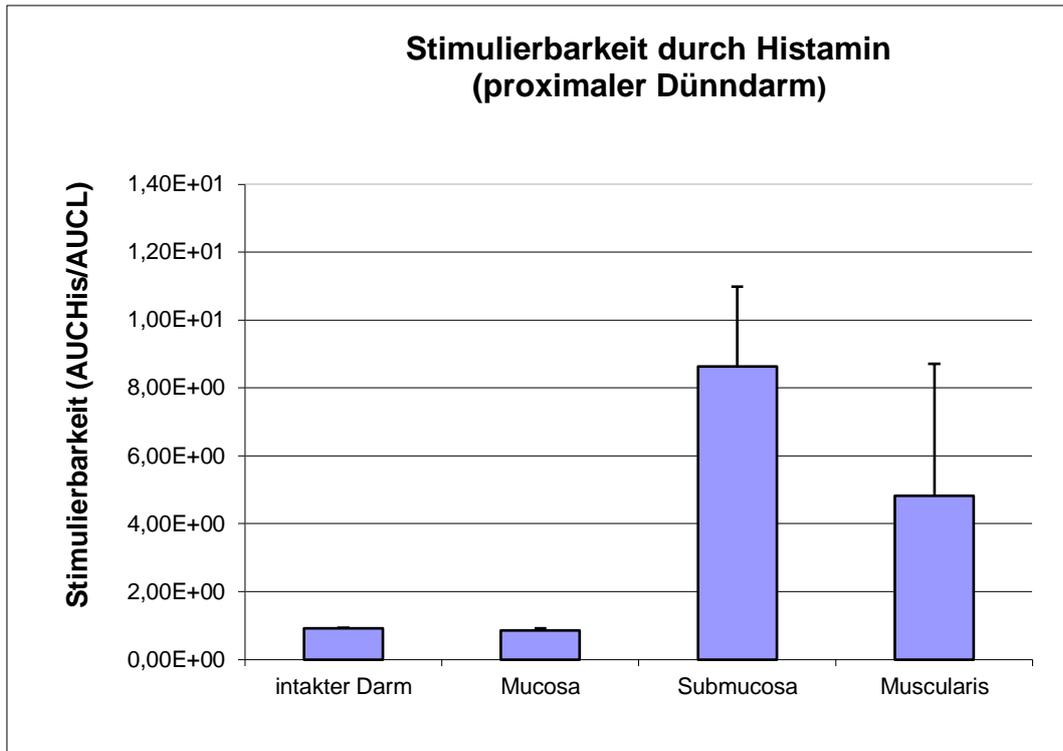


Abb. 13 Histaminstimulierbare Radikalproduktion in Präparaten aus proximalem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. (n=6).

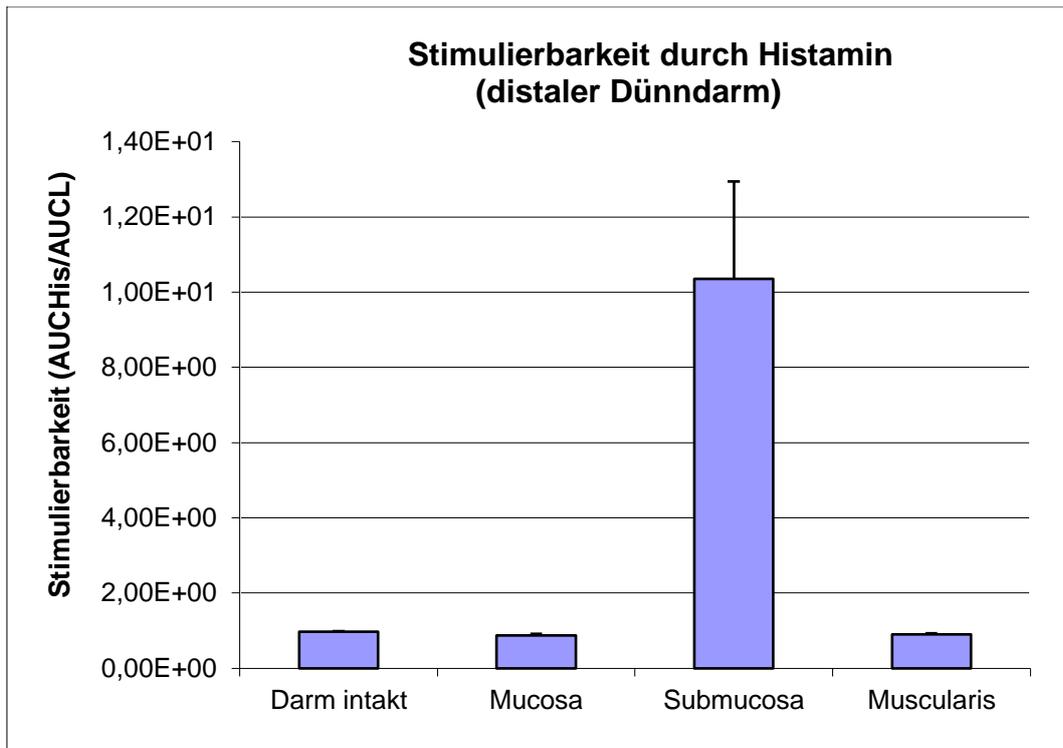


Abb. 14 Histaminstimulierbare Radikalproduktion in Präparaten aus distalem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. (n=6).

Um zu verhindern, dass die Zellen bei der mechanischen Gewebepräparation geschädigt und lysiert werden, sollte durch „chemische Dissektion“ mittels EDTA-haltiger Lösung die Bedingungen so gewählt werden, dass die Zellen möglichst intakt bleiben. Das Ergebnis der Stimulationsversuche ist in Abb. 15 dargelegt und zeigt, dass wie bei den Quetschpräparaten, die Stimulierbarkeit besonders groß in der Submucosa ist und einen ca. 18fachen Wert (bei allerdings nur 2 Stichproben) erreicht.

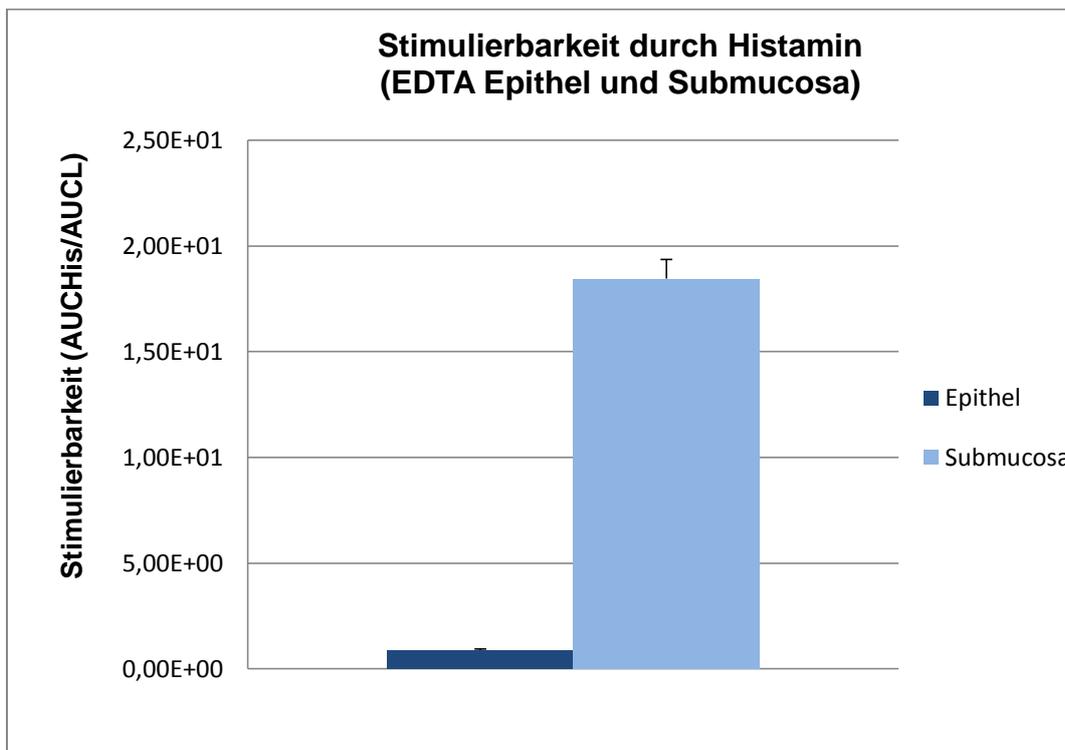


Abb. 15 Histaminstimulierbare Radikalproduktion aus EDTA-behandeltem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. (n=2).

In einer weiteren Versuchsreihe sollte ausgeschlossen werden, dass in den Darm sezernierte Pankreasenzyme die Messungen beeinflussen. Daher wurden in dieser Versuchsreihe die Gewebepräparate mit Blutserum behandelt, durch das die Pankreasproteasen inhibiert werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 16 dargestellt und zeigen, dass die Radikalbildung der Gewebe von Pankreasenzymen unbeeinflusst ist.

