Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 220—223, Mai 1971

Bestimmung von Ornithin-Carbamyl-Transferase mittels FEARON-Reaktion¹⁾

II. Mitteilung: Enzymbestimmung

Von K. LORENTZ und W. WRABETZ²⁾

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Akademie Lübeck

(Eingegangen am 13. Januar 1971)

Es wird ein Verfahren zur Ornithin-Carbamyl-Transferase-Bestimmung beschrieben, das ebenfalls auf einer Citrullinbestimmung beruht und die Störung durch unspezifische Citrullinbildung sowie Harnstoffabspaltung aus Carbamylphosphat bei Verzicht auf eine Vorinkubation vermeidet. Die Methode ist einfach, schnell, genau und liefert für Serum- und Leber-Ornithin-Carbamyl-Transferase folgende Daten: pH-Optimum 7,65, K_m Ornithin 0,5 mM, K_m Carbamylphosphat 1,25—1,85 mM, Aktivierungsenergie 11830 cal/Mol, essentielle SH-Gruppen. Als Normbereich sind 0,63—4 mU/ml (37°) Serum anzusetzen.

Determination of ornithine-carbamyl transferase by the Fearon reaction. II, Determination of enzyme activity

Methods for the determination of ornithine-carbamyl-transferase activity, based on the measurement of citrulline, are briefly reviewed. The present technique has been developed from these methods. There is no preincubation and the disadvantages of non-enzymic citrulline formation and the production of urea from the cleavage of carbamyl phosphate are avoided. The method is simple, rapid and precise. The serum and liver enzyme showed an optimum pH at 7.65, K_m ornithine 0.5 mM, K_m carbamyl phosphate 1.25—1.85 mM, activation energy 11830 cal/mol, and it was found to contain essential SH-groups. The normal range is 0.63—4 mU/ml serum.

Ornithin-Carbamyl-Transferase (Carbamylphosphat-L-Ornithin-Carbamyl-Transferase, EC 2.1.3.3) katalysiert im Harnstoffzyklus die Bildung von Citrullin nach

Das Enzym ist fast ausschließlich in den Mitochondrien der Leberzelle kompartimentiert (1), und seine Bestimmung, von REICHARD und REICHARD (2) in die Diagnostik eingeführt, kann zum spezifischen Nachweis von Zerstörungen des Leberparenchyms dienen.

Ältere Aktivitätsbestimmungen gründen sich auf die sehr langsam ablaufende Rückreaktion

in der P_i durch Arsenat ersetzt wird, da Carbamylarsenat spontan hydrolysiert und dabei nach

laufend Arsenat nachliefert. So stellt sich das Reaktionsgleichgewicht ständig neu ein, wobei als Meßgrößen

1. $^{14}\text{CO}_2$ aus ^{14}C -Citrullin (2) oder
2. Ammoniak, der noch isoliert werden muß, verwendet werden.

Die Abtrennung erfolgt durch Mikrodifusion, die anschließende Bestimmung mittels Titration (3), Neßlerisation (2) oder Indophenolreaktion (4, 5, 6). Verfahren, die auf eine Isolierung des Ammoniaks verzichten (7), sind wegen der Störung der Indophenolreaktion durch Aminosäuren (8) — hier durch Citrullin und Ornithin — unbrauchbar.

Die Verwendung von ^{14}C -Citrullin setzt ein Flüssigkeitsszintillationsspektrometer voraus. Bei der Ammoniakbestimmung stören eine 24stdg. Inkubationszeit, eine erhebliche NH_3 -Bildung durch Desaminasen des Serums, ein nichtenzymatischer Citrullinzerfall (9) und zusätzliche Isolierungsverfahren (10).

Die Mehrzahl moderner Verfahren basiert dagegen auf der Messung des pro Zeiteinheit gebildeten Citrullins, da die Gleichgewichtskonstante (11)

$$\frac{[\text{L-Citrullin}] [\text{P}_i]}{[\text{Carbamylphosphat}] [\text{L-Ornithin}]} = 1,02 \cdot 10^5 \quad (37^\circ\text{C}, \text{pH } 7,4)$$

die Reaktion (I) praktisch von links nach rechts ablaufen läßt. Die Bestimmung des gebildeten P_i (12) ist nur in phosphatfreien Ansätzen und daher nicht in Serum möglich.

