

98. Biologische Citrullinsynthese, Glutamin und α -Ureidoglutarsäure¹⁾

von F. Leuthardt, A. F. Müller und H. Nielsen.

(28. XII. 48.)

Die Synthese des Citrullins aus Ornithin, Ammoniak und Kohlensäure geht, wie *Cohen* und *Hayano*²⁾ sowie *Borsook* und *Dubnoff*³⁾ gezeigt haben, nicht nur im intakten Gewebe, sondern auch in der homogenisierten Leber vorstatten, wenn man das Homogenat durch Glutaminsäure und A.T.P. (Adenosintri-phosphat) ergänzt. *Cohen* und Mitarbeiter haben auch gefunden, dass das Fermentsystem, welches die Synthese bewirkt, in der abzentrifugierbaren Fraktion des Homogenats enthalten ist. Wir konnten den Nachweis leisten, dass es in den Mitochondrien lokalisiert ist (*Leuthardt* und *Müller*⁴⁾). Wenn man mit ausgewaschenem Homogenat oder mit reinen Mitochondrien arbeitet, bleibt die Reaktion beim Citrullin stehen. Zur Überführung des Citrullins in Arginin durch die Glutaminsäure (Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff*) ist das komplette Homogenat nötig.

Von besonderer Bedeutung ist die Tatsache, dass zur Citrullinsynthese aus Ornithin ausser Kohlensäure auch Glutaminsäure und Ammoniak unentbehrlich sind. Auf Grund dieser Tatsache und früherer Versuche über den Einfluss des Glutamins auf die Harnstoffsynthese haben wir die Frage untersucht, ob Glutamin in irgendeiner Weise an der Reaktion teilnimmt. Diese Untersuchung bildet den Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit. Es zeigt sich, dass Glutamin die Glutaminsäure ersetzen kann und dass unter geeigneten Bedingungen die Citrullinsynthese in Gegenwart von Glutamin, auch bei Abwesenheit von Ammoniak, bedeutend höhere Ausbeuten gibt als in Gegenwart von Glutaminsäure und Ammoniak. Wahrscheinlich kann aber das Amid trotzdem nicht als Zwischenstufe der Synthese angesehen werden.

Ein Hauptproblem der Citrullinsynthese ist die Fixierung der Kohlensäure. Wir haben a. a. Ort⁵⁾ die Gründe angeführt, die eine sukzessive Addition von CO₂ und Ammoniak an das Ornithin unter intermediärer Bildung einer *Siegfried'schen* Carbaminsäure als un-

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ *P. P. Cohen* und *M. Hayano*, *J. Biol. Chem.* **170**, 687 (1947).

³⁾ *H. Borsook* und *J. W. Dubnoff*, *J. Biol. Chem.* **169**, 461 (1947).

⁴⁾ *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948).

⁵⁾ *F. Leuthardt* und *R. Brunner*, *Helv.* **30**, 958 (1947).

wahrscheinlich erscheinen lassen. Vom Gedanken ausgehend, dass eventuell das Citrullin durch die Übertragung einer vorgebildeten Carbamylgruppe — ähnlich der Amidinverschiebung bei der Kreatinsynthese — entstehen könnte, haben wir das Verhalten der α -Ureidoglutarsäure untersucht. Es hat sich gezeigt, dass in der Tat aus Ureidoglutarsäure, Ammoniumsalz und Ornithin Citrullin gebildet wird, aber nur, wenn gleichzeitig Fumarat zugegen ist. Vor Abschluss dieser Versuche erschien eine Mitteilung von *Cohen* und *Grisolia*¹⁾, in welcher, offenbar von ähnlichen Überlegungen ausgehend, das Verhalten der Ureidoglutarsäure eingehend untersucht wird. Wir werden im folgenden auch unsere Versuche mit der Ureidosäure kurz beschreiben und dabei auf die Resultate von *Cohen* und *Grisolia* zu sprechen kommen.

Experimenteller Teil.

A. Material und Methoden.

Tiermaterial. Es wurden optimal ernährte Albinoratten hauptsächlich männlichen Geschlechts im Gewicht von 150–200 g verwendet. Vor dem Versuch wurden die Tiere 48 Stunden auf Hunger gesetzt.

Herstellung des Homogenats. Alle im folgenden beschriebenen Prozeduren wurden bei 0° (unter Eiskühlung und in der Kältezentrifuge) vorgenommen. Die Lebern wurden nach der Entnahme sofort auf Eis gekühlt. Eine abgewogene Menge wurde im Apparat von *Potter* und *Elvehjem*²⁾ gewöhnlich in 3 Teilen des Salzgemisches (isotonische KCl-Lösung oder isotonisches Gemisch von KCl und 0,017-m. Phosphatpuffer p_H 6,7) homogenisiert. Das Homogenat wurde dann durch zwei Schichten Gaze koliert.

Wir haben festgestellt, dass bei Verwendung von nicht gepufferter isotonischer KCl-Lösung während der Herstellung p_H -Änderungen eintreten, die in verschiedenen Homogenaten beträchtliche Schwankungen aufweisen (Messung mit der Glaselektrode). Wir haben daher, wie angegeben, in einigen Versuchen der KCl-Lösung schon beim Homogenisieren Phosphatpuffer zugesetzt; der p_H -Wert der Fermentpräparate bleibt unter diesen Bedingungen konstant. Da eine Erhöhung der Phosphatkonzentration eine Hemmung der Citrullinsynthese bewirkt, wurde bei diesen Versuchen darauf geachtet, dass der Gesamtgehalt der Ansätze an Phosphat nicht erhöht wurde.

