

Mit steigender Strömungsgeschwindigkeit strebt bei konstanter Spültdauer und konstanter Temperatur die prozentuale Radonabgabe einem Endwert zu. Dies bedeutet, dass für eine bestimmte Spültdauer bei ständiger Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeit die Entemanierung begrenzt ist. Dieser Vorgang nähert sich mit zunehmender Spültdauer asymptotisch einem Gleichgewichtszustand mit dem Zerfall der Emanation, welcher anscheinend für das verwendete Adsorbens bei ca. 80 % liegt. Der zeitbestimmende Vorgang dürfte von da an mit der sehr langsam fortschreitenden Diffusion aus den extrem aktiven Plätzen der Kohlenoberfläche identisch sein. Führt man nun dieselbe Versuchsreihe bei höheren Temperaturen durch, so werden sich die prozentualen Verluste entsprechend früher dem Grenzverluste nähern.

Zusammenfassung.

Im Anschluss an frühere Versuche über Mischgasadsorptionen im geschlossenen Systeme wurde die Adsorption von Radon an Aktivkohle im dynamischen Verfahren der freien Gasdurchströmung an Hand von Verteilungskurven untersucht.

Ferner wurde die Desorption von Radiumemanation im Stickstoffstrom für eine Ahornkohle mittlerer Aktivität quantitativ verfolgt.

Anorganisch-chemisches Institut
der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich.

20. Über den Mechanismus der Glutaminsynthese

von M. Staehelin und F. Leuthardt.

(13. XII. 54.)

In einer kurzen Mitteilung¹⁾ haben wir über Versuche berichtet, welche die Hemmung der Glutaminsynthese durch SH-Reagenzien zeigten. Wir kamen dabei zum Schluss, dass SH-Gruppen bei der Glutaminbildung wesentlich beteiligt sind. Im folgenden werden Versuche beschrieben, die darauf hinweisen, dass die SH-Gruppen des Enzyms zuerst mit dem ATP²⁾ reagieren und dass dabei eine Phosphorylierung des Enzyms stattfindet.

Experimenteller Teil.

Fermente. Für die Versuche mit radioaktivem ADP verwandten wir das Enzym von Elliott³⁾. Dabei mussten wir nach der Fällung mit Protaminsulfat eine Inaktivierung feststellen, die sich jedoch durch Zugabe eines Komplexbildners aufheben liess, und die

¹⁾ F. Leuthardt & M. Staehelin, Helv. physiol. pharmacol. Acta **11**, C 61 (1953).

²⁾ Abkürzungen: ATP = Adenosintriphosphorsäure; ADP = Adenosindiphosphorsäure; AMP = Adenosinmonophosphorsäure.

³⁾ W. H. Elliott, J. biol. Chemistry **201**, 661 (1953).

deshalb vermutlich auf eine Schwermetallverunreinigung zurückzuführen ist. In den übrigen Versuchen benützten wir das Taubenleberenzym von *Speck*¹⁾.

Gewinnung des AD³²P. Zuerst wurde nach einer Modifikation der Methode von *Hems & Bartley*²⁾ AT³²P hergestellt. Wir inkubierten unter den dort angegebenen Bedingungen AMP und Na₂H³²PO₄ mit Lebermitochondrien und Pyruvat. Nach 40 Min. wurden die Proteine mit 1/5 Vol. konz. HClO₄ gefällt und die Lösung 2 Std. in Eis stehen gelassen, um sicher die gesamte Myokinase zu fällen. Dann wurde mit 2-m. KOH neutralisiert und nach Zugabe von etwas 0,1-m. CaCl₂-Lösung und 1-m. Glykokollpuffer das pH auf 9,2 eingestellt. Nach Zugabe von mehrfach umgefälltem Actomyosin wurde 20 Min. bei 38° inkubiert und wieder mit HClO₄ enteiweißt. Die neutralisierte Lösung wurde auf das Papier streifenförmig längs der Startlinie aufgetragen und nach *Krebs & Hems*³⁾ chromatographiert. Die dem ADP entsprechenden Streifen wurden ausgeschnitten und das AD³²P mit Wasser eluiert. Die so erhaltene Lösung wurde den Ansätzen zugesetzt.