Die folgenden Untersuchungen dienen daher der Verbesserung von Methoden (13—19), welche die Enzymaktivität durch Bestimmung des pro Zeiteinheit synthetisierten Citrullins messen.

Methodik

Reagenzien

Citrullinstandard (0,4 mM):

70 mg L-Citrullin (Serva) in 100 ml 0,1proz. Benzoesäure lösen. Aus dieser Stammlösung (6 Monate haltbar) 1 ml entnehmen und mit 9 ml demin. Wasser verdünnen.

Ureasepuffer (1% Urease in 0,2M EDTA pH 7,7):

7,4 g Titriplex III in etwa 70 ml demin. Wasser suspendieren, mit 10proz. KOH lösen und auf pH 7,7 einstellen, 1 g Urease (Merck 8489) hinzugeben und auf 100 ml auffüllen. Bei 4° 6 Wochen haltbar. Ungelöste Urease kann suspendiert bleiben, anderenfalls wird 2 Stdn. nach dem Ansetzen filtriert.

Ornithinlösung (0,06M):

0,5 g L-Ornithin · HCl (Merck 6906) in 50 ml Ureasepuffer lösen. Bei 4° 6 Wochen haltbar.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von W. Wrabetz.

Carbamylphosphat (0,05M):

140 mg Carbamylphosphat (di-Lithiumsalz, Boehringer 15404) in 20 ml eiskaltem Ureasepuffer lösen. In Eis 4 Stdn. haltbar.

Schwefelsäure (1N):

2,7 ml 98proz. H_2SO_4 ($D = 1,84$) mit demin. Wasser ad 100 ml auffüllen. Unbegrenzt haltbar.

Natriumwolframat 5proz., unbegrenzt haltbar.

Die übrigen Reagenzien entsprachen in Reinheit und Ansatz (Diacetylmonoxim, Antipyrinreagenz) denen der I. Mitteilung.

Vorgehen

200 μ l Serum mit 100 μ l Ornithin- und 200 μ l Carbamylphosphat-Lösung mischen und 20 Min. bei 37° inkubieren. Dann mit 200 μ l H_2SO_4 und 100 μ l Na_2WO_4 versetzen und 5 Min. mit 3000 g (Tischzentrifuge 3000—4000 U/Min.) zentrifugieren. Beim Leerwert wird Ornithin nach Wolframat zum Ansatz gegeben. 400 μ l Überstand, 400 μ l Diacetylmonoxim und 2,3 ml Antipyrinreagenz werden gemischt, 30 Min. bei 100° im Wasserbad gehalten und nach Abkühlung bei 436 nm in der 1 cm Küvette photometriert. Der Reagenzleerwert enthält 400 μ l demin. Wasser statt Überstand, der Standard (100 nMol) 250 μ l 0,4 mM Citrullin plus 150 μ l demin. Wasser.

Berechnung: Man zieht die Leerwerte von den zugehörigen Analysen ab, den Reagenzleerwert vom Standard (ΔE u. ΔES). Die Aktivität in mU/ml wird ermittelt durch Multiplikation des Quotienten $\Delta E/\Delta ES$ mit den Faktoren 100 (Gehalt des Standards), 2 (Aliquot des Überstandes), 5 (Serumaliquot) und 1/20 (Zeit): $\Delta E/\Delta ES \times 50 = \text{mU/ml}$ (37°), ohne Berücksichtigung der Wiederfindungsrate.