Herstellung des Fermentpräparates. Das Homogenat wurde nach den Angaben von *Cohen* und *Hayano* 10 Minuten bei ca. 2000 g (Zentrifugalbeschleunigung = 2000 \times Erdbeschleunigung) zentrifugiert, das Überstehende verworfen und der Rückstand mit isotonischer KCl-Lösung oder isotonischem Gemisch von KCl und 0,017-m. Phosphatpuffer aufgenommen und zum ursprünglichen Volumen ergänzt. Nach gutem Vermischen wurde erneut 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und der Niederschlag wieder auf das ursprüngliche Volumen gebracht. Diese Suspension bezeichnen wir im folgenden als einmal gewaschenes Ferment. Wenn von n-mal gewaschenem Ferment die Rede ist, so bedeutet dies, dass die eben beschriebene Prozedur des 5 Minuten langen Auszentrifugierens bei 2000 g und das Wiederaufnehmen im ursprünglichen Volumen Salzlösung n-mal wiederholt wurde. Die Anzahl der Auswaschungen, die von verschiedenen Präparaten ohne wesentliche Abnahme der Aktivität ertragen werden, ist starken individuellen Schwankungen unterworfen. Im Verlauf mehrerer Zentrifugierungen tritt allmählich eine Trennung des Niederschlages in zwei Schichten in Erscheinung: eine untere hellrote und eine obere weissliche. Wir unterbrechen das Auswaschen, sobald diese Schichten sich deutlich voneinander absetzen. Die Erfahrung zeigte, dass bei weiter fortgesetztem Auswaschen die Aktivität der Präparate rasch abnahm.

1) *P. P. Cohen* und *S. Grisolia*, *J. Biol. Chem.* **174**, 389 (1948).

2) *V. R. Potter* und *A. Elvehjem*, *J. Biol. Chem.* **114**, 195 (1936).

Herstellung der Mitochondriensuspension. Im spätern Verlauf unserer Untersuchungen gelang es uns nachzuweisen, dass der wirksame Bestandteil unserer Präparate die Mitochondrien sind. Wir haben bei ihrer Abtrennung von den übrigen Zellbestandteilen uns an die Angaben von *Hogeboom* und Mitarbeitern¹⁾ gehalten, die Saccharose aber durch Mannit ersetzt, weil im saccharosehaltigen Milieu die kolorimetrische Citrullinbestimmung undurchführbar ist. Die Einzelheiten sind a. a. Ort beschrieben (*Leuthardt* und *Müller*²⁾). Da uns zum Auswaschen der reinen Mitochondriensuspension keine genügend schnelle Kältezentrifuge zur Verfügung stand, haben wir zur Entfernung der löslichen Zellbestandteile das mit dem gewöhnlich verwendeten KCl-Milieu hergestellte Homogenat auszentrifugiert. In Elektrolytlösungen agglutinieren die Mitochondrien und sedimentieren leicht bei 2000 g. Das Überstehende wird wieder verworfen. Nimmt man nun den Niederschlag in einer isotonischen Mannitlösung auf, so können die Kerne und Zelltrümmer bei 2000 g leicht auszentrifugiert werden, während die Mitochondrien in Suspension bleiben. Das Sediment ist inaktiv. Das Überstehende, das die ganze Aktivität enthält, erweist sich im Phasenmikroskop als reine Mitochondriensuspension mit nur ganz wenigen andersartigen Elementen, hauptsächlich Fetttropfen. Morphologisch präsentieren sich die Mitochondrien als Kügelchen, was als Zeichen beginnender Wasseraufnahme („Potocytose“) gedeutet werden kann. In der unveränderten Zelle zeigen sie mehr längliche Formen. Wir führen diese Andeutung einer beginnenden Schädigung auf die Verwendung von isotonischen Elektrolyten während der ersten Phase der Darstellung zurück. Nach der ursprünglichen Methode von *Hogeboom* und Mitarbeitern bereitet, d. h. bei Vermeidung von Elektrolyten und bei Verwendung reiner, hyperotonischer Saccharoselösung, behalten die Mitochondrien ihre ursprüngliche Form bei. Eine Reihe von Kontrollversuchen hat uns gezeigt, dass man mit reinen Mitochondriensuspensionen die gleichen Resultate erhält wie mit den oben beschriebenen, mehrfach ausgewaschenen Homogenaten. Die Aktivität pro mg N ist stark gesteigert. Wir müssen also annehmen, dass diese geformten Elemente die gesamten für die Citrullinsynthese notwendigen Fermente enthalten.

Milieu und Versuchsdauer. Als Milieu diente, wenn nichts anderes bemerkt ist, 0,017-m. Phosphatpuffer und KCl, das bis zur Isotonie der Gesamtlösung zugesetzt wurde. Gesamtvolumen 3,0 cm³, Gasatmosphäre 95% O₂ + 5% CO₂, wenn nichts anderes bemerkt ist. Die Ansätze wurden in 25 cm³-*Erlenmeyer*-Kölbchen während 30 Minuten in Wasserbad bei 38° geschüttelt.

Substanzen. Die meisten verwendeten Produkte wurden von *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, bezogen. Oxalacetat wurde aus dem Na-Salz des Diäthylesters nach *Krampitz* und *Werkman*³⁾ bereitet, α -Ketoglutarsäure nach *Wislicenus* und *Waldmüller*⁴⁾, Glutamin aus Rübensaft nach *Vickery* und Mitarbeitern⁵⁾, α -Ureidoglutarsäure wurde aus L-(+)-Glutaminsäure und Kaliumcyanat nach bekannten Methoden dargestellt. Cytochrom C wurde aus Herzmuskel nach *Keilin* und *Hartree*⁶⁾ gewonnen.

Analytische Methoden.

Citrullinbestimmung nach *Archibald*⁷⁾: Kolorimetrische Ablesung im *Zeiss*-Photometer (Filter S 50) nach 15 Minuten Erhitzen im siedenden Wasserbad und 10 Minuten Abkühlen im kalten Wasser, beides unter Lichtabschluss. Es wurden jedesmal 4 bekannte Citrullinkonzentrationen mitgeführt. Durch geeignete Verdünnung wurde erreicht, dass in den zur Bestimmung verwendeten Volumen Lösung immer zwischen 15 und 35 γ Citrullin vorhanden waren.