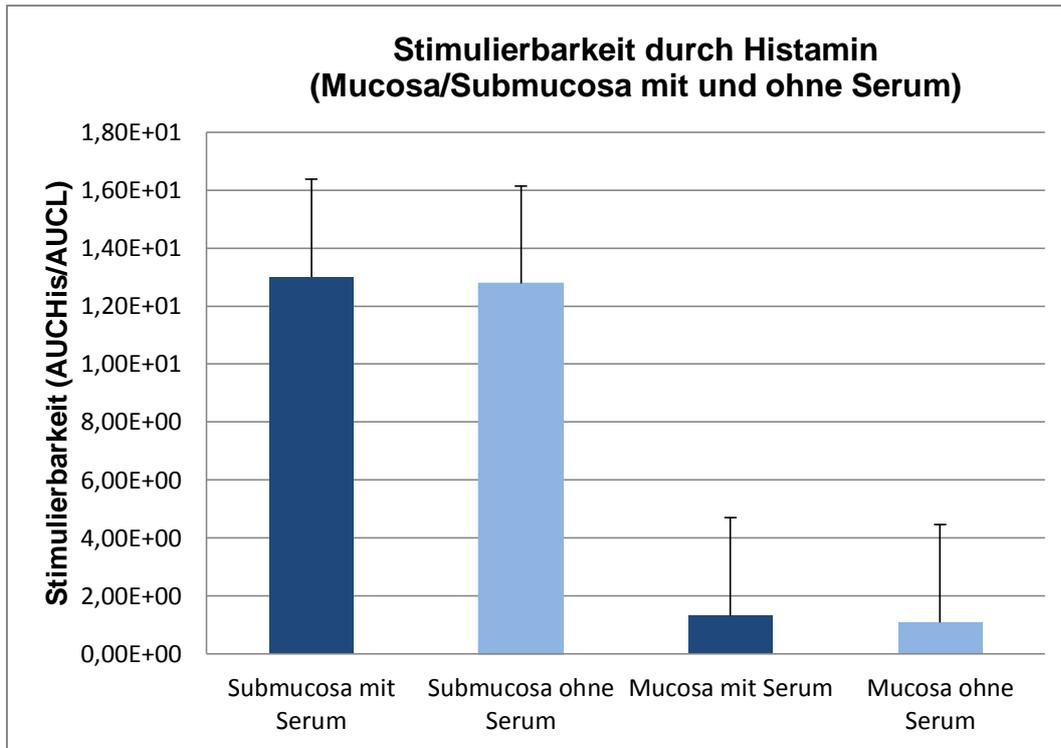


Abb. 16 Histaminstimulierbare Radikalproduktion bei Serum-behandeltem und nicht Serum-behandeltem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. (n=2).

4.1.2 Putrescininduzierte Radikalproduktion im Dünndarm

Da für DAO beschrieben ist, dass nicht nur His, sondern auch Diamine wie Putrescin oxidativ abgebaut werden können, sollten die mittels CL-Reaktion durchgeführten Untersuchungen zur Radikalbildung mit diesem Substrat wiederholt werden.

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, findet bei der Stimulation mit Putrescin eine vergleichbare Reaktion wie bei Histamin statt. Weiterhin geht aus den Abbildungen 18 und 19 hervor, dass auch bei Putrescin die Stimulierbarkeit auf die Präparate aus der Submucosa beschränkt ist, wobei diese im proximalen Dünndarm noch größer (ca. 16fach) zu finden ist als bei Histamin (ca. 9fach).

Damit deuten die Ergebnisse der Untersuchung zur Substratspezifität darauf hin, dass die Radikalquelle mit der Aktivität der DAO in Verbindung steht.

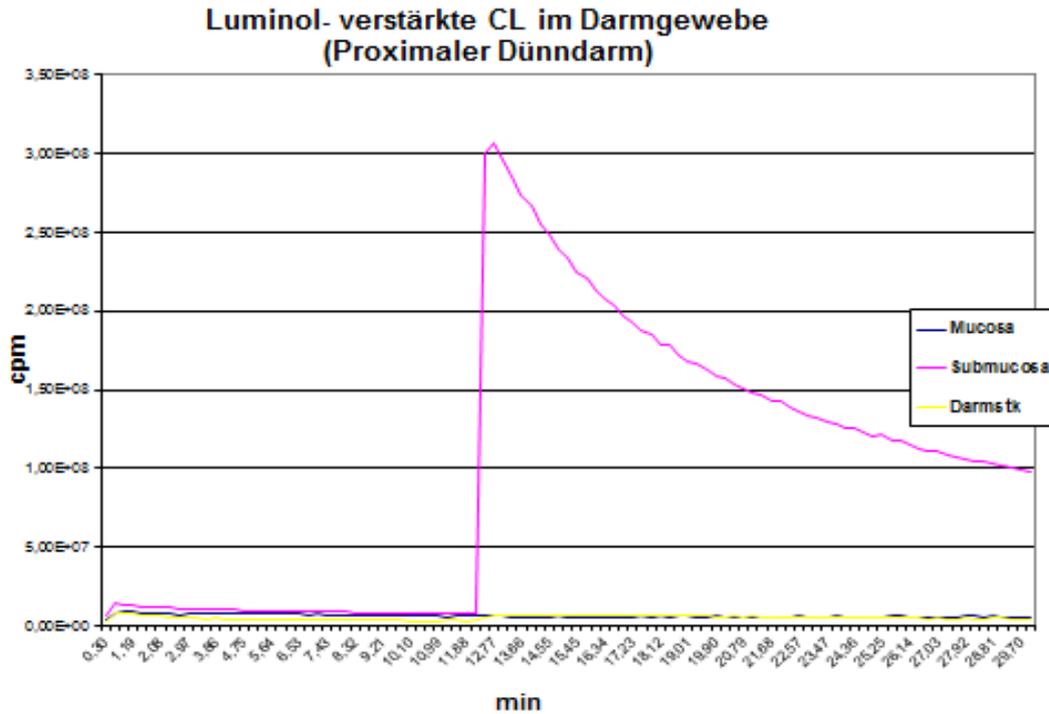


Abb. 17 Basale und putrescinstimulierbare Radikalproduktion von Präparaten aus proximalen Dünndarm der Maus. Originalregistrierung einer CL-Messung.

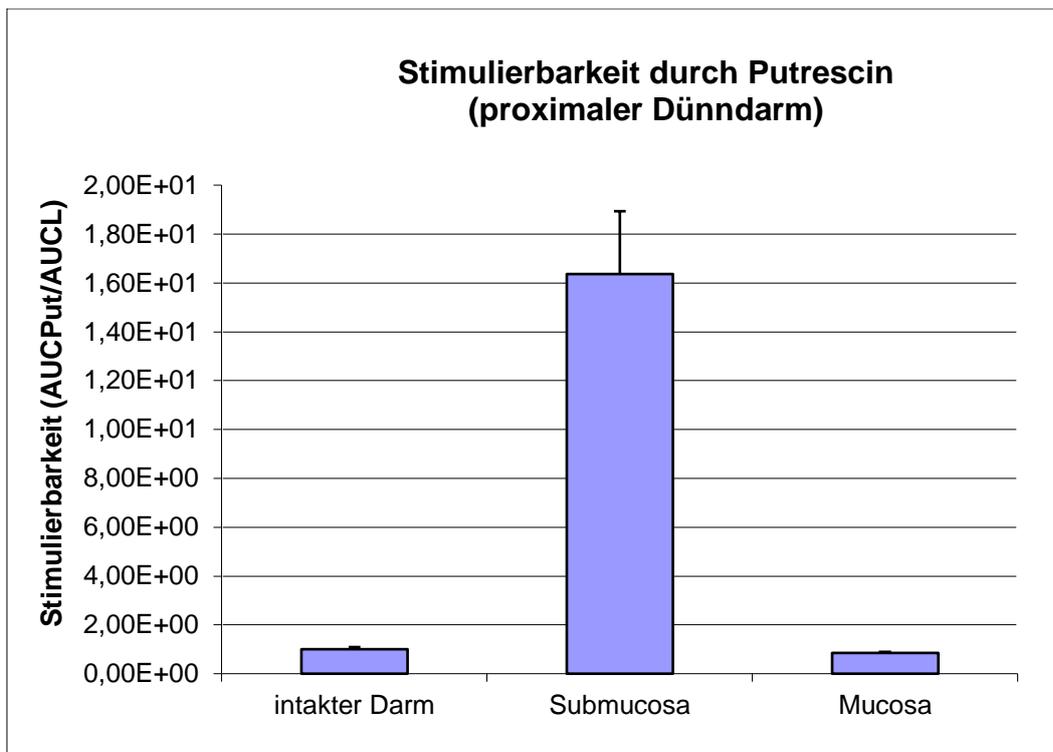


Abb. 18 Putrescinstimulierbare Radikalproduktion von Präparaten aus proximalem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D.(n=6).

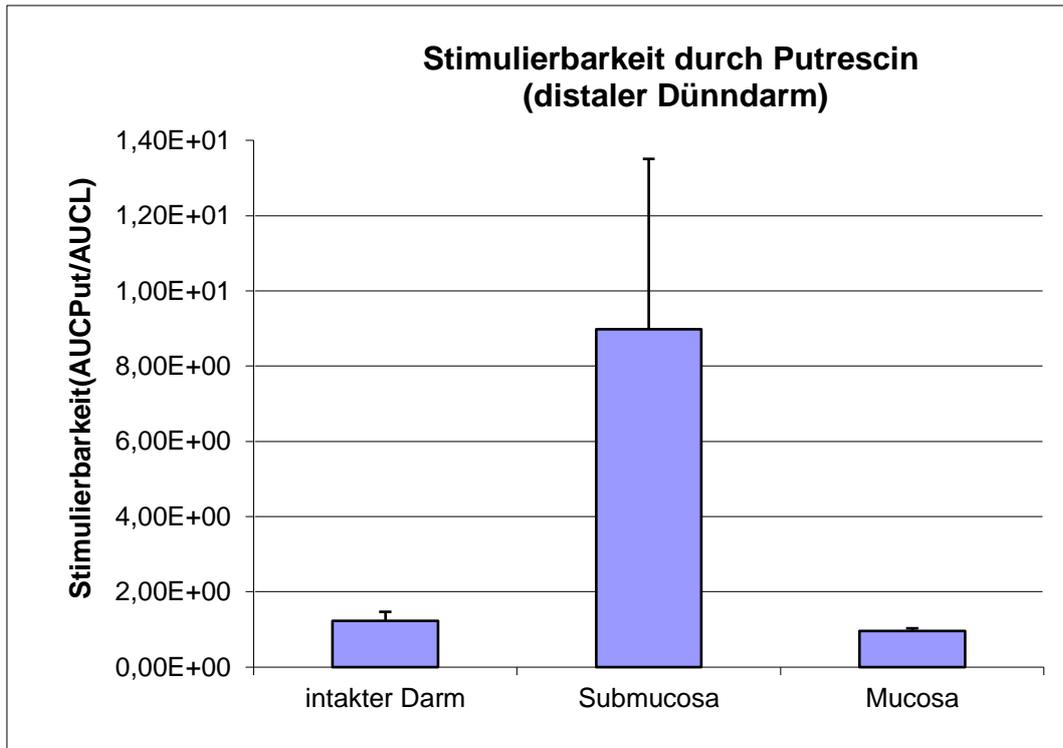


Abb. 19 Putrescinstimulierbare Radikalproduktion von Präparaten aus distalem Dünndarm. Die Säulen repräsentieren Mittelwerte \pm S.D. (n=6).