Bei Prüfung der Einflüsse von Temperatur, Substrat-, H^+ und Effektochenkonzentration blieben die jeweils übrigen Parameter und das Reaktionsvolumen konstant. Alle pH-Werte wurden im fertigen Ansatz mit der Glaselektrode gemessen. Die Daten über Aktivierung, Hemmung, Hitzedenaturierung, Zeit- und Enzymabhängigkeit ermittelten wir unter optimalen Bedingungen mit Triäthanolamin als Puffersubstanz. Sie entsprachen im übrigen dem Standardansatz für Seren, der EDTA in gleicher Konzentration enthielt, und mit dem wir Reproduzierbarkeit und Normwerte untersuchten. — Zum Vergleich mit der Serumaktivität diente ein stabiles Acetonpulver aus Lebermitochondrien nach HOGBOOM (20), das wir 24 Stdn. post mortem aus menschlicher Leber herstellten und vor den einzelnen Versuchen mit Triäthanolamin-Puffer extrahierten (Teflonhomogenisator nach POTTER, 10000 g-Überstand).

Die Elektrophorese von Hepatissersum und Serum mit Zusatz von Leberextrakt erfolgte bei 4° unter folgenden Bedingungen: Papier Schleicher u. Schüll 2043 B; Veronalpuffer $\mu = 0,1$, pH 8,6; LKB-Kammer, 7 V/cm, 8 Stdn.; 20 μ l Serum 4 cm kathodisch von der Mitte aufgetragen. Nach der Trennung wurden die Fraktionen durch Färben der fixierten Proteine in einem abgeschnittenen Randstreifen lokalisiert, ausgeschnitten und durch Zerstampfen in einem Gemisch von 600 μ l Ureasepuffer, 400 μ l Carbamylphosphat- und 200 μ l Ornithinlösung eluiert (Zentrifugenglas) und 10 Stdn. bei 37° inkubiert. Unterbrechen mit Wolframsäure und Tests (s. o.).

Wir führten alle Messungen vierfach (Doppelbestimmungen mit 2 Aktivitäten im Verhältnis 1:5) am Photometer 1100 „Eppendorf“ durch. Die kinetischen Daten wurden durch direkte Auftragung, nach EADIE-HOFSTEE und LINEWEAVER-BURK graphisch ermittelt, die Aktivierungsenergie mit Hilfe der empirischen Arrheniusgleichung errechnet.

Ergebnisse**Harnstoffelimination, Genauigkeit, Normwerte**

Die in 200 μ l Carbamylphosphat-Lösung enthaltene Urease reicht aus, um den in 200 μ l Serum enthaltenen Harnstoff bis zu einer Konzentration von 200 mg/100 ml innerhalb von 20 Min. bei 37° abzubauen, so daß die bei

anderen Verfahren notwendige Vorinkubation (14, 15, 18, 19) entfällt. Wie früher mitgeteilt (18), muß Carbamylphosphat in Urease gelöst werden, um die Harnstoffbildung durch Spontanhydrolyse der energiereichen Carbamyl-Phosphat-Bindung mit anschließender Reaktion von Cyanat (21) zu verhindern. So enthält Carbamylphosphat, je nach Lagerung, unterschiedliche Harnstoffmengen als Verunreinigung. Da die Leerwerte denselben Störungen unterliegen, müssen Serum und Carbamylphosphat zusammen inkubiert werden. Anderenfalls liefern Methoden, in denen beim Leerwert durch organische Quecksilberverbindungen neben Ornithin-Carbamyl-Transferase auch Urease gehemmt wird (9, 15, 19), ein zu niedriges ΔE . Der Zusatz von Ornithinlösung nach Schwefelsäure läßt diese Schwierigkeit umgehen. Die hohe Konzentration des Ureasepuffers verhindert eine pH-Verschiebung durch die sauren Substrate.

Mit dem beschriebenen Verfahren erhält man bis zu einem ΔE von 1,580 lineare Verhältnisse zwischen Extinktion und Inkubationszeit (maximal 40 Min.) bzw. eingesetzter Aktivität (maximal 132 mU/ml). Die Reproduzierbarkeit beträgt bei 20 Bestimmungen in einer Serie $\pm 3,6\%$ (Mittel 62,5 mU/ml, $s = 2,25$ mU/ml).

Bei 40 Seren von Blutspendern wurden Aktivitäten zwischen 0,63 und 4 mU/ml gemessen (Normalverteilung). 50 Patienten ohne biopsische und biochemische (Transaminasen unter 11 mU/ml) Zeichen von Leberzellnekrosen zeigten Werte zwischen 0,4 und 10 mU/ml.