Analytische Methoden. Die Aktivität der Glutaminsynthetase wurde nach der Methode von *Speck*¹⁾ an Hand der gebildeten Hydroxamsäure bestimmt. Die Ansätze enthielten: 0,4 ml 0,1-m. Glutaminsäure, 0,4 ml 0,1-m. Hydroxylamin, 0,4 ml 0,02-m. ATP, 0,1 ml 0,1-m. MgSO₄, 0,2 ml 0,1-m. Phosphatpuffer pH 7,4, 0,2 ml Taubenleberenzym, Wasser und übrige Zusätze; Gesamtvolume 2,5 ml. Inkubation 40 Min. bei 38°. Die Ablesungen wurden gegen eine gleich stark verdünnte FeCl₃-Lösung als Leerwert gemacht.

Die Ansätze zur Bestimmung des Austausches von radioaktivem Phosphat enthielten 0,5 ml der ca. 5×10^{-4} -m. AD³²P-Lösung, 0,05 ml 0,1-m. MgSO₄, 0,05 ml 0,1-m. Phosphatpuffer pH 7,4, 0,05 ml 0,01-m. ATP, 0,05 ml 0,01-m. „Glycolkomplexon“ (Äthylenglycol-bis-[aminoäthyläther]-N,N,N',N'-tetraessigsäure⁴⁾), 0,2 ml Enzym. Nach Inkubation von 20 Min. bei 38° wurden die Ansätze mit HClO₄ enteiweißt und nach der Methode von *Krebs & Hems*³⁾ chromatographiert. Die Papierstreifen wurden auf einer vor dem Zählrohr verschiebbaren Schiene befestigt und die Aktivität in Abständen von 3 zu 3 mm bestimmt. Durch Zuhilfenahme einer Messingblende von 1 mm Weite, 5 mm Höhe und 3 cm Breite gelang es, die den einzelnen Nucleotiden entsprechenden Aktivitäten sauber zu trennen. Durch Summation wurde die totale Aktivität der einzelnen Fraktionen berechnet.

Resultate.

Reaktion des Enzyms mit dem ATP: Die Annahme, dass die SH-Gruppen des Enzyms an der Reaktion teilnehmen, stützt sich vor allem auf die Hemmbarkeit der Reaktion durch die verschiedenartigsten Sulfhydrylreagenzien und die Reaktivierung durch SH-Verbindungen⁵⁾. Dass die SH-Gruppen tatsächlich mit dem ATP reagieren, könnte dadurch nachgewiesen werden, dass die Mercurochromhemmung in bezug auf das ATP kompetitiven Charakter hat. Eine kompetitive Hemmung lässt sich an der Abnahme der relativen Hemmung bei Erhöhung der Substratkonzentration erkennen. Wir konnten zunächst eine solche Abnahme der Hemmung bei Erhöhung der ATP-Konzentration nicht beobachten, auch nicht bei Erhöhung der Konzentration der übrigen Substrate. Es zeigte sich, dass der erwartete Effekt des ATP durch eine Hemmwirkung überlagert wird.

¹⁾ *J. F. Speck*, *J. biol. Chemistry* **179**, 1405 (1949).

²⁾ *R. Hems & W. Bartley*, *Biochem. J.* **55**, 434 (1953).

³⁾ *H. A. Krebs & R. Hems*, *Biochim. biophys. Acta* **12**, 172 (1953).

⁴⁾ Ein Komplexbildner, der bei pH 7,0 Calciumionen, nicht aber Magnesiumionen bindet; vgl. *J. Raaflaub*, *Helv.* **38**, 27 (1955).

⁵⁾ *F. Leuthardt & M. Stachelin*, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **11**, C 61 (1953).