4.1.3 Hemmung der Histamininduzierten Radikalbildung durch Antikörper

Um die substratinduzierte ROS-Produktion in den Darmpräparaten einer diskreten Enzymaktivität zuordnen zu können, wurde im nächsten Schritt versucht, mit Antikörper, welche gegen DAO gerichtet sind, die Stimulation zu hemmen. Dabei wurden zwei verschiedene Antikörper unterschiedlicher Bezugsquelle und in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 und 21 dargestellt.

Prinzipiell lässt sich sagen, dass durch Inkubation mit den Ak sowohl von abcam als auch von sigma eine Hemmung der Radikalproduktion herbeigeführt werden konnte, so dass mit hoher Wahrscheinlichkeit DAO für diese verantwortlich ist.

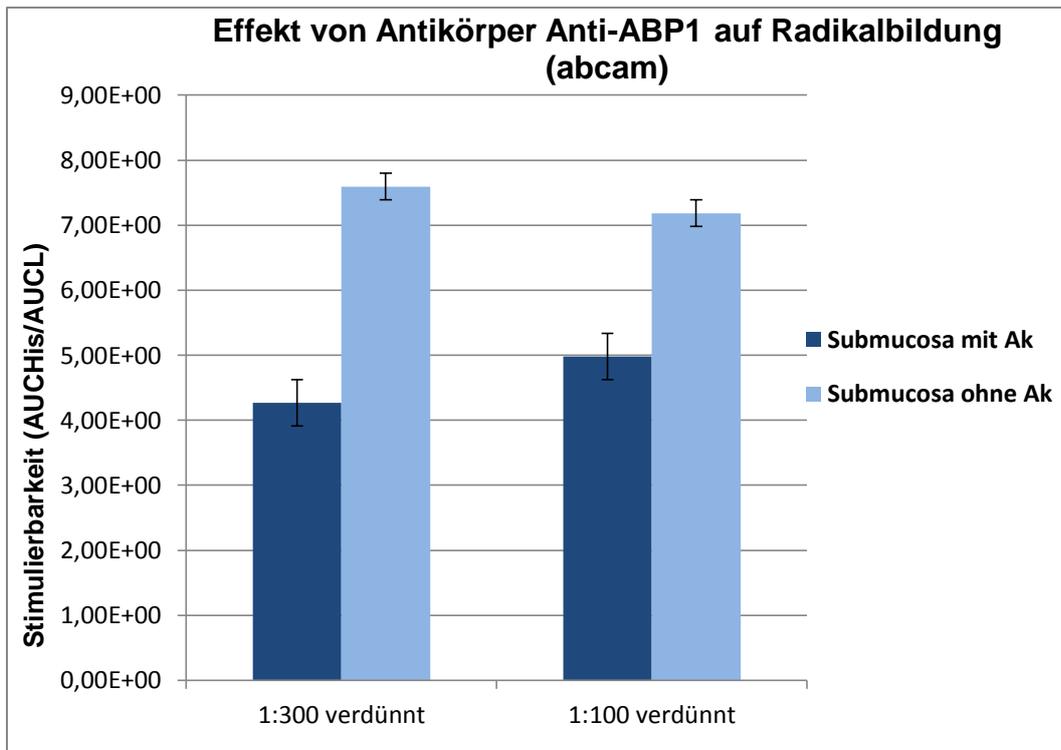


Abb. 20 Effekt des Antikörpers anti-ABP1 (abcam, ab100872) auf die Histamin-induzierte Radikalbildung. Dargestellt ist die Stimulierbarkeit der Submucosa durch Histamin nach Inkubation durch unterschiedlich verdünnte Ak (1:300 und 1:100) im Vergleich zu Kontrollen. Angegeben sind die Mittelwerte \pm S.D. (n=4).

Mit dem Ak von abcam war eine signifikante Hemmung der Radikalproduktion zu sehen. Diese betrug bei der 1:100 Verdünnung ca. 30%, bei der spezifischeren Verdünnung von 1:300 konnte sogar eine Hemmung von ca. 45% erreicht werden. Noch signifikantere Resultate konnten allerdings mit dem Ak von sigma erzielt werden. Hier betrug die Hemmung der Radikalproduktion sowohl bei der 1:50 als auch bei der 1:200 Verdünnung ca. 70%.

Aufgrund dieses Ergebnisses wurde der Ak von sigma für alle weiteren Versuche verwendet.

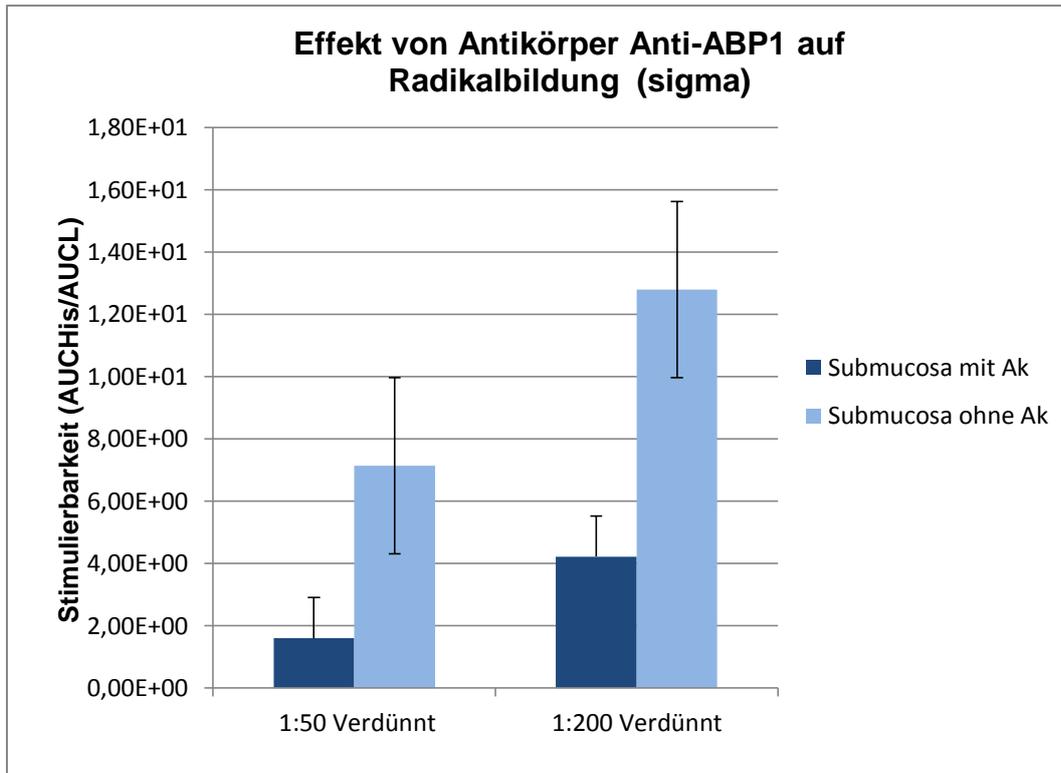


Abb. 21 Effekt des Antikörpers anti-ABP1 (sigma, HPA031032) auf die Histamin-induzierte Radikalbildung. Dargestellt ist die Stimulierbarkeit der Submucosa durch Histamin nach Inkubation durch unterschiedlich verdünnte Ak (1:200 und 1:50) im Vergleich zu Kontrollen. Angegeben sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3) bei der 1:200 Verdünnung und Mittelwerte \pm S.D. (n=6) bei der 1:50 Verdünnung.

4.2 DAO Nachweis mit Hilfe von Western-Blotting

Da laut Literatur die DAO vor allem in der Mucosa bzw. direkt in den Epithelzellen lokalisiert sein sollte, wurde ein gewebespezifischer Nachweis des Enzyms durch Western-Blotting durchgeführt. Zum Einsatz kamen der Antikörper Anti-ABP1 (HPA031032) und ein α/β -Tubulin Ak der Firma sigma, sowie ein mouse-anti-rabbit-HRP Ak der Firma cell signaling.

Das zusammengefasste Resultat der gefärbten Proteinbanden ist in Abb. 22 dargestellt und zeigt, dass die DAO Bande aus der Mucosa deutlich intensiver ist als die aus der Submucosa. Damit ist nachgewiesen, dass die Enzymexpression in der Mucosa größer ist als in der Submucosa.

Das Molekulargewicht des nachgewiesenen Proteins beträgt 92kDa, wobei Alpha-Tubulin als Kontrolle diente.



Abb. 22 Western Blot von Mucosa und Submucosa aus Mäusedünndarm. Anfärbt sind die Proteine Diaminoxidase und Alpha Tubulin.

4.3 Immunohistochemische Lokalisation der DAO in der Darmwand

Für die zellulären Lokalisation der DAO mittels Immunohistochemie wurden die Nachweisreaktionen, d.h. vor allem das Retrieval der Gewebeschnitte (siehe Kapitel 3.2.4) in verschiedenen Modifikationen durchgeführt. Die jeweiligen Befunde werden in den Abb. 23,25 und 27 dokumentiert. Bei allen Ansätzen wurde der Antikörper der Anti-ABP1 ((HP031032) 1:100) der Firma sigma als Primärantikörper verwendet. Als Positivkontrollen wurden Präparate aus humaner Niere und humanem Kolon verwendet, die einen positiven Enzymnachweis in den Tubuli bzw. in den Epithelzellen der Darmmucosa ergaben. (Bilder hier nicht dargestellt). In den vorliegenden Abbildungen wird der positive Nachweis durch eine Braunfärbung, die sich als Reaktionsprodukt des Antikörper-Antigen-Komplexes darstellt, erkennbar. Bei den Kontrollen wurden jeweils die Abbildungen gewählt, die mit den 10 bzw. 20fachen Objektiv erhalten wurden, bei den Immunfärbungen entsprechen die Vergrößerungen jeweils den 10, 20, 40 und 63fachen Objektiv.