Eigenschaften

Rohenzym aus Lebermitochondrien und Hepatissersum weisen ein identisches Optimum bei pH 7,65 auf, das beiderseits nur mäßig stark abfällt (Abb. 1). Diese Kurve gilt, im Gegensatz zu SNODGRASS und PARRY (19), für konstante Konzentrationen von Carbamylphosphat (20 mM) und Ornithin (12 mM) im Ansatz.

Auch die Michaelis-Konstanten, bei pH 7,65 gemessen, zeigen für Leberenzym und Serumaktivität gleiche

Abb. 1
Abhängigkeit der Ornithin-Carbamyl-Transferase-Aktivität vom pH-Wert
Leberextrakt — Serum - - -

(Ornithin) oder ähnliche (Carbamylphosphat) Werte (Tab. 1). Maximalgeschwindigkeit wird oberhalb 6 mM (Ornithin) bzw. 10 mM (Carbamylphosphat) erreicht. Überschußhemmung läßt sich in keinem Fall nachweisen (Abb. 2 u. 3).

Tab. 1
Michaelis-Konstanten der Ornithin-Carbamyl-Transferase aus menschlicher Leber und Serum

Substrat			Leber-extrakt	Serum
Ornithin	(mM)	Lineweaver-Burk	0,5	0,5
		Eadie-Hofstee	0,5	0,53
		Hanes	0,5	0,5
Carbamylphosphat	(mM)	Lineweaver-Burk	1,25	1,85
		Eadie-Hofstee	1,12	1,62
		Hanes	1,4	2,0

Abb. 2

Substratabhängigkeit (Ornithin) von Ornithin-Carbamyl-Transferase
Leberextrakt ——— Serum - - - -

Abb. 3

Substratabhängigkeit (Carbamylphosphat) von Ornithin-Carbamyl-Transferase
Leberextrakt ——— Serum - - - -

Beim Leberenzym besteht zwischen 31° und 50° lineare Abhängigkeit des $\log v$ der Reaktionsgeschwindigkeit von der absoluten reziproken Temperatur (in Grad K). Für diesen Bereich beträgt die Aktivierungsenergie 11 830 cal/Mol bei einem Q_{10} von 1,84. Oberhalb von 50° tritt Hitzedenaturierung ein, so daß bei 65° nur 70% der maximalen Geschwindigkeit gemessen werden (Abb. 4).

In Ergänzung vorausgegangener Untersuchungen über eine nichtenzymatische Bildung fearonpositiver Verbindungen (22) und die Interferenz verschiedener Puf-

Abb. 4

Abhängigkeit der Ornithin-Carbamyl-Transferase-Aktivität eines Leberextraktes von der Temperatur; pH 7,65, Ornithin 12 mM, Carbamylphosphat 20 mM

fer bei unspezifischer sowie Ornithin-Carbamyl-Transferase-abhängiger Citrullinbildung (18) lassen sich folgende Wirkungen nachweisen (Tab. 2):

1. Hg^{2+} und *p*-Chlormercuribenzoat hemmen das Enzym stark, Jod, Jodacetat und die meisten Schwermetallionen in 10 mM Konzentration.
2. Tris und Phosphat wirken bei 10 mM als schwache Inhibitoren.
3. EDTA aktiviert Ornithin-Carbamyl-Transferase gering.

Auch die Serumaktivität wird von *p*-Chlormercuribenzoat (*p*CMB) und Hg^{2+} bei 1 mM und Cd^{2+} bei 10 mM total, sowie von 1 mM Cd^{3+} zu 65% gehemmt. Diese Befunde deuten auf das Vorliegen essentieller SH-Gruppen im Enzymmolekül.

Leber- und Serumenzym laufen bei der Papierelektrophorese mit gleicher Wanderungsgeschwindigkeit in der β -Globulinfraktion.