Wir konnten nämlich bei hohen ATP-Konzentrationen eine Abnahme der Aktivität feststellen, die jedoch nicht auftrat, wenn gleichzeitig die Mg-Konzentration vergrössert wurde. Eine genauere Untersuchung liess eine eindeutige Abhängigkeit des ATP-Konzentrationsoptimums von der Mg-Konzentration erkennen (Fig. 1). Wenn man

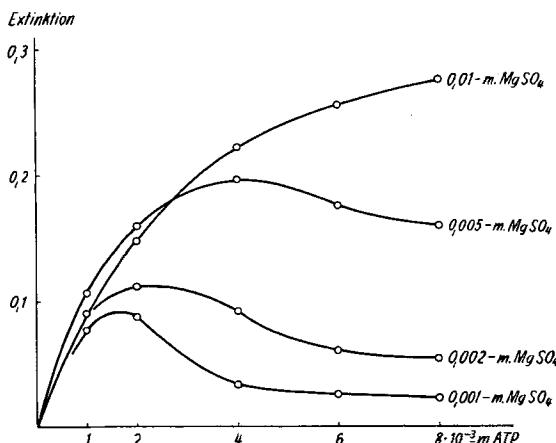


Fig. 1.

Abhängigkeit des ATP-Optimums von der $MgSO_4$ -Konzentration.

Alle Ansätze enthielten 0,016-m. Glutaminsäure, 0,016-m. Hydroxylamin, 0,008-m. Phosphatpuffer pH 7,4, 0,2 ml Taubenleberenzym. Gesamtvolumen 2,5 ml.

Tabelle 1.

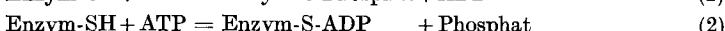
Mercurochromhemmung in Abhängigkeit von ATP und Mg^{++} .

Versuchsansätze siehe Text. a) $1,7 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP + $1,7 \cdot 10^{-3}$ -m. $MgSO_4$
b) $5 \cdot 10^{-3}$ -m. ATP + $8,3 \cdot 10^{-3}$ -m. $MgSO_4$

Mercurochrom . .	0	4×10^{-5} -m.	6×10^{-5} -m.	8×10^{-5} -m.
Aktivität	a) 195 b) 435	a) 115 b) 380	a) 83 b) 348	a) 48 b) 282
Relative Hemmung		41% 13%	57,5% 20%	75,5% 37%

daher eine Verminderung der Mercurochromhemmung durch ATP nachweisen will, muss man mit der ATP-Konzentration auch die Mg^{++} -Konzentration vergrössern. Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass unter diesen Bedingungen die Mercurochromhemmung tatsächlich kompetitiven Charakter hat; sie ist bei hohen ATP-Konzentrationen viel geringer. Diese Resultate sprechen für eine Reaktion der SH-Gruppen des Enzyms mit dem ATP.

Phosphorylierung des Enzyms. Für die Reaktion des Enzyms mit dem ATP liegen zwei Möglichkeiten vor¹⁾:



¹⁾ F. Leuthardt & M. Stachelin, Helv. physiol. pharmacol. Acta 11, C 61 (1953).

Beide Möglichkeiten lassen sich mit Hilfe der Isotopentechnik nachprüfen. Die Reaktionen sind umkehrbar¹⁾, und daher wird in Gegenwart des Enzyms Phosphat zwischen ATP und ADP bzw. ATP und anorganischem Phosphat ausgetauscht. Im ersten Fall muss bei Inkubation von ATP mit AD³²P radioaktives AT³²P entstehen; im zweiten Fall muss sich AT³²P aus ATP und anorganischem radioaktivem Phosphat bilden. Wir haben die erste Möglichkeit untersucht.

Tabelle 2.

Phosphataustausch zwischen ATP und ADP.

Der Austausch ist ausgedrückt in % Aktivität (32 P) im ATP, verglichen mit der Gesamtaktivität (ATP+ADP).