In den Abb. 23 und 24 sind zunächst exemplarisch die Befunde, die mit Methode 1 (Retrieval mit Ziegenserum, Citratpuffer bei pH6) erhalten wurden, dargestellt. Die Übersicht (23a und b) lässt eine basale Braunfärbung in den Epithelzellen erkennen, während die hohen Vergrößerungen den positiven Enzymnachweis deutlich apikal und basolateral in den Epithelzellen der Mucosa aufweist. Die Kontrollen ohne Antikörperbehandlung zeigten keine DAO-Färbung an (Abb.24 a und b). Ergebnisse der Methode 2 (Retrieval mit Ziegenserum, TrisEDTA bei pH9) sind in Abb. 25 und 26 wiedergegeben; sie zeigen im wesentlichen denselben Nachweis von DAO wie er mit Methode 1 erhalten wurde, d.h. auch hier sind die Epithelzellen, vor allem apikal und basolateral, positiv gefärbt. Letztlich sind in Abb. 27 und 28 die Ergebnisse, die mit Methode 3 (Retrieval mit Schweineserum, Citratpuffer pH6) erzielt wurden dargestellt (hier nur Vergrößerungen mit 10 und 20fachen Objektiv).

Immunfärbung für DAO (Methode 1 / pH6)

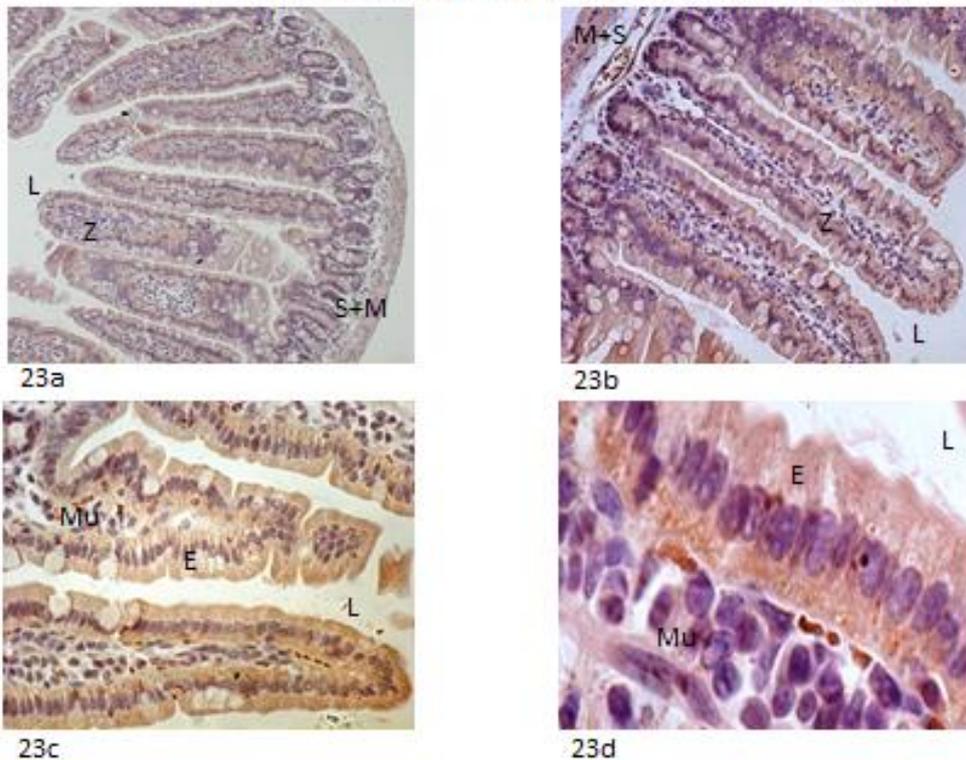


Abb. 23 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 1) beschrieben (Ziegenserum, Citratpuffer pH6 und Färbung mit DAB und Hämalaulösung) hergestellt. Antikörper (Anti-ABP1 HPA031032) ist 1:100 verdünnt.

Abb. 23a zeigt einen partiellen Querschnitt aus einem distalen Mäusedünndarm, aufgenommen unter einem 10x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss). Von außen nach innen sieht man die Muscularis (M), die Submucosa (S), Zotten (Z) und das Lumen (L). Die Serosa ist nicht sichtbar.

Abb. 23b zeigt einen Ausschnitt desselben Präparates aufgenommen unter einem 20x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss).

Bei beiden Abbildungen ist eine basale Braunfärbung in den Epithelzellen zu erkennen.

In den Abb. 23c und 23d (40x und 63x Objektiv) sieht man, dass ein positiver Enzymnachweis sowohl apikal als auch basolateral der Epithelzellen (E) erzielt wurde.

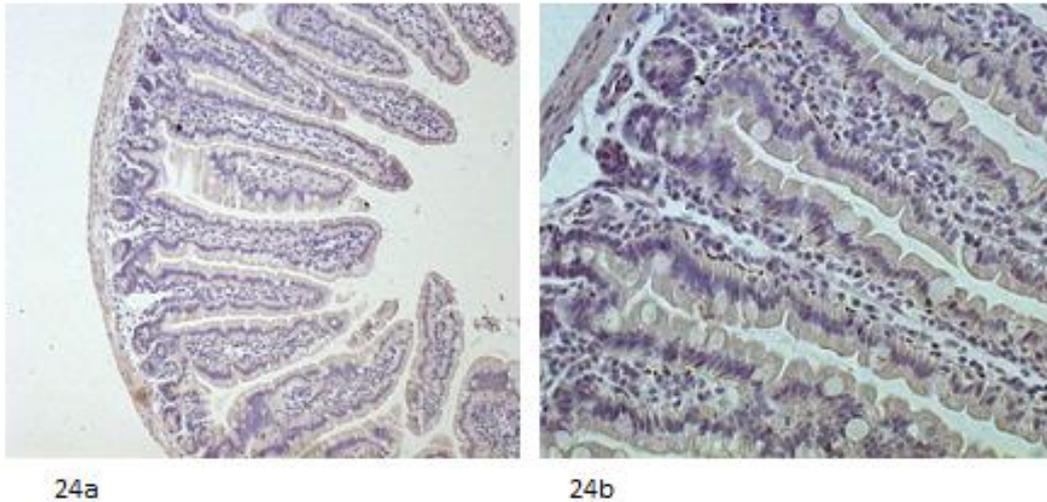
Kontrolle (Methode 1 / pH6)

Abb. 24 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 1) beschrieben (Ziegenserum, Citratpuffer pH6 und Färbung mit DAB und Hämalaunlösung) hergestellt. Ohne Antikörper behandelt.

Es handelt sich hier um Kontrollaufnahmen mit einem 10x und 20x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss) desselben Darmpräparates wie es für Abb. 23 verwendet wurde.

Wie zu erkennen ist, sind die Epithelzellen nicht DAO-positiv gefärbt.

Immunfärbung für DAO (Methode 2 / pH9)

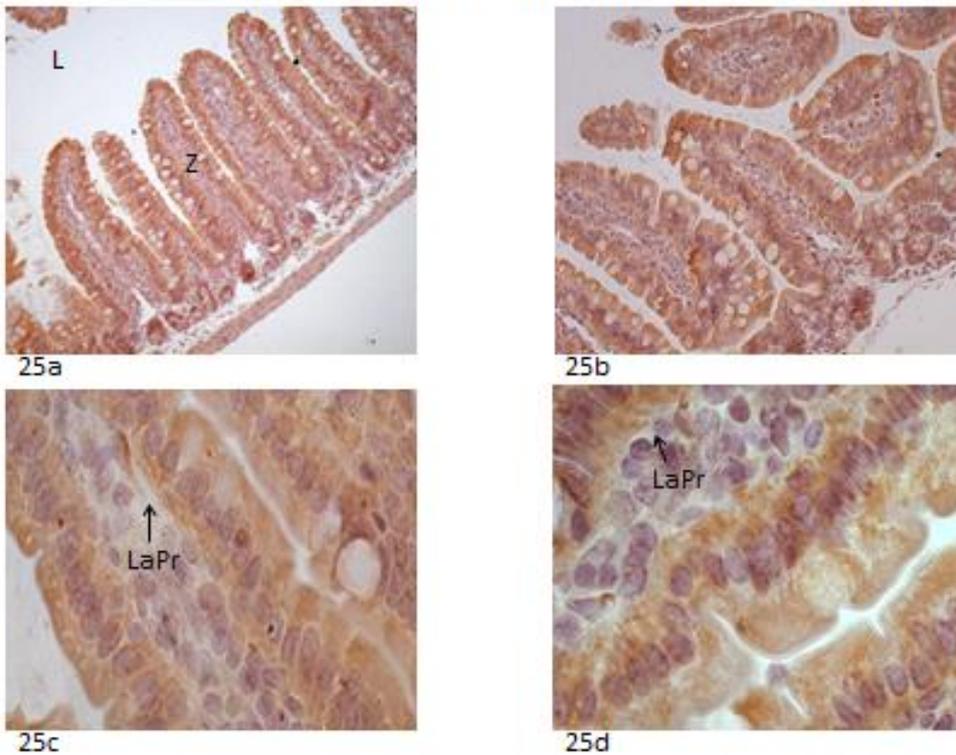


Abb. 25 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 2) beschrieben (Ziegenserum, Tris EDTA pH9 und Färbung mit DAB und Hämalanlösung) hergestellt. Antikörper (Anti-ABP1 HPA 031032) ist 1:100 verdünnt.

Abb. 25 a-d zeigen Querschnitte eines Dünndarmpräparates, das mit der Modifikation TrisEDTA/pH9 (=Methode 2) gefärbt wurde. Deutlich zu sehen ist ein positiver Enzymnachweis, basolateral und apikal in den Epithelzellen. Gut sichtbar ist in Abb. 25d (63x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss)), dass die Lamina propria (LaPr) nicht DAO-spezifisch gefärbt ist.

