

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

FRANCESCO DE LORENZO, GENNARO ILLIANO, GUIDO  
MOLEA, GENNARO DELLA PIETRA

## Alternativa biochimica nella sintesi dell'urea

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 38 (1965), n.1, p. 96–100.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1965\\_8\\_38\\_1\\_96\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1965_8_38_1_96_0)>

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

---

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma  
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)  
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

**Chimica biologica.** — *Alternativa biochimica nella sintesi dell'urea* (\*). Nota di FRANCESCO DE LORENZO, GENNARO ILLIANO, GUIDO MOLEA e GENNARO DELLA PIETRA, presentata (\*\*) dal Corrisp. F. CEDRANGOLO.

Recentemente Salvatore e coll. [1], in esperimenti effettuati nel Laboratorio di Chimica Biologica dell'Università di Napoli, con l'ausilio della tecnica di spettrometria di massa (Spettrometro di massa della casa Italelettronica SP-21-F), hanno dimostrato che la somministrazione *in vivo* di acido  $\alpha$ -metil-aspartico ( $\alpha$ -MA) inibisce la sintesi di urea a partire da  $N^{15}H_4^+$  in omogenati di fegato di ratto. Nella Tabella I vengono riportati i risultati ottenuti dagli Autori [1].

TABELLA I.

*Incorporazione di  $N^{15}H_4^+$  in urea in presenza di omogenati di fegato di ratto: effetto dell' $\alpha$ -MA iniettato in vivo (da Salvatore e coll. [1]).*

Composizione della miscela di incubazione: omogenato di fegato in saccarosio 0,25 M (33%): 1 ml.;  $MgCl_2$ , piruvato di sodio: 20  $\mu$ mol ciascuno; L-ornitina: 2  $\mu$ mol; ATP: 5  $\mu$ mol;  $N^{15}H_4NO_3$  (30,04%  $N^{15}$ ): 1,98  $\mu$ mol; volume finale: 3 ml. Incubazione a 37° in termostato rotante. Ambiente:  $O_2$ .

Trattamento dei ratti (uccisi dopo 1 h dall'iniezione)	Tempo di incubazione (min)	$\mu$ g $NH_3$ /g tessuto (dopo idrolisi con ureasi)	% $N^{15}$
NaCl 0,9% . . . . .	0	114	0,816
	60	138	2,195
$\alpha$ -MA (3,4 mmol/kg) . . . . .	0	117	0,906
	60	117	0,910

I dati riportati dimostrano, dunque, che l'ammoniaca segnata con  $N^{15}$ , se aggiunta ad omogenato di fegato di ratto in presenza di ornitina, piruvato, ATP ed  $Mg^{++}$ , viene incorporata nella molecola dell'urea. Si può calcolare

(\*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Chimica Biologica dell'Università di Napoli con un contributo del C.N.R. (Impresa Enzimologia).

(\*\*) Nella seduta del 9 gennaio 1965.

che il 27 % dell'azoto dell'*extra*-urea sintetizzata trae la sua origine dall' $N^{15}$  dell'ammoniaca. Se invece che da fegato di ratti normali, gli omogenati sono ricavati da fegato di ratti trattati *in vivo* con  $\alpha$ -MA (3,4 mmol/kg), l' $N^{15}$  dell'ammoniaca resta inutilizzato ai fini della sintesi dell'urea.

I dati riportati nella presente Nota (presentati nel luglio 1964 al VI Congresso Internazionale di Biochimica di New York [2]) riguardano esperimenti relativi alla sintesi di urea in omogenati di rene di pulcino. Anche questi esperimenti sono stati effettuati con l'ausilio della tecnica della spettrometria di massa.

#### PARTE SPERIMENTALE E RISULTATI.

Pulcini di razza livornese dell'età di circa tre settimane erano uccisi per decapitazione. Dopo dissanguamento, il rene, rapidamente prelevato, era lavato a freddo con saccarosio 0,25 M per tre volte e omogenizzato poi in puffer fosfati (secondo Sørensen) 0,02 M pH 7,2 (1 gr di tessuto fresco a 2,5 ml) in Potter con pestello di teflon [3]. Le prove erano allestite in pozzetti di Warburg secondo quanto indicato nelle Tabelle II e III. Al termine dell'incubazione le prove erano deproteinizzate al calore (80° per 3') e centrifugate.

TABELLA II.

*Incorporazione di  $N^{15}H_4^+$  (\*) in urea, in omogenati di rene di pulcino.*

Composizione della miscela di incubazione: omogenato di rene (vedi testo) 0,75 ml (pari a 300 mg di tessuto fresco); ATP: 5  $\mu$ moli; piruvato di sodio, fumarato di sodio,  $MgCl_2$ , L-oritina, L-aspartato,  $NaHCO_3$ ,  $N^{15}H_4NO_3$  (30%  $N^{15}$  in eccesso): 15  $\mu$ moli ciascuno; volume finale: 3 ml con  $H_2O$ ; pH 7,2. Ambiente:  $O_2$  (5%  $CO_2$ ). Incubazione a 37°.

