

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Mainz

Zur Frage der Verwertung von N-acetylierten Aminosäuren in Infusionslösungen. Die Spaltung von N-Acetyltyrosin und N-Acetylcystein in Rattengewebe

Monika Neuhäuser, Brigitte Welsch und Barbara Bässler

(Eingegangen am 2. November 1981)

Einleitung

Aus Gründen der Löslichkeit enthalten manche Infusionslösungen zur parenteralen Ernährung die Aminosäuren L-Cystein und L-Tyrosin in Form ihrer N-Acetylderivate. Ob diese Derivate bei intravenöser Infusion ebenso gut utilisiert werden wie die freien Aminosäuren, ist unseres Wissens nicht systematisch untersucht worden. Aufgrund des seit einem Jahrhundert bekannten Vorkommens von Aminosäure-Acylasen in tierischen Geweben, besonders in der Niere (1), ist dies allerdings anzunehmen. Leider gibt es gerade zur Spaltung von N-Acetyl-L-cystein und N-Acetyl-L-tyrosin kaum Angaben in der Literatur. Wir untersuchten in dieser Arbeit die Spaltbarkeit von N-Acetyl-L-tyrosin durch Rattenniere, -leber und -muskulatur.

Methodik

Die Substrate N-Acetyl-L-tyrosin bzw. N-Acetyl-L-cystein wurden mit dem Überstand von Gewebshomogenaten (Cytosol-Fraktion) inkubiert. Nach verschiedenen Zeitabständen wurde die Reaktion gestoppt und das freigesetzte Tyrosin mittels Ninhydrinreaktion, das Cystein mit Trinitrobenzolsulfonsäure photometrisch bestimmt. Enzympräparation: Niere oder Leber wurden im Verhältnis 1 g ad 10 ml 0,15 mol/l KCl im *Potter-Elvehjem*-Homogenisator mit Teflonstempel homogenisiert. Das Homogenat wurde 60 min bei 100 000 × g zentrifugiert. Der Überstand (8-10 mg Protein pro ml) wurde zum Versuch eingesetzt. Muskelhomogenat wurde durch Verreiben mit Seesand in 0,15 mol/l KCl erhalten und entsprechend weiter verarbeitet.

Versuchsanfang in Zentrifugengläsern: 100 µl 0,5 mol/l Kaliumphosphatpuffer pH 7,1, 100 µl Enzympräparat, entsprechend 10 mg Gewebe, 250 µl N-Acetyl-L-tyrosinlösung oder N-Acetyl-L-cysteinlösung von 0,4 bis $10 \cdot 10^{-3}$ mol/l entsprechend einer Endkonzentration im Ansatz von 0,2 bis $5 \cdot 10^{-3}$ mol/l.

Die Ansätze wurden mit destilliertem Wasser auf 500 µl aufgefüllt. Diese Proben wurden im Wasserbad unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und die Reaktion nach 15, 30 und 60 min durch Zusatz von 500 µl 2 mol/l Perchlorsäure abgestoppt. Der

Leerwert wurde vor Zusatz des Enzympräparats mit Perchlorsäure versetzt. Nach Abzentrifugieren des Niederschlags wurde der Überstand zur Bestimmung der freigesetzten Aminosäure verwendet. Tyrosin: 100 μ l Überstand wurden mit 500 μ l Ninhydrinreagens nach *Moore* und *Stein* (2) versetzt. Die Proben wurden dann 20 min im kochenden Wasserbad gehalten und die Extinktion nach Zusatz von 2,5 ml Propanol/Wasser (1 Vol/2 Vol) bei 578 nm gegen Propanol/Wasser photometrisch gemessen.