1) *G. H. Hogeboom, W. C. Schneider* und *G. E. Pallade*, *J. Biol. Chem.* **172**, 619 (1948).

2) *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948).

3) *L. O. Krampitz* und *C. H. Werkman*, *Biochem. J.* **35**, 595 (1941).

4) *W. Wislicenus* und *M. Waldmüller*, *B.* **44**, 1564 (1911).

5) *H. B. Vickery, G. W. Pucher* und *H. E. Clark*, *J. Biol. Chem.* **109**, 39 (1935).

6) *D. Keilin* und *E. F. Hartree*, *Proc. Roy. Soc. Ser. B* **122**, 298 (1937).

7) *R. M. Archibald*, *J. Biol. Chem.* **156**, 121 (1944).

Argininbestimmung: Wegen des hohen Arginasegehaltes des Leberhomogenats wird Arginin rasch zu Harnstoff und Ornithin gespalten. Der Harnstoff wurde manometrisch nach *Krebs* und *Henseleit*¹⁾ mittels „Arleo“-Urease bestimmt.

Die Reaktion von *Fearon*²⁾ (Bildung eines gelbroten Farbstoffs mit Diacetylmonoxim), die der Citrullinbestimmung von *Gornall* und *Hunter* und von *Archibald* zu Grunde liegt, gibt zwar unter den bekannten, im tierischen Gewebe vorkommenden Stoffen nur bei Citrullin und beim Harnstoff eine hohe Farbtintensität; sie ist aber keineswegs eine spezifische Reaktion für das Citrullin. Wir haben deshalb in einigen Versuchen das gebildete Citrullin noch auf biochemischem Weg zu identifizieren versucht, indem wir am Versuchsende frisches, vollständiges Leberhomogenat und Glutaminsäure zusetzten. Unter diesen Bedingungen wird das angehäuften Citrullin durch die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* in Arginin und weiter in Harnstoff übergeführt. Die erhaltenen Mengen Harnstoff waren innerhalb der Fehlergrenze der kolorimetrisch bestimmten Menge „Citrullin“ äquivalent. Wenn man nicht annehmen will, dass ein unbekannter Körper gebildet wird, der sowohl die Farbreaktion des Citrullins gibt, als auch in Gegenwart von Glutaminsäure Arginin bildet, sprechen diese Versuche für die Identität des kolorimetrisch bestimmten Körpers mit dem Citrullin.

Glutamin wurde nach den Angaben von *Leuthardt* und *Bujard*³⁾ bestimmt, wozu die Lösung mit Permutit vorbehandelt und bei p_{H} 6,5 während 2 Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt wird. Das Ammoniak wurde nach *Sobel* und Mitarbeitern⁴⁾ im Luftstrom destilliert und in Borsäure aufgefangen.

B. Ergebnisse.

1. Vergleich von Glutaminsäure und Glutamin.

Cohen und *Hayano* haben festgestellt, dass Zusatz von Hydrogencarbonat- und Ammoniumionen nicht genügt, um im zentrifugierten Homogenat Ornithin in Citrullin überzuführen; es muss Glutaminsäure zugegen sein. Wir können die Angaben der genannten Autoren in allen Teilen bestätigen. Die Citrullinsynthese kann also nicht wie die Reaktion von *Borsook* und *Dubnoff* auf einer einfachen Umaminierung beruhen, an der die Glutaminsäure beteiligt ist.

Die weitere Verfolgung der Reaktion zeigte, dass man das Ammoniumglutamat durch Glutamin ersetzen kann. Typische Versuche sind in Fig. 1 und 4 dargestellt. Man erhält dasselbe Resultat sowohl mit dem mehrfach ausgewachsenen Homogenat (Fig. 4) wie auch mit reinen Mitochondrien⁵⁾ (Fig. 1). Aus den Kurven ist ersichtlich, dass bei den höheren Substratkonzentrationen sowohl das Glutamin allein als auch Glutamin mit Zusatz von Ammoniumionen bedeutend mehr Citrullin liefern als die Glutaminsäure. Bei Abnahme der Substratkonzentration sinkt aber die Wirksamkeit des Glutamins rasch ab und bei sehr kleiner Konzentration ist die Glutaminsäure immer überlegen. Asparagin, an Stelle des Glutamins zugesetzt, ist ganz unwirksam.

1) *H. A. Krebs* und *K. Henseleit*, Z. physiol. Ch. **210**, 33 (1932).

2) *W. R. Fearon*, Biochem. J. **33**, 902 (1939); *A. G. Gornall* und *A. Hunter*, Biochem. J. **35**, 650 (1941).

3) *F. Leuthardt* und *E. Bujard*, Helv. med. acta **14**, 274 (1947).

4) *A. E. Sobel*, *M. Mayer* und *S. P. Gottfried*, J. Biol. Chem. **156**, 355 (1944).

5) *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, Exper. **4**, 478 (1948).

Beim mehrfachen Auswaschen des Homogenats nimmt seine Aktivität gegenüber Ammoniumglutamat allmählich ab; dagegen bleibt die Aktivität gegenüber Glutamin annähernd konstant. Dieses Verhalten wird durch Fig. 2 belegt. Mit dem Auswaschen nimmt aber auch der N-Gehalt des Homogenats ab und es zeigt sich, dass die auf den Stickstoffgehalt bezogene Aktivität gegenüber Ammoniumglutamat während der ersten Auswaschung tatsächlich zunimmt.

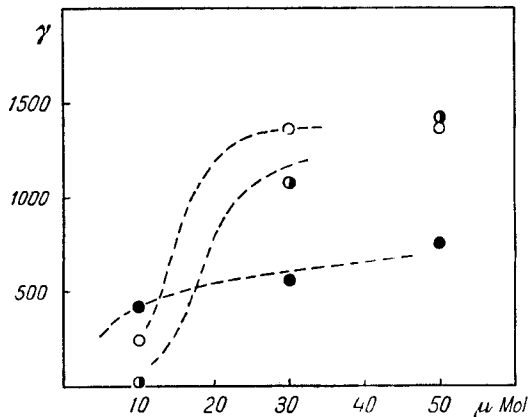


Fig. 1.