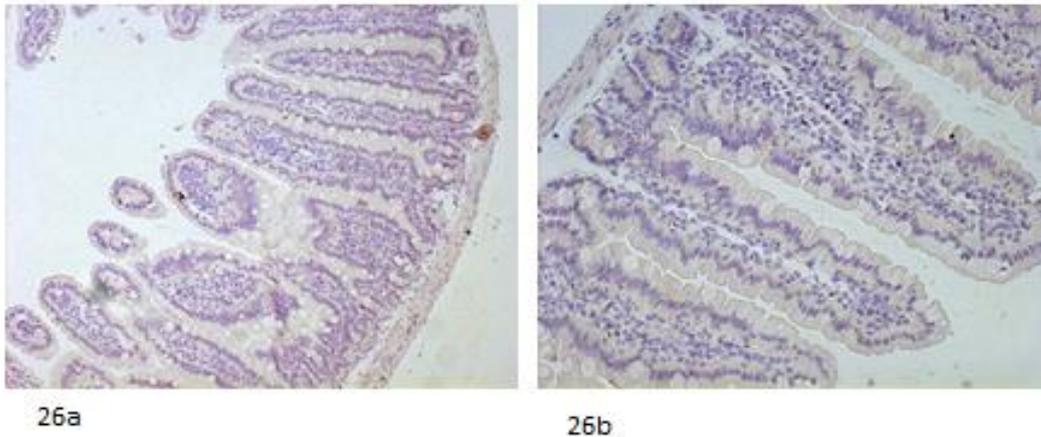
Kontrolle (Methode 2 / pH9)

Abb. 26 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 2) beschrieben (Ziegenserum, Tris EDTA pH9 und Färbung mit DAB und Hämalaunlösung) hergestellt. Ohne Antikörper behandelt.

Es handelt sich um Kontrollaufnahmen des gleichen Darmpräparates wie in den Abbildungen 25 a-d. Aufgenommen mit einem 10x und 20x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss).

Auch bei diesen Kontrollaufnahmen ist zu erkennen, dass keine spezifische Färbung für DAO auftritt.

Immunfärbung der DAO (Methode 3 /pH6)

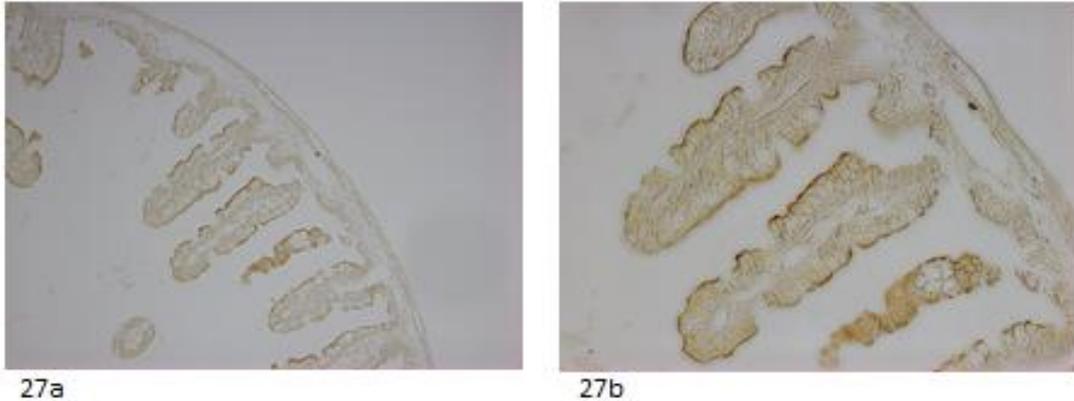


Abb. 27 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 3) beschrieben (Schweineserum, Citratpuffer mit pH6 und Färbung in DAB-Lösung) hergestellt. Antikörper (Anti-ABP1 HPA031032) ist 1:100 verdünnt. Es handelt sich um Aufnahmen mit einem 10x und 20x Objektiv (Axioplan 2 und AxioCam von Zeiss). Zu sehen ist, dass eine apikale Färbung der Dünndarmepithelzellen stattgefunden hat.

Kontrolle (Methode 3 / pH6)

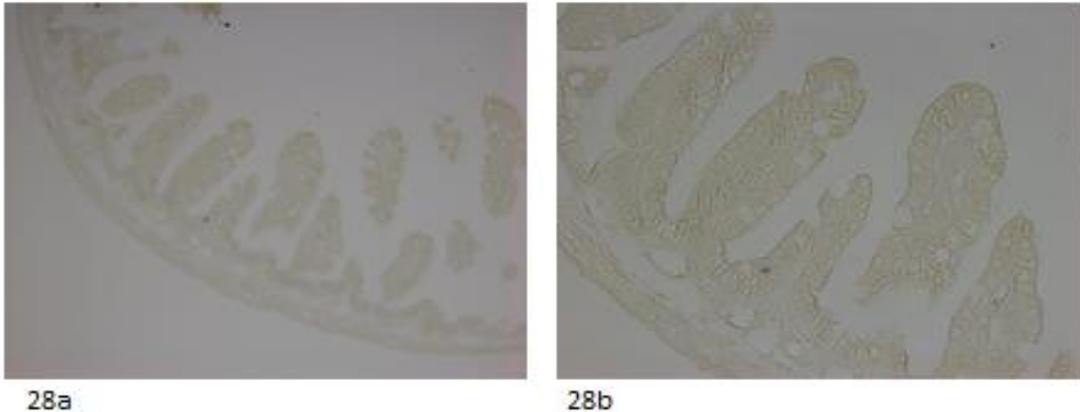


Abb. 28 Querschnitte aus Mäusedünndarm wie in Methodenteil 3.2.4 (Methode 3) beschrieben (Schweineserum, Citratpuffer mit pH6 und Färbung in DAB-Lösung) hergestellt. Ohne Antikörper behandelt.

In den Abb. 28 a und b handelt es sich um Kontrollaufnahmen desselben Präparates wie in den Abb. 27a und b. Auch hier hat keine Färbung stattgefunden, lediglich ein paar bräunliche Stellen, welche auf die Färbung in DAB-Lösung zurückzuführen sind, sind zu sehen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Dünndarm der Maus DAO immunohistochemisch nachgewiesen werden kann, wobei im Wesentlichen die Epithelzellen apikal und basolateral angefärbt werden.

Die Submucosa zeigte keine positive Färbung.

Beim Vergleich der Methoden lässt der Schluss zu, dass Methoden 1 und 2 als gleich geeignet sind und Methode 3, wahrscheinlich aufgrund des Schweineserums, weniger geeignet ist.

4.4 Antioxidative Eigenschaften der Darmwand

Um den Widerspruch aufzulösen, dass DAO in der Mucosa lokalisiert ist, mit der Chemilumineszenz-Methode aber keine Enzymaktivität dort messbar ist, sollte zusätzlich die antioxidative Kapazität von Mucosa und Submucosa bestimmt werden, um zu prüfen, ob starke antioxidative Eigenschaften des Gewebes den Nachweis von Radikalen verhindern.

Diese Bestimmung wurde mit Hilfe der AAPH-Reaktion durchgeführt, die Ergebnisse sind in Abb. 29 und Tab. 4 dargestellt.

Zunächst zeigt die Originalregistrierung (Abb. 29), dass schon im Kontrollansatz eine starke Störung der CL-Reaktion, die aus dem spontanen Zerfall der AAPH-Moleküle stammt auftritt. Davon heben sich aber deutlich die antioxidativen Effekte der Gewebeproben ab, die zu einer mehr oder weniger langanhaltenden Unterdrückung der CL führen. Es wird offensichtlich, dass bei Proben aus Mucosa und intaktem Darmstück der Wiederanstieg der CL sehr viel später eintritt als bei solcher aus Submucosa. D.h. die Auslöschzeiten bzw. die Antioxidative Kapazitäten der Mucosa und des intakten Darmpräparates sind größer als die der Submucosa.

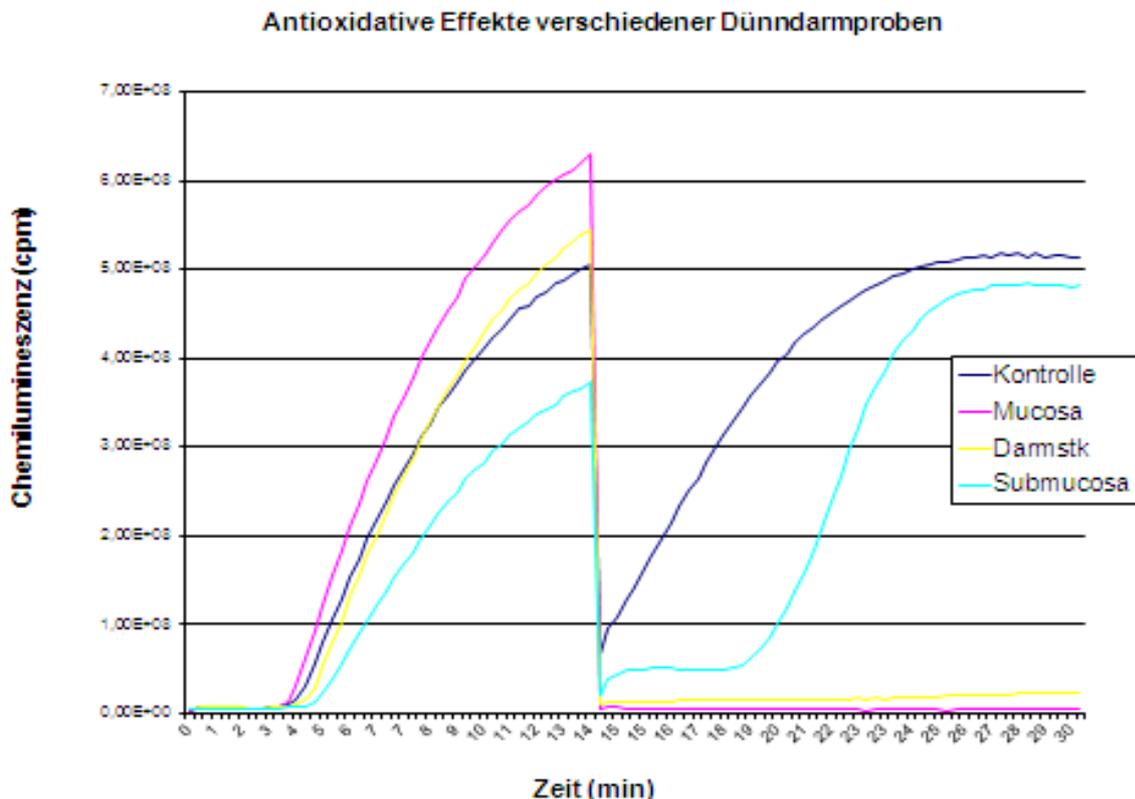


Abb. 29 Originalregistrierung der AAPH-Reaktion mit Zusatz von Darmgewebe. Die Quantifizierung der Radikalbildung erfolgte über die Messung der Luminol-verstärkten Chemilumineszenz in einem Biolumat.