Ansätze	Versuch 1		Versuch 2*)		mit 0,05-n. HCl erhitztes Enzym
	Kontrolle	10 ⁻⁴ -m. Mer- eurochrom	Kontrolle	CaCl ₂ 0,01-m.	
Austausch .	58,5%	37,5%	37%	25%	16%
Hemmung .		36%		32%	57%

*) In Versuch 2 wurde nur die halbe Menge AD³²P und Enzym verwendet.

Dabei lag die Hauptschwierigkeit darin, dass die Glutaminsynthetase von der begleitenden Myokinase nicht vollständig getrennt werden kann. Dies ist aber notwendig, weil die Myokinase ebenfalls ADP in ATP überführt. Sowohl das Enzym von *Speck*²⁾ als auch das aus grauer Substanz von Kalbshirn gereinigte Enzym von *Frei*³⁾ und die 1000- bis 2000fach gereinigte Fraktion von *Elliott*⁴⁾ enthalten noch etwas Myokinase. Auch weitere Versuche, das Enzym durch Adsorption an Ca-Phosphat-Gel oder Kieselgur zu reinigen, führten zu keinem Erfolg. Dabei trat deutlich die Wichtigkeit der anzuwendenden Testmethode zutage. Eine Myokinaseaktivität kann entweder mit der spektrophotometrischen Methode von *Kalckar*⁵⁾ festgestellt werden oder durch chromatographische Trennung der drei Nucleotide nach Inkubation mit ADP. Im photometrischen Test liegt die Konzentration der Nucleotide zwangsweise unter 10⁻⁴-m. In unseren Enzymen konnte mit dieser Methode fast keine Myokinaseaktivität festgestellt werden, und doch war nach Inkubation mit 2 × 10⁻³-m. ADP in den Papierchromatogrammen ein deutlicher ATP-Fleck zu sehen. Erst nachdem wir das Enzym von *Elliott* noch dreimal mit Nucleinsäure gefällt hatten, gelangten wir zu einer Fraktion, die nach Inkubation mit ADP im Chromatogramm fast keinen ATP-Fleck mehr erkennen liess. Aber auch diese Fraktion zeigte bei Inkubation mit radioaktivem AD³²P deutlich die Bildung von AT³²P. Das durch

¹⁾ *L. Levintow & A. Meister*, J. biol. Chemistry **209**, 265 (1954).

²⁾ *J. F. Speck*, J. biol. Chemistry **179**, 1405 (1949).

³⁾ *J. Frei*, Dissertation Universität Zürich, 1954.

⁴⁾ *W. H. Elliott*, J. biol. Chemistry **201**, 661 (1953).

⁵⁾ *H. M. Kalckar*, J. biol. Chemistry **167**, 445 (1947).

Myokinase gebildete $AT^{32}P$ enthält im Gegensatz zum $AD^{32}P$ zwei radioaktive P-Atome; daher macht sich ein Myokinasegehalt der Fermente bei diesen Versuchen besonders störend bemerkbar. Unter diesen Umständen bestand die Schwierigkeit darin, den Anteil festzustellen, welchen die Myokinase an der Bildung des $AT^{32}P$ hat. Es gelingt auf verschiedene Weise, die Aktivitäten beider Enzyme voneinander zu trennen. Wir konnten feststellen, dass die Glutaminsynthetase durch 0,01-m. $CaCl_2$ vollständig gehemmt wird (vgl. Fig. 2);

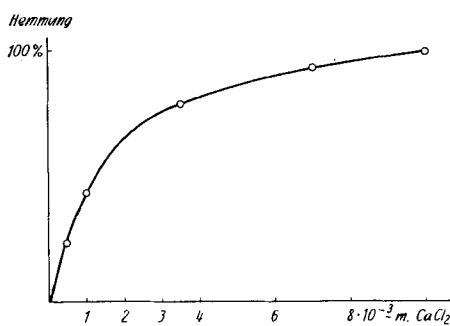


Fig. 2.

Hemmung der Glutaminsynthetase durch $CaCl_2$.