Citrullinsynthese bei Gegenwart von Glutaminsäure oder Glutamin. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3 cm³) enthalten Ornithin (0,0033-m.), NaHCO₃ (0,0135-m.), Adenosintriphosphat (0,001-m.), MgSO₄ (0,01-m.), 0,3 cm³ Mitochondriensuspension (= 0,85 mg N). Gasatmosphäre Sauerstoff + 5 Vol.% CO₂. Versuchsdauer 30 Min., Temperatur 38°. Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in μ Mol pro Ansatz. Ordinate: Citrullinsynthese in γ . ● bei Gegenwart von Glutaminsäure + NH₄Cl (0,0067-m. bzw. 0,0033-m. bei der kleinsten Glutaminsäurekonzentration); ○ Glutamin + NH₄Cl (Konzentration wie bei der Glutaminsäure).

Nach unseren Erfahrungen ist aber auch der N-Gehalt keine sichere Vergleichsbasis für die Aktivität der Präparate, da dieselben ausser dem N der Mitochondrien noch Stickstoffverbindungen enthalten, die nicht zum Fermentkomplex gehören. Wir können daher auch nicht mit Sicherheit angeben, ob die allmähliche Verschiebung der Aktivität zugunsten des Glutamins im Verlauf des Auswaschens auf der Entfernung von Faktoren beruht, welche die Reaktion der Glutaminsäure begünstigen, oder von solchen, welche die Reaktion des Glutamins hemmen.

Die Konzentration, bei der das Glutamin ebensoviel Citrullin liefert wie das Ammoniumglutamat, ist bei verschiedenen Fermentpräparaten etwas verschieden. Sie liegt für Glutamin - Ammoniak meist zwischen 3-6 μ Mol/cm³, für Glutamin ohne Ammoniakzusatz bei 10-15 μ Mol/cm³.

Die geringe Wirksamkeit des Glutamins bei kleinen Konzentrationen könnte darauf beruhen, dass das Amid, im Gegensatz zur Glutaminsäure, durch eine sekundäre Reaktion rasch verbraucht würde. Dies ist aber nicht der Fall. Die direkte Bestimmung des am

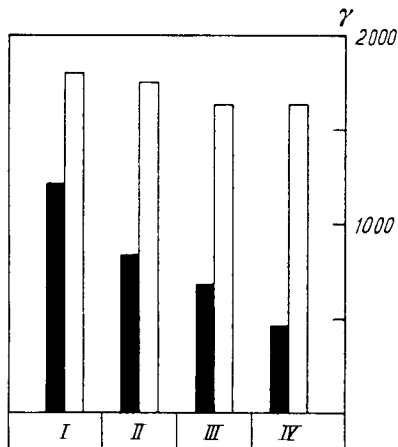


Fig. 2.

Auswascheffekt. Homogenat mit isot. KCl+0,017-m. Phosphatpuffer vom p_H 6,7 bereitet; 0,5 cm³ in 3 cm³ Gesamtvolumen. Ornithin, NaHCO₃, Adenosintriphosphat, MgSO₄ wie im Vers. Fig. 1. Glutaminsäure, Glutamin 0,0166-m.; NH₄Cl 0,0033-m. Citrullinbildung in γ ; schwarze Säulen: in Gegenwart von Glutaminsäure+ NH₄Cl; weisse Säulen: in Gegenwart von Glutamin (ohne NH₄Cl). I, II, III, IV: das Homogenat wurde 1 mal, 2 mal, 3 mal, 4 mal ausgewaschen. (Vgl. S. 745.)

Versuchsende noch vorhandenen Glutamins zeigt, dass die verschwundene Menge von derselben Grössenordnung ist wie die entstandene Menge Citrullin. In anderen Versuchen haben wir Glutamin und Glutaminsäure allmählich in kleinen Anteilen zugesetzt. Diese Versuche, die wir nicht einzeln mitteilen wollen, bestätigen, dass eine bestimmte minimale Konzentration des Glutamins vorhanden sein muss, damit es wirksam wird.

Abhängigkeit von Adenosintriphosphat.

Wir konnten die Befunde von *Cohen* und *Hayano* bestätigen, wonach die Citrullinsynthese von der Konzentration des zugesetzten A.T.P. abhängig ist. Bis zu etwa 0,3 μ Mol A.T.P./cm³ steigt die Umsatzgeschwindigkeit proportional der A.T.P.-Konzentration an. Von etwa 0,6 μ Mol/cm³ an nimmt sie nur noch wenig zu.

Einfluss von Dicarbonsäuren und Ketosäuren.

α -Ketoglutar säure in Gegenwart von Ammoniumsalzen kann die Glutaminsäure teilweise ersetzen; das ausgewaschene Homogenat enthält also die Glutaminsäuredehydrase, welche die reduktive Aminierung der Ketoglutar säure zur Glutaminsäure ermöglicht.

Zusatz von Fumarat ist für die Synthese nicht nötig. Die Glutaminsäure liefert jedenfalls nach ihrer Desaminierung genügend Dicarbonsäure, um die oxydative Phosphorylierung aufrechtzuerhalten. *Borsook* und *Dubnoff*¹⁾ setzen dem nativen Homogenat Fumarat oder Oxalacetat zu, um bei Gegenwart von Ornithin maximale Werte der Arginin-(Harnstoff)-Synthese zu erhalten. Es ist möglich, dass im kompletten Homogenat die Verhältnisse etwas anders liegen als in unseren im wesentlichen aus der Mitochondrienfraktion bestehenden Fermentpräparaten.