Tempo d'incubazione (min.)	$\mu$ moli urea/g tessuto fresco	% $N^{15}$ nell'urea (*)
0	1,8	0,375
60	3,5	0,380

(\*) I dati riportati in questa colonna sono stati così calcolati: dal % di  $N^{15}$  nell' $NH_3$  dosata e dalla quantità di  $NH_3$  si calcolava la quantità assoluta di  $N^{15}$ , sia prima che dopo il trattamento con ureasi; si sottraeva a tale quantità dopo ureasi quella prima del trattamento con ureasi; tale differenza, che rappresenta la quantità di  $N^{15}$  relativa all'urea formata, veniva riferita alla quantità di urea dosata (vedi dati della colonna precedente) e così si ricavava il % di  $N^{15}$  nell'urea.

*Esperimenti riportati in Tabella II.* - I sopranatanti di tre prove uguali erano raccolti in beutine e addizionati con 2 g di permutite Merck (precedentemente lavata con HCl 0,1 N e poi equilibrata a pH 5 con  $H_2O$ ). Si agitava per 30' e si centrifugava. Aliquote del sopranatante (in genere 1 ml) venivano analizzate secondo il metodo di Seligson e Hirahara [4] per determinare la quantità di  $NH_3$  residua (che era cioè ancora presente pur dopo trattamento con permutite). Analoghe aliquote venivano addizionate con 0,5 ml di puffer

acetato 0,02 M pH 5 contenente 1 mg di ureasi (ureasi Sigma, type V) e incubate a 37° in agitatore per 40'. Dopo digestione ureasica si dosava l' $\text{NH}_3$  secondo il metodo precedentemente indicato [4]. Altre aliquote, infine, sia trattate che non trattate con ureasi, erano sottoposte alla microdiffusione e l' $\text{NH}_3$  così raccolta era utilizzata per le analisi allo spettrometro di massa.

I risultati ottenuti, espressi in  $\mu\text{moli}$  di urea per g di tessuto fresco, sono riportati nella Tabella II.

I risultati di questa tabella dimostrano che nel rene di pulcino non vi è incorporazione nell'urea *extra-sintetizzata* dell' $\text{N}^{15}$  della  $\text{N}^{15}\text{H}_3$ .

*Esperimenti riportati in Tabella III.* - Anche in questo caso, sui soprannatanti delle prove deproteinizzate al calore e centrifugate, veniva eseguito il dosaggio dell'urea con il metodo dell'ureasi: digestione con ureasi e dosaggio dell' $\text{NH}_3$  con il metodo di Seligson e Hirahara [4] secondo quanto indicato precedentemente. I risultati ottenuti, espressi in  $\mu\text{moli}$  di urea per h e per g di tessuto fresco, sono riportati nella Tabella III.

TABELLA III.

*Sintesi di urea nell'omogenato di rene di pulcino.*

Composizione della miscela di incubazione: omogenato di rene (vedi testo): 0,75 ml (pari a 300 mg di tessuto fresco); piruvato di sodio, fumarato di sodio,  $\text{MgCl}_2$ , L-ornitina, L-aspartato,  $\text{NaHCO}_3$ , L-leucina: 15  $\mu\text{moli}$  ciascuno; ATP: 5  $\mu\text{moli}$ ; volume finale: 3 ml con  $\text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,2. Ambiente  $\text{O}_2$  (5%  $\text{CO}_2$ ). Incubazione a 37°: 1 h.

Condizioni sperimentali	$\mu\text{moli}$ urea /h/g tessuto fresco
Sistema completo . . . . .	5,5
senza leucina ed aspartato . . . . .	2,2
senza ornitina ed aspartato . . . . .	2
senza ornitina e leucina . . . . .	2,6
senza leucina . . . . .	3,2
senza aspartato . . . . .	2,2
Sistema completo (deproteinizzato al tempo 0)	1,6

Dai risultati esposti in Tabella III risulta che la L-leucina, aggiunta ad omogenato di rene di pulcino in presenza di L-aspartato e di L-ornitina, è in grado di determinare una apprezzabile *extra-formazione* di urea.

## DISCUSSIONE.

Il significato degli esperimenti riportati in Tabella III appare ridotto dalla bassa resa in urea. Inoltre è da tener conto che il substrato biologico è

il rene di pulcino, cioè un tessuto di animale uricotelico: l'aumento dell'urea dopo aggiunta di L-leucina all'omogenato starebbe ad indicare, perciò, piuttosto che un'attivazione di un ciclo ureogenetico, un aumento della concentrazione dell'arginina nel tessuto in questione (ved. Clementi [9]). Tutt'al più si potrebbe essere autorizzati a concludere che la sintesi degli atomi di azoto dell'aggruppamento guanidinico dell'arginina avviene attraverso una via sulla quale non è intercalata ammoniaca libera.