Tab. 2
Einfluß verschiedener Ionen, alkylirender Substanzen und Puffer auf die Aktivität von Ornithin-Carbamyl-Transferase aus Leber (Standardaktivität mit Triäthanolamin-Puffer = 1,0)

Effektor	Konzentration (mM)		
	100	10	1
Ca^{2+}	0,8	0,8	1,0
Mg^{2+}	1,0		
Cu^{2+}		0	0,43
Zn^{2+}		0	0,90
Cd^{2+}		0	0,20
Hg^{2+}		0	0,03
Mn^{2+}		1,0	
Fe^{2+}		0,37	1,0
Co^{2+}		0,90	1,0
Jod		0	1,0
<i>p</i> CMB		0	0
Jodacetat		0,12	1,0
Triäthanolamin	1,0	1,0	
Tris		0,85	
Phosphat		0,80	
Arsenat		1,0	
Citrat		1,0	
Collidin		1,0	
EDTA	1,2	1,2	

Diskussion

In Übereinstimmung mit SNODGRASS und PARRY (19) sind Phosphat- (13, 16, 17) und Trispuffer (13, 22) als Ornithin-Carbamyl-Transferase-Inhibitoren abzulehnen (18), ebenso Glycylglycin (13), das mit Carbamylphosphat Carbamidoglycylglycin bildet (23). Andererseits hemmt Tris auch diese unspezifische Carbamylierung, die, in geringerem Ausmaß als mit Glycylglycin, auch mit Lysin und Alanin eintritt (23). Gegenüber dem von ihnen (19) benutzten Triäthanolamin besitzt EDTA außer der Enzymaktivierung folgende Vorteile:

1. Carbamylphosphat wird durch Abfangen der die Spontanhydrolyse (von Carbamylphosphat) katalysierenden Ca^{++} -Ionen (24) stabilisiert.
2. Die partielle Ornithin-Carbamyl-Transferase-Inhibition durch Ca^{2+} (25) des Serums wird aufgehoben, die Hemmung von Urease und Ornithin-Carbamyl-Transferase durch Schwermetallionen verhindert.
3. Durch Bindung von Mg^{2+} wird die alkalische Serumphosphatase, die durch Carbamylphosphat-Spaltung Cyanat freisetzt, das mit Ornithin nichtenzymatisch Citrullin bildet (23, 26), inaktiviert.

Da die spontane Carbamylierung von Aminosäuren durch Carbamylphosphat (23) auch von Protein gehemmt wird (18), müssen auch beim Leerwert Serum und Carbamylphosphat zusammen inkubiert werden. Verfahren, die im Leerwert kein Serum (16, 17) oder kein Carbamylphosphat (19) enthalten, liefern zu hohe Extinktionen des Leerwertes. Das von SNODGRASS und PARRY (19) gemessene „non-enzymatic citrulline“ trat bei Hitze-denaturierung des Enzyms (Proteinhemmung elimi-

niert) oder Hg^{2+} -Zusatz (Katalysierung der Carbamylphosphat-Spaltung) auf.

Ähnliche Fehler resultieren aus mangelnder Harnstoffentfernung (aus den Carbamylphosphat-Lösungen der Leerwerte) infolge Zugabe von Quecksilberverbindungen (15, 19) und wurden oben erwähnt. Überdies macht die Proteinfällung einen Reaktionsstop mit Hg^{2+} -Ionen überflüssig. Das vorliegende Verfahren benötigt daher nur gepufferte Ornithin- und Carbamylphosphat-Urease-Lösung und verzichtet auf Hg^{2+} -Zusatz und Vorinkubation (15, 19).

Die Eigenschaften des Enzyms entsprechen weitgehend denen von Frosch- (1) und Rinderleber-Ornithin-Carbamyl-Transferase (13) und unterscheiden sich deutlich von den Daten der von GRILLO und BEDINO (27) aus Rinderleber angereicherten Aktivität. Gegenüber den Befunden von SNODGRASS und PARRY (19) läßt sich bei ähnlichen K_m Werten keine Abhängigkeit der K_m für Ornithin vom pH-Wert (Zwitterionbildung) oder Überschußhemmung durch Ornithin nachweisen.