Bei Gegenwart von Oxalacetat haben wir eine Hemmung der Synthese beobachtet, die beim Glutamin stärker ist als bei der Glutaminsäure (6,6 μ Mol Glutamin, 6,6—13,3 μ Mol Oxalacetat/cm³). Fumarat (in Mengen von 13,3 μ Mol/cm³) ist bei kleinen Substratkonzentrationen (6,6 μ Mol/cm³) indifferent; bei höheren Konzentrationen von Glutamin oder Glutaminsäure (17 μ Mol/cm³) dagegen hemmt es deutlich. Pyruvat (13 μ Mol/cm³) fördert bei kleinen Substratkonzentrationen. *cis*-Aconitsäure hemmt die Citrullinbildung bei Gegenwart von Glutaminsäure stärker als bei Gegenwart von Glutamin. Wir verzichten darauf, diese Versuche einzeln anzuführen. Die Resultate sind nicht ganz regelmässig und können noch nicht interpretiert werden. Sie zeigen, dass ein sehr komplexes System vorliegt.

Einfluss der NH₃-Konzentration.

Ohne NH₄⁺-Ionen gibt die Glutaminsäure keine nennenswerte Menge Citrullin (*Cohen* und *Hayano*). Mit Glutamin dagegen erhält man von 10—13 μ Mol/cm³ an ebensoviel wie mit der äquivalenten Menge Glutaminsäure und Ammoniumionen. Wir haben bei den

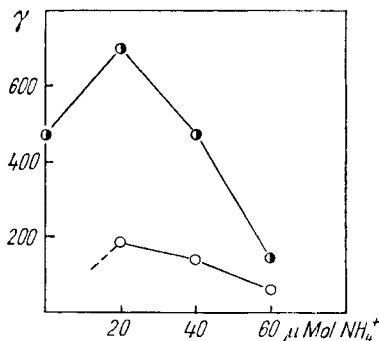


Fig. 3.

Abhängigkeit der Citrullinsynthese von der Ammoniakkonzentration. Mitochondriensuspension 0,5 cm³ in 3 cm³ Gesamtvolumen. Ornithin, NaHCO₃, Adenosin-triphosphat, MgSO₄ wie im Vers. Fig. 1. Glutaminsäure, Glutamin 0,013-m. Abszisse: μ Mol NH₄Cl in 3 cm³; Ordinate: Citrullinbildung in γ . ○ in Gegenwart von Glutaminsäure; ● in Gegenwart von Glutamin.

¹⁾ *H. Borsook* und *J. W. Dubnoff*, *J. Biol. Chem.* **169**, 461 (1947).

meisten Versuchen eine Ammoniumchlorid-Konzentration von $3,3 \mu \text{ Mol/cm}^3$ verwendet. Bei höheren Konzentrationen als ca. $13 \mu \text{ Mol NH}_4^+$ sinken, wie Fig. 3 zeigt, die Umsätze ab. Ammoniak wirkt also bei höheren Konzentrationen hemmend. Eine ähnliche Hemmung durch Ammoniak findet man bei der Harnstoffbildung in Leberschnitten. Möglicherweise verdrängt das Ammoniak das basische Ornithin von einem Fermentprotein (vgl. *Leuthardt*¹⁾).

Hemmung durch Malonat.

Die Citrullinsynthese wird, wie Fig. 4 zeigt, durch Malonat gehemmt, und zwar ist die Verminderung der Umsatzgrösse für Glutaminsäure etwas stärker als für Glutamin. Nach früheren Erfahrungen dürfte die Malonathemmung dadurch zustande kommen, dass die Succinatoxydation und damit die oxydative Resynthese des Adenosintriphosphats verhindert ist (vgl. *Fahrländer* und Mitarbeiter²⁾). Die Malonathemmung wird durch Fumarat aufgehoben oder wenigstens vermindert.

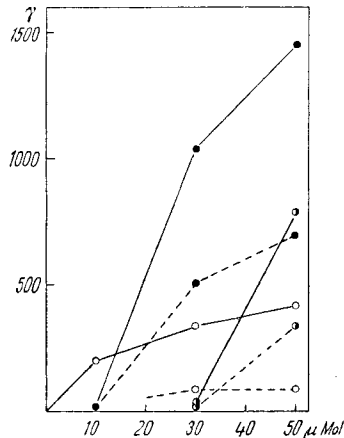


Fig. 4.

Hemmung der Citrullinsynthese durch Malonat. Alle Ansätze (Gesamtvolumen 3 cm^3) enthalten Ornithin, NaHCO_3 , Adenosintriphosphat, MgSO_4 wie Vers. Fig. 1, sowie $0,3 \text{ cm}^3$ Homogenat. Malonat $0,0025\text{-m}$. Abszisse: Konzentration der Glutaminsäure oder des Glutamins in $\mu \text{ Mol}$ pro 3 cm^3 . Ordinate: Citrullinbildung in γ . \circ bei Gegenwart von Glutaminsäure + NH_4Cl ($0,0033\text{-m}$), \bullet bei Gegenwart von Glutamin allein, \bullet bei Gegenwart von Glutamin + NH_4Cl ($0,0033\text{-m}$). Ausgezogene Kurven: Werte ohne Malonatzusatz; gestrichelte Kurven: Werte mit Malonat.

Ureidoglutarsäure und Citrullinsynthese.

Wir haben in früheren Arbeiten über die Harnstoffsynthese auf die Möglichkeit hingewiesen, dass bei der Bildung des Citrullins aus dem Ornithin zunächst an einem „Träger“ eine Carbamylgruppe ($-\text{CONH}_2$) aufgebaut und nachträglich auf die δ -Aminogruppe des Ornithins übertragen wird, in Analogie zur Amidinübertragung bei der Kreatin-

¹⁾ *F. Leuthardt*, Exposés Ann. Biochimie Médicale, publ. p. M. *Polonovski* **8**, 7 (1948).