Wie aus Abb. 29 hervorgeht, ist für die Präparate „Mucosa“ und „intakter Darm“ wegen der über die Messzeit hinausgehende Unterdrückung der CL keine exakte Berechnung der Auslöschzeit möglich. Aber aus dem Verlauf der Messkurven kann abgelesen werden, dass die entsprechenden Zeiten deutlich länger als 15 min dauerten.

Tabelle 4 zeigt Beispiele von sieben Berechnung für die Auslöschzeit der Submucosa unterschiedlicher Mäusedünndärme, unter Berücksichtigung von proximalen und distalen Abschnitten. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, dass die Antioxidativen Eigenschaften der Submucosa von Maus zu Maus sehr unterschiedlich sein können. Die Frage, ob es einen Unterschied in der Antioxidativen Kapazität zwischen proximalen und distalen Abschnitten gibt, konnte nicht eindeutig geklärt werden, da, wie man in Tab. 4 sieht, sehr unterschiedliche Ergebnisse der Auslöschzeiten gefunden wurden.

Tab. 4

	1 proximal	2 proximal	3 proximal	4 proximal	1 distal	2 distal	3 distal
Zeit (min) bis zum Halbmaximum Submucosa B	4,81	7,60	3,70	2,22	3,33	4,07	5,20
Zeit (min) bis zum Halbmaximum Kontrolle A	2,40	3,33	2,22	1,85	2,78	0,40	1,67
Auslöschzeit (B – A) (min)	2,41	4,27	1,48	0,37	0,55	3,67	3,53

5 Diskussion

5.1 Bedeutung der DAO für den Histaminabbau beim Menschen

Histamin ist das biogene Amin der Aminosäure Histidin und ist im tierischen und menschlichen Organismus ein multifunktionaler Wirkstoff, der sowohl physiologisch als auch pathophysiologisch von großer Bedeutung ist. Die Wirkungen von Histamin werden über membranständige (G-Proteingekoppelte) Rezeptoren vermittelt, von denen bisher 4 verschiedene Typen charakterisiert sind und die in verschiedenen Zellen bzw. Geweben exprimiert werden. Physiologisch wichtig ist Histamin als Neurotransmitter und Gewebehormon, pathophysiologisch wichtige Effekte sind u.a. allergische Reaktionen mit Schwindel, Urticaria, Diarrhö und cholikartigen Krämpfen. Besonders im Darm spielt Histamin eine große Rolle, wo es exogen, über die Nahrung aufgenommen oder endogen von spezifischen Zellen selbst, produziert, gespeichert und sezerniert werden kann.

Wegen der vielfältigen Wirkungen kommt dessen Abbau bzw. Inaktivierung eine große Bedeutung zu. Dies kann zum einen intrazellulär über eine Ringmethylierung des Histamins mit Hilfe der Histamin-N-Methyltransferase (HNMT), zum anderen extrazellulär über eine oxidative Desaminierung durch die Diaminoxidase, geschehen.

Wird dieses Gleichgewicht zwischen Histaminaufbau und -abbau gestört, z.B. im Rahmen einer verminderten Aktivität der DAO, so kann es zu den oben genannten Symptomen kommen. Wenn diese Symptome vor allem nach der Aufnahme bestimmter Lebensmittel auftreten und einer allergischen Reaktion ähneln, wird auch von einer Histaminintoleranz gesprochen.

In vorangegangenen Dissertationen (*Naydenova-Wenk 2013 und Merkel 2010*) konnte gezeigt werden, dass vor allem in einer Submucosapräparation des Mäusedünndarms eine Histamin-induzierbare Freisetzung von ROS zu finden ist. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit mit weiteren Nachweismethoden geklärt werden, ob diese Radikalbildung auf die Aktivität der DAO zurückzuführen ist und wo genau dieses Enzym in der Darmwand exprimiert wird.

5.2 Nachweis der Diaminoxidase im Darmgewebe

5.2.1 Funktioneller Nachweis über Luminol-verstärkte CL

Bei der Umsetzung des Histamins zu Imidazolessigsäure durch die DAO werden auch Sauerstoffradikale bzw. Wasserstoffperoxid freigesetzt. Diese können mit Luminol in einer Chemilumineszenzreaktion sichtbar und in einem Biolumat messbar gemacht werden.

In Anlehnung an die Dissertation von Merkel (2010) konnte mit dieser Methode zunächst gezeigt und bestätigt werden, dass in Submucosa-Präparaten aus Mäusedünndarm eine Histamin-stimulierbare Radikalquelle nachweisbar ist. Da, wie hier gezeigt, auch Putrescin als Substrat eine positive CL-Reaktion hervorruft, ist als Mechanismus eher eine direkte Enzymreaktion als eine rezeptorabhängige Signalkaskade anzunehmen. Hierfür scheint die DAO der geeignete Kandidat zu sein, da für sie beide Substanzen als Substrate beschrieben sind (*Raithel et al. 1998, Mizuguchi et al. 1994, Sessa et Perin 1994 und Menning et al. 1989, Romijn et al. 1986, uniprot*). Zusätzlich konnte in der Dissertation von Naydenova-Wenk (2013) gezeigt werden, dass Aminoguanidin diese ROS-Bildung hemmt, was zusätzlich für DAO als Quelle spricht. Ein weiterer Beweis der für die DAO als Radikalquelle spricht, ist die Tatsache, dass die ROS-Bildung durch DAO spezifische Antikörper ebenfalls deutlich gehemmt wurde.

Allerdings sollte laut Literatur DAO in den Enterozyten des Epithels gebildet werden (*Wollin et al. 1998 und Nakos und Gossrau 1994, EHRS*), so dass die Frage blieb, warum in Präparaten der Mucosa und der gesamten Darmwand die ROS-Bildung nicht gemessen werden konnte.

5.2.2 Nachweis durch Western Blot

Da eine Hemmung der Histamin-induzierten CL-Reaktion durch spezifische Ak gegen DAO möglich war, konnte ein Versuch zur Lokalisation des Enzyms im Mäusedünndarm durch immunologische Verfahren unternommen werden. Hierzu

wurde zunächst eine Western-Blot Analyse von Mucosa und Submucosa durchgeführt. Die vorgelegten Ergebnisse zeigen deutlich, dass die DAO hauptsächlich in der Mucosa lokalisiert ist, wenngleich auch zu geringen Mengen in der Submucosa. Dieser Befund, der im Einklang mit den Befunden des menschlichen Darms ist (*Sessa und Perin 1994, Daniele und Quaroni 1990*) erklärt, warum bei den pharmakologischen Untersuchungen eine starke ROS-Produktion auch in dieser Schicht gefunden wurde, möglicherweise besonders gefördert durch die Präparationsweise der Submucosa, bei der durch Abquetschen der Mucosa auftretende DAO an Bindegewebe absorbiert werden könnte. Zudem lässt sich die Lamina propria, in welche laut einiger Autoren die DAO sezerniert wird, nicht vollständig von der Submucosa trennen.

Allerdings bleibt trotz dieses Ergebnisses des Western-Blots die Frage, warum mit Mucosa keine His-stimulierbare ROS-Produktion gemessen werden kann. Eine Hypothese dazu war, dass eventuell Proteasen des Pankreas stören könnten. Um diese Möglichkeit auszuschließen wurden Messungen mit Serum statt mit Tyrode durchgeführt, welche jedoch zu denselben Befunden führten.

Die Erklärungsmöglichkeiten, dass der CL-abhängige funktionelle Nachweis der DAO durch die antioxidativen Eigenschaften der Mucosa beeinträchtigt wird, werden in 5.3 weiter diskutiert.

5.2.3 Nachweis durch Immunohistochemie

Für die genaue Lokalisation der DAO im Darm wurde als letzte Methode der immunohistochemische Nachweis verwendet. Dieser zeigt, dass sich die DAO im muralen Dünndarmgewebe sowohl apikal, als auch basolateral in den Enterozyten befindet. Somit stimmt dieses Ergebnis mit den Befunden bei Menschen und Schwein überein. (*Aschenbach et al. 2009, Schwelberger et al. 1998a und b, Sessa und Perin 1994, Daniele und Quaroni 1990*).

Bemerkenswert ist, dass immunhistochemisch keine DAO spezifische Anfärbung in der Submucosa zu finden ist. Der im Western-Blot erbrachte Nachweis bzw. die funktionelle positive Reaktion mit Submucosa scheint also ausschließlich auf artifizielle Veränderungen (z.B. Absorption) während der Präparation und Gewebereste der Mucosa in der Submucosa zurückzuführen zu sein.