Infolge der oben beschriebenen Störungen durch unspezifische Citrullinbildung, mangelnde Harnstoffelimination aus Carbamylphosphat und verschiedene Puffer liefert die Literatur Normwerte, die zwischen 30,2—72 (16) und 100—1050 nMol Citrullin/m $\cdot$ Std. (15) (0,5—1,2 bzw. 1,7—17,5 mU/m $\cdot$ l) liegen. Bei den hier gegebenen Werten ist zu beachten, daß neben dem Normalkollektiv (Blutspender) auch Aktivitäten bis zu 10 mU/m $\cdot$ l noch kein Indiz für eine Leberschädigung darstellen, da auch das Eintreten einer geringen Rechtsherzinsuffizienz zum Anstieg der Ornithin-Carbamyl-Transferase im Serum führt (28).

Literatur

1. BROWN jr., G. W. und PH. P. COHEN, J. biol. Chemistry, 234, 1769 (1959). — 2. REICHARD, H. und P. REICHARD, J. Laborat. Clin. Med., St. Louis, 52, 709 (1958). — 3. COUNITCHANSKY-CILLE, Y., J. F. BOLOT und R. CREYSEL, Rév. Franc. Étud. Clin. Biol. 12, 298 (1967). — 4. MOORE, F. M. L., Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 15, 103 (1967). — 5. MORETTI, G., R. MAHON, J. STAEFFEN, P. BALLAN, G. CATANZO und M. VANDERDRIERSCHÉ, Presse méd., (Paris) 71, 2793 (1963). — 6. WEBER, H., Klin. Wschr. 41, 37 (1963). — 7. KONTINEN, A., Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 18, 147 (1967). — 8. LORENTZ, K., diese Z. 5, 291 (1967). — 9. OSSENBERG, F. W., Dtsch. Arch. klin. Med. 214, 70 (1967). — 10. LORENTZ, K. und F. W. OSSENBERG, Med. Lab. 20, 77 (1967). — 11. REICHARD, P., Acta Chem. Scand. 11, 523 (1957). — 12. HERRIES, D. G., Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) 136, 95 (1967). — 13. BURNETT, G. H. und PH. P. COHEN, J. biol. Chemistry 229, 337 (1957). — 14. BROWN, R. W. und S. GRISOLIA, J. Laborat. Clin. Med., St. Louis, 54, 617 (1959). — 15. KULHÁNEK, V. und V. VOJTRÍŠKOVÁ,

Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 9, 95 (1964). — 16. CERIOTTI, G. und A. GAZZANIGA, Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 14, 57 (1966). — 17. CERIOTTI, G. und A. GAZZANIGA, Clin. Chim. Acta (Amsterdam) 16, 436 (1967). — 18. LORENTZ, K. und J. ADLUNG, Med. Lab. 21, 102 (1968). — 19. SNODGRASS, PH. J. und D. J. PARRY, J. Laborat. Clin. Med., St. Louis, 73, 940 (1969). — 20. HOGEBOOM, G. H., in: Methods in Enzymology I, 16 Academic Press, New York (1955). — 21. ALLEN, C. M. und M. E. JONES, Biochemistry (USA) 3, 1238 (1964). — 22. JOSEPH, R. L., E. BALDWIN und D. C. WATTS, Biochem. J. 87, 409 (1963). — 23. LORENTZ, K., Mikrochim. Acta (Wien) 9, 358 (1969). — 24. OESTREICH, CH. H. und M. M. JONES, Biochemistry (USA) 5, 3151 (1966). — 25. MCLEAN, P. und E. ROSSI, Biochem. J. 91, 261 (1964). — 26. REIFER, J. und K. KLECZKOWSKI, Z. Naturforsch. 15b, 431 (1960). — 27. GRILLO, M. A. und S. BEDINO, Enzymologia 35, 1 (1968). — 28. LORENTZ, K., J. ADLUNG und U. RITTER, Dtsch. Arch. klin. Med. 214, 48 (1967).

PD Dr. Klaus Lorentz
I. Med. Klinik der Med. Akademie
24 Lübeck
Kronsfordter Allee 71/73