²⁾ *H. Fahrländer*, *P. Favarger* und *F. Leuthardt*, Helv. **31**, 942 (1948).

synthese. Die primäre Bildung einer *Siegfried'schen* Carbaminsäure mit CO_2 , wie *Krebs*¹⁾ sie ursprünglich angenommen hatte, ist nicht möglich, weil dazu eine nicht ionisierte NH_2 -Gruppe mit CO_2 reagieren muss. Unter physiologischen Verhältnissen ist aber die δ -Aminogruppe des Ornithins vollständig ionisiert²⁾.

Wir haben von diesem Gedankengang ausgehend als Modellsubstanz die α -Ureidoglutarsäure (N-Carbamylglutaminsäure) untersucht und dabei gefunden, dass bei Gegenwart von NH_4^+ -Ionen und Fumarat Ureidoglutarsäure Citrullin liefert. (Die Farbentwicklung mit Diacetylmonoxim ist bei der α -Ureidoglutarsäure im Vergleich zum Citrullin so gering, dass bei der Citrullinbestimmung kein Fehler entsteht.) Ohne Fumarat ist die Substanz unwirksam. Seither haben, wie erwähnt, *Cohen* und *Grisolia*³⁾ über Versuche mit der gleichen Substanz berichtet. Sie fanden, dass Ureidoglutarsäure in Gegenwart von NH_4^+ -Ionen, aber in Abwesenheit von Hydrogencarbonat 10–15 mal mehr Citrullin bildet als die gleiche Menge Glutaminsäure. Bei Gegenwart von Hydrogencarbonat ist sie immer noch 2–3 mal aktiver als die Glutaminsäure. Wir haben diese Resultate bestätigt, fanden aber im Hydrogencarbonatmilieu die Ureidosäure nur wenig aktiver als die Glutaminsäure. Bei Abwesenheit von Hydrogen-

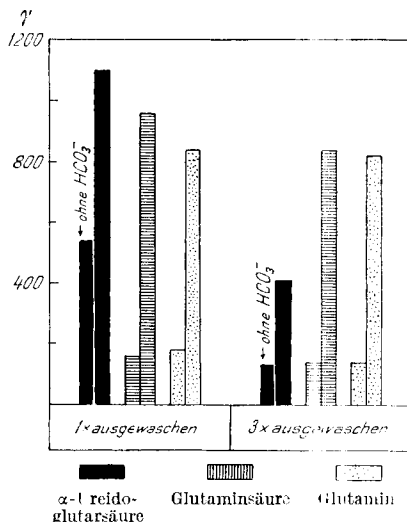


Fig. 5.

Citrullinsynthese aus α -Ureidoglutarsäure. $0,5 \text{ cm}^3$ 33% Homogenat in 3 cm^3 Gesamtvolumen. Ornithin, NaHCO_3 , Adenosintriphosphat, MgSO_4 wie Vers. Fig. 1. α -Ureidoglutarsäure $0,0033\text{-m.}$, Glutaminsäure, Glutamin, NH_4Cl überall $0,0066\text{-m.}$; Fumarat $0,0166\text{-m.}$ Versuchsdauer 25 Min. Citrullinbildung in γ . Die linke Säule eines jeden Paares gibt den Wert ohne NaHCO_3 (in Luft geschüttelt), die rechte bei Gegenwart von NaHCO_3 . Gruppe links: Homogenat 1 mal ausgewaschen; Gruppe rechts: Homogenat 3 mal ausgewaschen.

¹⁾ *H. A. Krebs*, Ann. Rev. Biochem. **5**, 261 (1936).

²⁾ *F. Leuthardt* und *R. Brunner*, Helv. **30**, 958 (1947).

³⁾ *P. P. Cohen* und *S. Grisolia*, J. Biol. Chem. **174**, 389 (1948).

carbonat betrug in unseren Versuchen der maximale Unterschied etwa das 4-fache. Die Aktivität des Fermentpräparates gegenüber Ureidoglutarsäure nimmt beim Auswaschen stark ab, während die Aktivität gegenüber Glutaminsäure kaum verändert wird. Im Versuch, der in Fig. 5 dargestellt wird, gibt das 3 mal ausgewaschene Homogenat im hydrogencarbonatfreien Milieu mit Ureidoglutarsäure nicht mehr Citrullin als mit Glutaminsäure; bei Gegenwart von NaHCO_3 erhält man aus der Ureidosäure sogar weniger als aus der Glutaminsäure.

Ein besonders interessantes Resultat von *Cohen* und *Grisolia* ist das folgende: „In the presence of ammonia, incubation of carbamyl-L-glutamic acid with the enzyme system aerobically followed by the addition of ornithine on anaerobic incubation results in citrulline synthesis. All efforts to date to make the over-all reaction ornithine \rightarrow citrulline proceed anaerobically have been unsuccessful.“ Es scheint demnach, dass während der ersten Phase in Abwesenheit von Ornithin ein Zwischenprodukt gebildet wird, das in der folgenden anaeroben Phase mit Ornithin reagiert und Citrullin liefert.

In der Weiterverfolgung dieser Versuche, wobei Mitochondriensuspension verwendet wurde, haben wir die folgenden Feststellungen gemacht: Man erhält bedeutend mehr Citrullin, wenn man während der ersten Phase ausser Ureidoglutarsäure und Ammoniaksalz noch Glutaminsäure zusetzt (Fig. 6). Ammoniumglutamat lässt sich durch Glutamin ersetzen. Bei Gegenwart von Glutaminsäure kann man die Konzentration der Ureidoglutarsäure bedeutend herabsetzen, ohne die Citrullinausbeute entsprechend zu verringern (Fig. 6). Ureidoglutarsäure ist unwirksam, wenn dem Milieu nicht Fumarat zugesetzt wird. Dagegen ist bei Gegenwart von Glutaminsäure Fumaratzusatz überflüssig. Fumarat hat dann sogar eher eine hemmende Wirkung auf die Citrullinsynthese.