Alle Ansätze enthielten 0,016-m. Glutaminsäure, 0,016-m. Hydroxylamin, 0,003-m. ATP, 0,004-m. Magnesiumsulfat, 0,008-m. Phosphatpuffer pH 7,4, 0,2 ml Taubenleberenzym. Gesamtvolume 2,5 ml.

die gleiche Konzentration an $CaCl_2$ beeinflusst aber die Myokinase nicht¹⁾. Ferner wird die Glutaminsynthetase durch 10^{-4} -m. Mercurochrom fast vollständig gehemmt. Die Myokinase ist zwar auch ein SH-Enzym²⁾, wird aber erst durch höhere Konzentrationen beeinflusst. Nach der Methode von *Colowick & Kalckar*²⁾ hergestellte Myokinasepräparate zeigten bis zu 5×10^{-4} -m. Mercurochrom noch keine Hemmung. Außerdem ist die Myokinase ein hitzestabiles Enzym und erträgt kurzes Kochen in 0,05-m. HCl; dagegen wird bei dieser Behandlung die Glutaminsynthetase vollkommen zerstört. Die Wirkungen des $CaCl_2$, des Mercurochroms und des Erhitzens sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Es zeigt sich, dass bei Gegenwart des Enzyms ein beträchtlicher Austausch von Phosphor zwischen ADP und ATP stattfindet. Die Aktivität, die nach Hemmung des synthetisierenden Enzyms durch 0,01-m. $CaCl_2$ und Mercurochrom oder nach seiner Zerstörung durch Erhitzen bestehen bleibt, ist der Myokinase zuzuschreiben. (In Versuch 2 dürfte die stärkere Verminderung des Austausches nach Erhitzen durch eine teilweise Inaktivierung der Myokinase zu erklären sein.)

¹⁾ *W. J. Bowen & T. D. Kerwin*, Arch. Biochemistry Biophys. **49**, 149 (1954).

²⁾ *S. P. Colowick & H. M. Kalckar*, J. biol. Chemistry **148**, 117 (1943).

Diskussion.

Nach den oben beschriebenen Versuchen kann eine Reaktion des Glutamin synthetisierenden Enzyms mit ATP gemäss Gl. (1) angenommen werden. Die Tatsache der oben erwähnten gegenseitigen Beeinflussung von ATP und Mg^{++} erscheint besonders bedeutungsvoll im Hinblick auf die schon mehrfach beschriebene Hemmung von Fermentreaktionen durch hohe ATP-Konzentrationen, z. B. der Argininsynthese¹⁾ und der Glutathionsynthese²⁾. Unsere Versuche lassen vermuten, dass auch diese Hemmungen auf eine im Vergleich zu den Mg^{++} -Konzentrationen zu hohe ATP-Konzentration zurückzuführen sind.

*Raaflaub*³⁾ hat an unserem Institut gezeigt, dass ATP ein guter Komplexbildner ist und aus diesem Grund verschiedene von zweiwertigen Metallen abhängige Reaktionen beeinflusst. Es liegt daher nahe, anzunehmen, dass bei einem Überschuss von ATP das Magnesium in einen inaktiven Komplex übergeführt wird, so dass die Mg^{++} -Konzentration limitierender Faktor wird. Die Bedeutung, die dem Magnesium bei der Phosphorylierung des Enzyms zukommt, ist noch nicht abgeklärt. Interessant erscheint der Umstand, dass zur Verminderung der Hemmung die Erhöhung beider Konzentrationen, derjenigen von ATP und von Mg, nötig ist. Erhöhung der ATP-Konzentration allein führt auch bei hohen Mg-Konzentrationen nicht zu einer Abnahme der relativen Hemmung. Die Bedeutung dieses Befundes bedarf noch der weiteren Abklärung.