5.3 Bestimmung der Antioxidativen Kapazität

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, war eine Hypothese, warum wir keine ROS Bestimmung in der Mucosa erhielten, dass diese starke antioxidative Eigenschaften besitzt. Die in dieser Dissertation durchgeführten Versuche liefern eine Orientierung über diese Eigenschaften der Darmwand und zeigen, dass vor allem in der Mucosa eine hohe Konzentration von Antioxidantien vorliegen muss. Leider gibt es zu diesem Befund noch keine vergleichbaren Publikationen, so dass über die Art der Antioxidantien, ihre physiologische Funktion und vor allem pathophysiologische Bedeutung bei Entzündungen bisher nur spekuliert werden kann und weiter erforscht werden muss. Ebenso muss die Therapieempfehlung mit DAO gegen Nahrungsmittelunverträglichkeit in diesem Licht gesehen und überprüft werden.

6 Zusammenfassung

Histamin ist ein multifunktionaler Wirkstoff, dem sowohl in physiologischer als auch pathophysiologischer Hinsicht große Bedeutung zukommt. Dies wird besonders im Magen-Darm-Trakt deutlich, wo Histamin endogen gebildet, aber auch exogen durch die Nahrung zugeführt werden kann. Bei der sog. Histaminintoleranz (Nahrungsmittelunverträglichkeit), an der ca. 1% der Bevölkerung leiden und deren Symptomatik unter anderem durch gastrointestinale Beschwerden gekennzeichnet ist, liegt häufig eine mit dem Abbau durch das Enzym Diaminoxidase (DAO) verbundene Störung vor. Ein anderer Aspekt ergibt sich daraus, dass in mehreren aus unserer Arbeitsgruppe stammenden Dissertationen eine durch Histamin stimulierbare Quelle für reaktive Sauerstoffmetabolite in Präparaten am Mäusedünndarm beschrieben wurde. Damit ergibt sich ein bisher nicht untersuchter Zusammenhang zwischen Histamin und dem für die Inflammationsreaktion typischen oxidativen Stress, so dass in der vorliegenden Arbeit die Frage untersucht werden sollte, ob evtl. die DAO für die Radikalproduktion verantwortlich ist und wo diese in der Darmwand lokalisiert ist.

Zunächst wurde über den funktionellen Nachweis, dem die Messung der Histamin-stimulierten Radikalproduktion über Luminol-verstärkte Chemilumineszenzen zugrunde liegt, die Lokalisation in submucosalen Gewebe, wie in den vorhergehenden Arbeiten beschrieben, verifiziert und durch die Verwendung des Substrates Putrescin, die Zuordnung zur DAO wahrscheinlich gemacht.

Allerdings versagte dieser Nachweis, wenn Präparate aus Mucosa oder der vollständigen Darmwand verwendet wurden. Die eindeutige Zuordnung der Radikalquelle zur DAO gelang durch die Verwendung von Antikörpern gegen dieses Enzym, die zu einer deutlichen Hemmung der Radikalproduktion führte.

Aufgrund der immunologischen Hemmbarkeit der Radikalproduktion wurde der direkt Proteinnachweis im Western-Blot-Verfahren durchgeführt. Dabei zeigte sich eine Proteinbande, die im Molekulargewicht den publizierten Daten der DAO entsprach (92kDA), allerdings ergab der Nachweis in Präparaten aus der Mucosa eine größere Expression als in denen aus Submucosa und es stellte sich die Frage, warum der funktionelle Nachweis in Mucosa bzw. gesamter Darmwand nicht gelingt.

Zur Klärung dieser Frage wurden in vorläufigen Experimenten mittels AAPH-Reaktion die Antioxidative Kapazität von Mucosa und Submucosa bestimmt. Diese Ergebnisse

zeigten, dass vor allem in der Darmmucosa eine hohe Antioxidative Kapazität vorliegt, durch die vermutlich der funktionelle Nachweis der Radikalbildung verhindert wird.

Die definitive Lokalisation der DAO erfolgte letztlich durch Anwendung immunohistochemischer Methoden. Da noch keine Standardverfahren für den Mäusedarm publiziert wurden, wurde die Methode in verschiedenen Varianten appliziert, die aber alle sehr deutlich zeigten, dass DAO praktisch nur in den Epithelzellen der Mucosa, wie auch vergleichbar in Ratte, Schwein und Mensch beschrieben, exprimiert wird. Der funktionelle Nachweis in den Präparaten aus Submucosa stellt also wohl ein Präparationsartefakt dar.

Mit diesen Befunden wird erstmalig über die Rolle der DAO ein Mechanismus aufgezeigt und lokalisiert, über den Histamin oxidativen Stress in der Darmwand hervorrufen kann; der in den 80-90er Jahre empfohlene Einsatz von DAO zur Therapie der Histaminunverträglichkeit ist unter diesem Aspekt sicher neu zu überprüfen.

7 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Konzeption der Studie erfolgte durch meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Heinle, Studienbeauftragter am Institut für Physiologie der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Alle Gewebepreparationen und funktionellen Messmethoden wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (Frau Karin Klein und Frau Dr. Desislava Naydenova-Wenk) von mir erlernt, die entsprechenden Ergebnisse wurden von mir selbstständig erhoben und ausgewertet. Unterstützung erhielt ich dankenswerter Weise sowohl bei den Immunohistochemischen Verfahren von Herrn PD Dr. L. Just, Frau PD Dr. E. Küppers, Frau Dr. Y. Zhang, Frau L. Macher und Frau E. Maier (Anatomisches Institut), als auch bei dem Western-Blotting von Herrn Sebastian Schmidt (Institut für Physiologie).

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch meinen Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Heinle verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 12.02.2015



Naomi Gabriel

8 Literaturverzeichnis

Ahrens F., Gäbel G. und Aschenbach J.R. (2006): Release and permeation of histamine in isolated caecum epithelia of pigs. *Inflamm Res.*; 55(2):66-71.

Aschenbach J.R., Honscha K.U., von Vietinghoff V. und Gäbel G. (2009): Bioelimination of histamine in epithelia of the porcine proximal colon of pigs. *Inflamm Res.*; 58(5):269-276.

Baenziger N., Dalemar L., Mack P., Haddock R. (1994): Histamine degradative uptake by cultured human pulmonary vascular endothelial cells utilizes an inflammatory cell diamine oxidase. *J. Biol. Chem.*; 269 (52):32858-32864.

Bieganski T. (1983): Biochemical, physiological and pathophysiological aspects of intestinal diamine oxidase. *Acta Physiol Pol.*; 34(1):139-154.

Bieganski T., Kusche J., Lorenz W., Hesterberg R., Stahlknecht C.-D. und Feussner K-D. (1983): Distribution and properties of human intestinal diamine oxidase and its relevance for the histamine catabolism. *Biochim Biophys Acta.*; 756(2):196-203.

Blatz R. (1999) : Medizinische Mikrobiologie und Immunologie - systematisch. Uni-Med, Bremen.

Bodmer S., Imark C., Kneubühl M. (1999): Biogenic amines in foods: Histamine and food processing. *Inflamm. res.* 48, 296- 300, Birkhäuser Verlag Basel.

Boros M., Kaszaki J., Nagy S. (1991): Histamine release during intestinal ischemia-reperfusion: role of iron ions and hydrogen peroxide. *Circulatory Shock*; 35(3):174-180.

Böttcher I. Und Klimek L. (2008): Das Histaminintoleranzsyndrom; seine Bedeutung für die HNO-Heilkunde. Springer Medizin Verlag; HNO 2008, 56:776-783.

von Bruchhausen F., Ebel S., Hackenthal E., Holzgrabe U. (1999): Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgeband 4, Seite 328-329, Stoffe von A-K, Springer Verlag Berlin Heidelberg New York.

Byung J.K., Young K.K., Euiyong K., Insuk S., (2013): Effects of Histamine on Cultured Interstitial Cells of Cajal in Murine Small Intestin. Korean J Physiol Pharmacol.;17(2): 149–156.

Chassande O., Renard S., Barbry P. and Lazdunski M., (1994): The human gene for diamine oxidase, an amiloride binding protein. J. Biol. Chem.; 269 (20): 14484-14489.

D`Agostino L., Daniele B., Pignata S., D`Argenio G. und Mazzacca G. (1988): Modifications in enterocyte diamine oxidase distribution induced by heparin in the rat. Biochem Pharmacol.; 38(1):47-49

Daniele B., Quaroni A. (1990): Polarized secretion of diamine oxidase by intestinal epithelial cells and its stimulation by heparin. Gastroenterology.; 99(6):1675-1687

Dauderer klinische Toxikologie (1996): Scombrototoxin/Histamin III-10.3. Tox Center e.V., München.

Davijani F. (2005): Untersuchungen zur Bedeutung von oxidativem Stress bei Präeklampsie; Dissertation Eberhard-Karls-Universität Tübingen.

Germann I. D. (2005): Charakterisierung der radikalfangenden Eigenschaften pflanzlicher Entzündungshemmer; Dissertation Eberhard-Karls- Universität Tübingen.

Gutteridge J.M.C., Halliwell B. (1994): Antioxidants in nutrition, health and disease, Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press.

Gross R. (2007): Direkte und indirekte Effekte thrombozytärer Chemokine auf humane Mastzellen; Dissertation Medizinische Universität zu Lübeck.

Hagelauer D. (2007): In vitro Untersuchungen zur Wirkung von Phytopharmaka auf die Kontraktilität des Mäuse-Ileums: Mögliche Bedeutung für die Therapie des Reizdarmsyndroms. Dissertation der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Ienistea (1971): Bacterial production and destruction of histamine in foods, and food poisoning caused by histamine. *Die Nahrung*.; 15(1):109-113

Küfner M.A., Schwelberger H.G., Weidenhiller M., Hahn E.G. und Raithel M. (2004): Both catabolic pathways of histamine via histamine-N-methyl-transferase and diamine oxidase are diminished in the colonic mucosa of patients with food allergy. *Inflamm. Res.* 53. Suppl. I, 31-32.

Küfner M.A., Schwelberger H.G., Hahn E.G., Raithel M. (2008): Decreased histamine catabolism in the colonic mucosa of patients with colonic adenoma. *Dig Dis Sci.*; 53(2):436-442. Epub 2007 Jun 12.