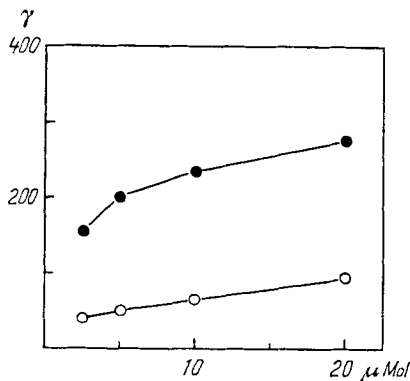


Fig. 6.

Citrullinsynthese im zweiphasischen Versuch. Mitochondriensuspension, $0,5\text{ cm}^3$ in 3 cm^3 Gesamtvolumen. Ornithin, NaHCO_3 , Adenosintriphosphat, MgSO_4 wie Vers. Fig. 1. Glutaminsäure $0,013\text{ m.}$, NH_4Cl $0,0033\text{-m.}$ Die Ansätze wurden in Warburg-Gefässchen zuerst 30 Min. unter aeroben Bedingungen ohne Ornithin geschüttelt, dann der Sauerstoff durch Stickstoff (5% CO_2 enthaltend) verdrängt, das Ornithin aus dem Anhang eingekippt und 30 Min. weiter geschüttelt. Abszisse: Konzentration der α -Ureidoglutarsäure in μMol pro 3 cm^3 . Ordinate: Citrullinbildung in γ ; ○ bei Gegenwart von Ureidoglutarsäure, NH_4Cl und Fumarat ($0,0166\text{-m.}$), ● bei Gegenwart von Ureidoglutarsäure, Glutaminsäure und NH_4Cl .

Diskussion

Aus den beschriebenen Versuchen ergibt sich in erster Linie die Frage, welche Rolle das Glutamin bei der Citrullinsynthese spielt. Im Bereich hoher Substratkonzentrationen (vgl. Fig. 1, 4) ergibt Glutamin mit und ohne Zusatz von Ammoniumsalzen höhere Ausbeuten an Citrullin als Glutaminsäure. Diese Überlegenheit des Amids über die Säure kann nicht durch Hydrolyse erklärt werden, sonst würde Glutamin höchstens so viel Citrullin liefern als die Glutaminsäure. Es wäre zwar denkbar, dass ein Überschuss von Ammoniumionen den Vorgang hemmt und dass das Glutamin deshalb wirksamer erscheint, weil die Säureamidgruppe das Ammoniak nur allmählich abgibt. Diese Annahme trifft aber nicht zu, denn die Wirksamkeit des Glutamins bleibt je nach seiner Konzentration bei Zusatz von Ammoniumionen entweder unverändert oder wird stark gesteigert (Fig. 1, 4). Unsere Beobachtungen müssen also dahin interpretiert werden, dass die Säureamidgruppe des Glutamins bei der Synthese eine spezifische Funktion hat.

Andererseits lassen es die bisherigen Versuche als wenig wahrscheinlich erscheinen, dass das Glutamin eine direkte Zwischenstufe der Synthese darstellt. Gegen eine solche Annahme spricht seine Unwirksamkeit in kleinen Konzentrationen. Unterhalb einer Konzentration von etwa $3 \mu \text{ Mol/cm}^3$ liefert das System Glutaminsäure-Ammoniumionen unter allen Bedingungen mehr Citrullin als das Glutamin, und diese Konzentration ist immer noch beträchtlich höher als die in den Geweben durch direkte Messung festgestellte Menge (vgl. *Hamilton*¹), *Ferdman* und Mitarbeiter²). Die Überlegenheit des Glutamins gegenüber der Glutaminsäure bei höheren Konzentrationen lässt aber den Schluss zu, dass das Amid zu einem Zwischenprodukt der Synthese in enger Beziehung steht.

Ebenso schwierig ist die Rolle der α -Ureidoglutarsäure zu beurteilen. Die Substanz ist bisher nicht als natürliches Produkt des Stoffwechsels nachgewiesen worden. Es ist möglich, dass die Carbonylgruppe ($-\text{CONH}_2$) der Ureidosäure auf irgendeine Weise auf die δ -Aminogruppe des Ornithins übertragen werden kann, ähnlich wie bei der Kreatinsynthese die Amidogruppe des Arginins auf die Aminogruppe des Glykokolls übertragen wird. Mit dieser Annahme ist die Tatsache vereinbar (*Cohen* und *Grisolia*), dass Ureidoglutarsäure auch ohne Hydrogencarbonat Citrullin bildet. Dagegen ist nicht verständlich, warum ohne Ammoniumionen kein Citrullin entsteht. Man müsste annehmen, dass das Ammoniumsalz indirekt wirkt, indem es in einem Gleichgewicht teilnimmt und in dieser Weise den Zerfall eines Zwischenproduktes verhindert.

¹) *P. B. Hamilton*, J. Biol. Chem. **158**, 397 (1945).

²) *D. L. Ferdman*, *S. R. Frenkel* und *L. I. Silakova*, Biokhimiia **7**, 43 (1942) (cit. n. *M. Archibald*, Chem. Rev. **37**, 161 (1945)).

Wie im experimentellen Teil mitgeteilt wurde, erhält man bedeutend erhöhte Ausbeuten an Citrullin, wenn im zweiphasischen Versuch das Milieu neben Ureidoglutarensäure und Ammoniumionen noch Glutaminsäure enthält. Die Ammoniumionen sind auch bei Gegenwart von Glutaminsäure unentbehrlich, doch kann das Ammoniumglutamat durch Glutamin ersetzt werden. Es ist aber in diesem Fall nicht möglich zu entscheiden, ob das Amid in spezifischer Weise reagiert oder einfach durch Hydrolyse Ammoniumionen und Glutaminsäure liefert. Versuche über den Abbau der Ureidoglutarensäure in Leberhomogenaten, über die wir später berichten werden, haben gezeigt, dass die Ureidosäure zum Teil in Glutaminsäure übergeht. Erst eine genauere Analyse der Reaktion wird darüber Aufschluss bringen, ob unter allen Umständen während der ersten (aeroben) Phase der Reaktion neben der Ureidosäure auch Glutaminsäure vorhanden sein muss.