Zu beiden in Gleichung (1) und (2) wiedergegebenen Reaktionen liegen Analogien vor. *Lipmann*⁴⁾ schliesst aus seinen Versuchen, dass bei der CoA-Acylase zuerst eine Enzym-AMP-Verbindung gebildet wird. Für die der Glutaminbildung näher verwandten Reaktionen, wie die Synthese der Glutathions und die Bildung von Glutamylcystein, liegen Arbeiten von *Snoke*⁵⁾ und *Webster & Varner*⁶⁾ vor, die für eine Phosphorylierung des Enzyms sprechen. Auch die Glutaminbildung selbst wurde von *Webster & Varner*⁷⁾ untersucht. Bei Inkubation von ATP und markiertem Orthophosphat trat kein Austausch ein. Der durch Zugabe von Glutaminsäure auftretende Austausch wurde im Sinne einer Phosphorylierung des Enzyms interpretiert.

Bemerkenswert erscheint der Umstand, dass sich die Myokinase nicht von der Glutaminsynthetase abtrennen lässt. Auch *Meister*⁸⁾

¹⁾ *S. Ratner & A. Pappas*, *J. biol. Chemistry* **179**, 1183 (1949).

²⁾ *R. B. Johnston & K. Bloch*, *J. biol. Chemistry* **188**, 221 (1951).

³⁾ *J. Raaflaub*, *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **13** (1955), im Druck; *Helv.* **38**, 27 (1955).

⁴⁾ *M. E. Jones, S. Black, R. M. Flynn & F. Lipmann*, *Biochim. biophys. Acta* **12**, 141 (1953).

⁵⁾ *J. E. Snoke*, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 4872 (1953).

⁶⁾ *G. C. Webster & J. E. Varner*, *Feder. Proc.* **13**, 317 (1954).

⁷⁾ *G. C. Webster & J. E. Varner*, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 633 (1954).

⁸⁾ *L. Levintow & A. Meister*, *J. biol. Chemistry* **209**, 265 (1954).

beschreibt in einer eben erschienenen Arbeit diese Schwierigkeit. Es erhebt sich die Frage, ob es sich dabei um eine schwer abzutrennende Verunreinigung handelt, oder ob dem Enzym selbst Myokinaseaktivität zukommt. Da vermutlich auch die Myokinase phosphoryliert wird, wäre eine gewisse Ähnlichkeit beider Enzyme verständlich. Bei der Synthese des Glutathions¹⁾ und des Glutamylcysteins²⁾ konnten jedoch die betreffenden Enzyme myokinasefrei erhalten werden. Auch der Umstand, dass die Myokinaseaktivität bei zunehmender Reinigung abnimmt, spricht eher dafür, dass es sich um eine Verunreinigung durch ein zweites Enzym und nicht um eine Eigenschaft des Glutamin synthetisierenden Ferments handelt.

SUMMARY.

1. By incubating the glutamine synthesizing enzyme with AD³²P and ATP the latter became radioactive by exchange with AD³²P. Our enzyme preparation still contained some myokinase which it was impossible to remove. Using suitable inhibitors (mercurochrome, 0,1-m. CaCl₂) we show that the exchange is only partly due to myokinase. There exists a second reaction, catalysed by glutamine synthetase, which may be explained by phosphorylation of the enzyme, thus:



2. Glutamine synthesis was inhibited by SH-reagents (e. g. mercurochrome). By raising the concentration of ATP and magnesium together the mercurochrome inhibition of glutamine synthesis was suppressed. As the relative mercurochrome inhibition diminishes with increasing ATP and Mg concentrations we may infer that mercurochrome competes in the enzyme-ATP reaction and that therefore an SH-group of the enzyme is phosphorylated by ATP.

3. Increasing ATP concentration inhibited glutamine synthesis unless the magnesium concentration was increased proportionally. Therefore we conclude that ATP in excess forms an inactive complex with magnesium ions.

Physiologisch-Chemisches Institut
der Universität Zürich

¹⁾ *J. E. Snoke*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 4872 (1953).

²⁾ *G. C. Webster & J. E. Varner*, Feder. Proc. **13**, 317 (1954).