Comunque, se si vuol trarre una conclusione più generale dai dati delle Tabelle II e III, ci sembra che questi dati debbano essere considerati insieme ai già citati dati di Salvatore e coll. [1] riportati nella Tabella I. Per tale interpretazione è necessario premettere quanto segue:

1° che l' $\alpha$ -MA, come è stato dimostrato da precedenti ricerche di Cedrangolo e della sua Scuola [5-8], quando iniettato *in vivo* nella dose di 3,4 mmol per kg di peso corporeo, è in grado di bloccare al 100% la reazione di condensazione tra aspartato e citrullina, reazione che, secondo tutti i Biochimici, sarebbe una reazione fondamentale, obbligatoriamente intercalata nella catena di reazioni, che dall'azoto aminico conduce all'azoto ureico (ved. Cedrangolo [10, 11]);

2° che nel rene di pulcino manca la carbammilfosfato-sintetasi (CP-sintetasi) [12, 13], enzima capace di trasformare l' $\text{NH}_3$  nella forma attiva per la sintesi dell'urea (carbammilfosfato o CP).

Pertanto si può concludere che, quando il ciclo dell'ornitina è bloccato, o a livello della condensazione tra aspartato e citrullina (azione dell' $\alpha$ -MA) oppure a livello della sintesi di carbammilfosfato (assenza di CP-sintetasi nel rene di pulcino), l' $\text{NH}_3$  non può essere organicizzata ad urea.

Come risulta dai nostri dati, invece, in queste ultime condizioni sperimentali (rene di pulcino, in cui è assente la CP-sintetasi) l'azoto aminico della L-leucina sarebbe in grado di determinare una apprezzabile *extra*-formazione di urea.

Pare quindi che effettivamente si possa sostenere l'idea, da qualche tempo prospettata da Cedrangolo (loc. cit. [10-11]), di una alternativa metabolica:

a) biosintesi dell'urea attraverso una catena di reazioni nella quale l' $\text{NH}_3$  non rappresenta un intermediario obbligatorio. L'idea di una catena di reazioni di trasporto molecolare tra azoto aminico e azoto ureico fu avanzata da Cedrangolo [14] dieci anni or sono ed è stata rafforzata da tutta una serie di ricerche originali condotte per vie diverse nello stesso Laboratorio di Chimica Biologica di Napoli (per una completa bibliografia vedi loc. cit. [10, 11]);

b) biosintesi dell'urea dall' $\text{NH}_3$  attraverso una via che pare identificabile col ciclo dell'ornitina, formulato nella sua più moderna rappresentazione (vedi loc. cit. [10, 11]).

Allo scopo di ulteriormente chiarire questi problemi, le ricerche continueranno in condizioni sperimentali diverse e con l'uso anche di L-aminoacidi marcati con  $\text{N}^{15}$ .

## BIBLIOGRAFIA.

- [1] F. SALVATORE, F. CIMINO, C. PIETROPAOLO, V. ZAPPÀ, D. CITTADINI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 39, 733 (1964).
- [2] F. DE LORENZO, G. ILLIANO, G. MOLEA, G. DELLA PIETRA, Comunicazione al VI Congresso Internazionale di Biochimica, New York 1964, luglio. Abstracts vol. 32, I.U.B. series, p. 396 (IV-B-29).
- [3] V. R. POTTER, in *Methods in Enzymology*, vol. I (Ed. Colowick e Kaplan) 1955, New York, Academic Press, p. 10.
- [4] D. SELIGSON, K. HIRAHARA, « Jour. Lab. Clin. Med. », 49, 962 (1957).
- [5] F. CEDRANGOLO, G. DELLA PIETRA, D. CITTADINI, S. PAPA, F. DE LORENZO, « Nature », 195, 708 (1962).
- [6] F. CEDRANGOLO, G. DELLA PIETRA, F. DE LORENZO, S. PAPA, D. CITTADINI, « Enzymologia », 25, 308 (1963).
- [7] D. CITTADINI, F. CIMINO, M. D'AYELLO CARACCILO, F. SALVATORE, « Life Sciences », 3, 61 (1964).
- [8] F. SALVATORE, F. CIMINO, M. D'AYELLO CARACCILO, D. CITTADINI, « Arch. Biochem. Biophys. », 107, 499 (1964).
- [9] A. CLEMENTI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 26, 391 (1950).
- [10] F. CEDRANGOLO, « Bioch. Appl. », 11, 33 (1964).
- [11] F. CEDRANGOLO, Conferenza tenuta presso l'Acc. Sc. Med. Chir. di Napoli il 19 febbraio 1964. « Mem. Acc. Sc. Med. Chir. », n. 2, 1964, Ed. Genovese, Napoli.
- [12] H. TAMIR, S. RATNER, « Arch. Biochem. Biophys. », 102, 249 (1963).
- [13] H. TAMIR, S. RATNER, « Arch. Biochem. Biophys. », 102, 259 (1963).
- [14] F. CEDRANGOLO, *Le transaminazioni*, relazione alle Giornate Biochimiche italo-franco-elvetiche di Napoli (Napoli 21-24 aprile 1954), atti del Congresso. Ed. C.N.R., Roma, p. 252.