Die Notwendigkeit, der Ureidoglutarensäure noch Fumarat zuzusetzen (vgl. S. 752), erklärt sich wahrscheinlich durch die mangelnde oxydative Resynthese des Adenosintriphosphats, wenn ausser der Ureidosäure kein anderes Substrat zugegen ist. Wie in früheren Untersuchungen gezeigt wurde, liefert die Glutaminsäure genügend Fumarat, um die Phosphorylierung aufrechtzuerhalten, so dass sich in diesem Fall der Fumaratzusatz erübrigt.

Die Fixierung der Kohlensäure bei der Synthese des Citrullins aus dem Ornithin ist somit ein noch nicht gelöstes Problem. Die Versuche von *Cohen* und Mitarbeitern zeigen aber, dass die Glutaminsäure daran beteiligt ist. Wie schon erwähnt, ist die primäre Bildung einer *Siegfried'schen* Carbaminosäure mit der Aminogruppe des Ornithins nicht möglich, weil sich die Carbaminosäuren nur aus einer nicht ionisierten Aminogruppe und Kohlendioxyd bilden können, die δ -Aminogruppe des Ornithins dazu aber zu basisch ist¹). Um dieser Schwierigkeit auszuweichen, haben wir früher die Ansicht entwickelt, dass das CO₂ zuerst als Carboxyl in β -Stellung zu einer Carbonylgruppe fixiert und darauf in ein Säureamid übergeführt wird; darauf sollte eine Übertragung der gebildeten —CONH-Gruppe auf das Ornithin erfolgen²). Versuchsdaten, die seither bekannt geworden sind, zeigen, dass eine derartige Annahme aber wenig wahrscheinlich ist. *Mackenzie* und *Du Vigneaud*³) haben nach Verfütterung von Methionin, das in der labilen Methylgruppe mit radioaktivem Kohlenstoff markiert war, den Isotopengehalt der Atmungskohlensäure und des Harnstoffs verglichen und identische Werte gefunden. Würde, wie oben angenommen, das C-Atom des Harnstoffs aus einer Carboxylgruppe stammen, die auch durch direkte Oxydation einer Kohlenstoffkette entstehen

¹) *F. Leuthardt* und *R. Brunner*, *Helv.* **30**, 958 (1947).

²) *F. Leuthardt* und *B. Glasson*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **2**, 549 (1944).

³) *C. G. Mackenzie* und *V. Du Vigneaud*, *J. Biol. Chem.* **172**, 353 (1948).

kann (β -Carboxyl der Oxalessigsäure oder der Oxalbernsteinsäure), so müsste der Harnstoff weniger ^{14}C enthalten als die Atmungskohlensäure. Die Befunde der genannten Autoren sprechen dafür, dass die Kohlensäure die einzige Quelle des C-Atoms im Harnstoff ist. In einer vor kurzem erschienenen Arbeit haben auch *Grisolia* und *Cohen*¹⁾ den Nachweis geleistet, dass das Citrullin, welches im Leberhomogenat gebildet wird, gleich viel ^{14}C enthält wie das zugesetzte Hydrogencarbonat.

Die zuerst von *Leuthardt* und *Glasson*²⁾ entwickelte Ansicht, dass bei der Citrullinsynthese die Kohlensäure und das Ammoniak nicht direkt auf der Ornithinmolekel, sondern zuerst auf einem „Träger“ fixiert werden, der erst sekundär mit dem Ornithin reagiert, hat durch alle neuern Untersuchungen an Wahrscheinlichkeit gewonnen. Aber der ursprünglich angenommene Mechanismus der Reaktion entspricht jedenfalls nicht der Wirklichkeit. Die starke Erhöhung der Harnstoffbildung in der Leber durch Pyruvat, die zu jener Annahme geführt hatte, erklärt sich durch die Verwandlung des Pyruvats in Glutaminsäure³⁾. Die letztere erscheint bei Schnittversuchen unwirksam, weil sie viel schlechter in das intakte Gewebe eindringt als das Pyruvat.

Zusammenfassung

1. Wir haben die Synthese des Citrullins aus Ornithin durch die Mitochondrienfraktion der Leber (Ratte) bei Gegenwart von Glutamin untersucht. Bei Glutaminkonzentrationen von 20–30 μ Mol/cm³ ist das Amid mit oder ohne Zusatz von Ammoniumsalzen der Glutaminsäure plus Ammoniumsalz stark überlegen. Bei kleinen Konzentrationen, unter 3 μ Mol/cm³ liefert aber die Glutaminsäure unter allen Umständen mehr Citrullin als das Glutamin. Es ist also wenig wahrscheinlich, dass das Glutamin eine direkte Zwischenstufe der Synthese ist. Die Wirksamkeit des Amids lässt sich andererseits aber nicht einfach durch die Hydrolyse der Säureamidgruppe erklären. Dieselbe scheint eine spezifische Funktion zu haben. Das Glutamin steht offenbar zu einem Zwischenglied der Citrullinsynthese in enger Beziehung.

2. Die α -Ureidoglutarsäure liefert bei Gegenwart von Fumarat und von Ammoniumsalzen ebenfalls Citrullin. Wir haben das Verhalten der Ureidoglutarsäure unter verschiedenen Bedingungen untersucht und können die Ergebnisse von *Cohen* und *Grisolia*, die zu unserer Kenntnis gelangt sind, während diese Untersuchung im Gang war, im wesentlichen bestätigen.

Zürich, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität.

¹⁾ *S. Grisolia* und *P. P. Cohen*, *J. Biol. Chem.* **176**, 929 (1948).

²⁾ *F. Leuthardt* und *B. Glasson*, *Helv. physiol. pharmacol. acta* **2**, 549 (1944).

³⁾ *H. Fahrländer*, *H. Nielsen* und *F. Leuthardt*, *Helv.* **31**, 957 (1948).