Ladetzki-Baehs K., Dirsch V. M. und Vollmar A. M. (2004) : Omalizumab: vom IgE zum Anti-IgE; *Pharm. unserer Zeit*, 33, Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

Leurs R., Chazot P.L., Shenton F. C., Lim H.D. and de Esch I.J.P: Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H₄ receptor. *Br. J. Pharmacol.*; 157:14-23.

Luk G.D., Bayless T. M. und Baylin S. B. (1980): Diamine oxidase: a circulating marker for rat intestinal mucosal maturation and integrity. *J. Clin. Invest.*; 66(1):66-70.

Maintz L. and Novak N. (2007): Histamine and histamine intolerance. *Am J. Clin. Nutr.*; 85(5):1185-96.

Maintz L., Bieber T., Novak N. (2006): Die verschiedenen Gesichter der Histaminintoleranz. *Deutsches Ärzteblatt*; 103(51-52): 3477-3483.

Mehrle P. (2008): Histaminfreisetzung aus basophilen Granulozyten bei erhöhter Mastzelltryptasekonzentration im Serum; Dissertation Ludwig- Maximilians-Universität München.

Mennigen R., Bieganski T., Elbers A. und Kusche J. (1989): The histamine-diamine oxidase system and mucosal proliferation under the influence of aminoguanidine and seventy percent resection of the rat small intestine. *Agents Actions.*; 27(1-2):221-223.

Mennigen R., Günther M., Bönninghoff N., Stahlknecht C.-D., Kubitza I., Kusche J. (1986): Diamine oxidase as a marker of intestinal integrity in acute appendicitis. *AgentsActions.*;18(1-2):38-40.

Merkel K. (2010): Wirkungen von pflanzlichen Extrakten auf murines Ileum: Untersuchungen zum Reizdarmsyndrom an in vitro Modellen. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen.

Mizuguchi H., Imamura I., Takemura M. und Fukui H. (1994): Purification and characterization of diamine oxidase (histaminase) from rat small intestine. *J. Biochem.*; 116(3):631-635.

Müller J., Ottejann R., Seifert J. (Hg) (1989)0: Ökosystem Darm - Morphologie. Mikrobiologie.Immunologie. Springer-Verlag, Berlin.

Nakos G., Gossrau R. (1994): Light microscopic visualization of diamine oxidase using a cerium method. *Eur. J. Histochem.* 38(1): 13-22.

Naydenova-Wenk D. (2013): Histamin-induzierte Radikalproduktion in der Darmwand: Charakterisierung durch pharmakologische Wirkstoffe und spezifische Antikörper. Dissertation Eberhard Karls Universität Tübingen.

Parsons M. E. and Ganellin C. R. (2006): Histamine and its receptors. *Br. J. Pharmacol.*; 147:127-135.

Raithel M., Ulrich P., Hochberger J. und. Hahn E.G (1998):

Measurement of gut diamine oxidase activity. *Ann N Y Acad Sci.*; 859:262-266.

Raithel M., Kűfner M., Ulrich P. und Hahn E.G. (1999): The involvement of histamine degradation pathway by diamine oxidase in manifest gastrointestinal allergies. *Inflamm. Res.*; 48 Suppl. 1:75-76.

Robinson-White A., Baylin S. B., Olivecrona T. and Beaven M. A. (1985): Binding of diamine oxidase activity to rat and guinea pig microvascular endothelial cells. *J. Clin. Invest.*; 76(1):93-100.

Romijn J.C., Verkoelen C.F. und Splinter T.A.W. (1986): Species-dependent differences of the biochemical properties of diamine oxidase. *Int. J. Biochem.*; 18(9):835-839.

Rosler (2007) : Neurotransmitter an der Darmschleimhaut. *CO'MED Fachmagazin*; 8:109-111 (1).

Sander L.E., Lorentz A., Sellge G., Coeffier M., Neipp M., Veres T., Frieling T., Meier P.N., Manns M.P. und Bischoff S.C. (2006): Selective expression of histamine receptors H1R, H2R, and H4R, but not H3R, in the human intestinal tract. *Neurogastroenterology; Gut*, 55:498-504.

Sarkadi L. (2004): Histamine in food. *Histamine: Biology and Medical Aspects*, SpringerMed Publishing Ltd. and Karger AG.

Sattler J., Hűfner D., Klotter H.-J., Lorenz W. und Wagner P.K. (1988): Food-induced histaminosis as an epidemiological problem: plasma histamine elevation and haemodynamic alterations after oral histamine administration and blockade of diamine oxidase (DAO). *Agents and Actions*, vol. 23, 3/4.

Schmidt, Lang, Thews (2005): *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 29 Auflage, Springer Verlag.

Schwelberger H. G., Stalzer B., Maier H. und Bodner E. (1998a): Expression and cellular localisation of diamine oxidase in the gastrointestinal tract of pigs. *Inflamm Res.*; 47 Suppl 1:62-63.

Schwelberger H.G., Dieplinger H. und Kohlwein S.D. (1999): Diamine oxidase and catalase are expressed in the same cells but are present in different subcellular compartments in porcine kidney. *Inflamm Res.*; 48 Suppl 1:81-82.

Schwelberger H.G., Hittmair A. und Kohlwein S.D. (1998b): Analysis of tissue and subcellular localisation of mammalian diamine oxidase by confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Inflamm Res.*; 47 Suppl 1:60-61.

Schwelberger H.G. und Bodner E. (1998c): Identity of diamine oxidase proteins in porcine kidney and intestine. *Inflamm Res.*; 47 Suppl 1:58-59.

Schwelberger H.G. (2004): Diamine oxidase (DAO) enzyme and gene. *Histamine: Biology and Medical Aspects*, SpringerMed Publishing Ltd. and Karger AG.

Schwelberger H.G. (2010): Histamine intolerance: a metabolic disease? *Inflamm. Res.*; 59 Suppl 2: 219-221.

Schwengberg S. (1998): Isolierung und funktionelle Charakterisierung humaner intestinaler Mastzellen. Dissertation Universität Hannover.

SCIOTEC Diagnostic Technologies (2011): Diaminoxidase (DAO) Radioextraktionsassay zur quantitativen Bestimmung der DAO-Aktivität Serum und Plasma.

Sessa A. und Perin A. (1994): Diamine oxidase in relation to diamine and polyamine metabolism. *Agents Actions.*; 43(1-2):69-77.

Shaff R.E. und Beaven M. A. (1976): Turnover and synthesis of diamine oxidase in rat tissues. Studies with heparin and cycloheximide. *Biochem Pharmacol.*; 25(9):1057-1062.

Shakir K.M. Mohamed, Margolis S. und. Baylin S. B (1977): Localization of histaminase (diamine oxidase) in rat small intestinal mucosa: site of release by heparin. *Biochem. Pharmacol.*; 26(24):2343-2347.

Siems W., Krämer K., Grune T. (2005): : Oxidativer Stress und Pharmaka, PZ Schriftenreihe 15, Govi-Verlag.

Steimecke G. (2006): Bindung von Histamin durch froximun. Froximun AG.

Müller-Werdan U. und Werdan K. (1999): Anaphylaxie und Allergie. Notfall&Rettungsmedizin, Springer-Verlag; 2:454-464.

Wollin A., Wang X. und Tso P. (1998): Nutrients regulate diamine oxidase release from intestinal mucosa. *Am. J. Physiol.*; 275(4 Pt 2):969-975.

Wilfingseder D. und Schwelberger H. G. (2000): Highly efficient purification of porcine diamine oxidase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.*; 737(1-2):161-166.

Wolvekamp MC und de Bruin RW. (1994): Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig. Dis.*; 12(1):2-14.

Vivica von Vietinghoff-Scheel (2007): Intestinale Mechanismen zum Schutz vor Histaminbedingten Intoxikationen beim Schwein. Dissertation Universität Leipzig

Vogelreuter A. (2012): Nahrungsmittelunverträglichkeiten. Lactose – Fructose – Histamin – Gluten. Seiten 88- 147, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

Zampeli E. and Tiligada E. (2009): The role of histamine H₄ receptor in immune and inflammatory disorders. *Br. J. Pharmacol.*; 157: 24-33.

Verwendete Seiten aus dem Internet:

Uniprot.org, abgerufen 2012.

Sigmaaldrich, abgerufen 2012.

European Histamine Research Society, abgerufen 2013; Schwelberger H.:
Metabolism of histamine.

HGNC: HUGO Gene Nomenclature Committee, abgerufen 2013.

9 Danksagung

„Ich weiß, dass ich nichts weiß“ (Sokrates 470-399 v. Chr.).

Diesen altbekannten Satz begann ich erst so richtig im Laufe meiner Doktorarbeit zu verstehen. Viele Stunden verbrachte ich damit, Experimente zu planen und die Ergebnisse mit dem Gelesenen abzugleichen und zu interpretieren. Nicht selten war ich, wenn die Versuchsanordnung unbrauchbare Ergebnisse lieferte, eine mies gelaunte Zeitgenossin. Daher möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die nicht nur meine schlechte Laune und mein Gezeter ertragen mussten, sondern mich auch immer wieder motiviert haben und mich mit hilfreichen Tipps unterstützt haben.

Vielen Dank an die Mitarbeiter des anatomischen Instituts Tübingen Herrn PD Dr. L. Just, Frau Dr. Y. Zhang und Frau L. Macher. Danke auch an Frau PD Dr. E. Küppers und ihrer Mitarbeiterin Frau Maier, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre so tolle und schöne Bilder von den Versuchen zu bekommen!

Ein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. H. Heinle. Zum einen für das Vertrauen, das er in mich setzte, als er mir das anspruchsvolle Thema gab, zum anderen für die vielen konstruktiven Anregungen sowie für die viele Zeit, die er sich für meine Fragen nahm. Zudem fand er immer aufmunternde Worte für mich.

Nicht zu vergessen ist meine Familie, insbesondere meine Eltern, denen ich einen großen Dank für Ihre Unterstützung schulde.

Und weil ich jetzt so geübt bin im Zitate schreiben, möchte ich meine Doktorarbeit mit dem Zitat: *Es gibt in der Welt selten ein schöneres Übermaß als das der Dankbarkeit* (Jean de la Bruyere (1645-1696)) zum Schluss bringen.