Cystein: Nach Abstoppen mit Perchlorsäure wurde mit 1 ml 1 mol/l K_3PO_4 neutralisiert und Perchlorat ausgefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert, und 50 μ l Überstand wurden mit 950 μ l 0,2 mol/l Boratpuffer pH 8,0 und 500 μ l 0,67 g/1 2,4,6-Trinitrobenzolsulfinsäure in 0,2 mol/l Boratpuffer pH 8,0 versetzt und 30 min unter Schütteln im Wasserbad bei 50°C gehalten (3). Die Extinktion bei 436 nm wurde photometrisch gemessen.

Die Konzentrationen an Tyrosin bzw. Cystein wurden aus den Extinktionen durch Vergleich mit einem Tyrosin- bzw. Cystein-Standard berechnet.

Die Berechnung der Michaeliskonstante und der Maximalgeschwindigkeit erfolgte im Diagramm nach *Lineweaver-Burk* (4).

Ergebnisse

a) N-Acetyltyrosin:

Die Spaltung von N-Acetyltyrosin durch Nieren-Cytosol erfolgt linear im Zeitraum von 15 bis 30 min und proportional der Enzymkonzentration im Bereich von 5 bis 10 mg Protein pro Ansatz aus 10–20 mg Nierengewebe.

Als Michaelis-Konstante wird im Mittel gefunden $3,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l (siehe Abb. 1) mit einer Schwankungsbreite von $1,7$ bis $5 \cdot 10^{-4}$ mol/l. Die Maximalgeschwindigkeit beträgt im Mittel $4,4$ (4 bis 7) μ mole \cdot min $^{-1}$ \cdot g $^{-1}$ (Gramm ursprüngliches Nierengewebe). Dies bedeutet, daß eine Ratte mit 2 g Gesamt-Nierengewicht bei Halbsättigungskonzentration an N-Acetyltyrosin ($3,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l oder ca. 80 mg/l) im Durchschnitt 264 μ mole oder rund 60 mg N-Acetyltyrosin pro Stunde spalten könnte.

Die Aktivität von Leber lag bei knapp $1/10$ der Aktivität von Nieren-Cytosol, die Michaelis-Konstante im gleichen Bereich. In der Muskulatur fand sich keine meßbare Aktivität.

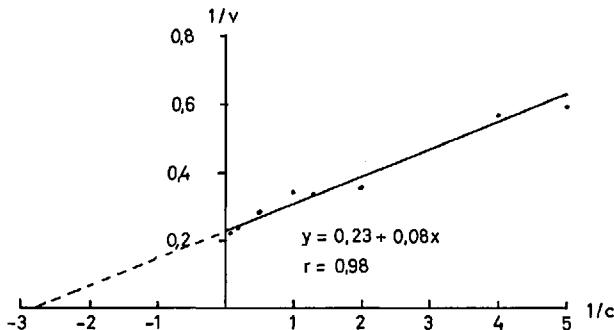


Abb. 1. Spaltung von N-Acetyltyrosin durch Nieren-Cytosol. Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. $v = \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$; $c = \text{mmol}/\text{Liter}$. Doppelt reziproke Auftragung nach *Lineweaver* und *Burk*. $K_m = 3,6 \cdot 10^{-4}$ mol/l; $V_{max} = 4,35 \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$.

Es scheint demnach so, daß die Nieren für den wesentlichen Anteil der Verwertung von N-Acetyltyrosin verantwortlich sind, obgleich die Leber wegen ihrer größeren Masse auch einen gewissen Beitrag leisten kann.

b) *N-Acetylcystein*:

Da Cystein schlecht über die Ninhydrinreaktion bestimmt werden kann, wurde das freigesetzte Cystein nach Reaktion mit Trinitrobenzolsulfosäure gemessen (3).

Die Michaelis-Konstante für die Spaltung von N-Acetylcystein durch Nieren-Cytosol beträgt im Mittel $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l, liegt also etwa eine Zehnerpotenz höher als für N-Acetyltyrosin (siehe Abb. 2). Die Maximalgeschwindigkeit beträgt im Mittel 19 (16 bis 25) $\mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$. Für die Spaltung von N-Acetylcystein durch Leber-Cytosol beträgt die Michaelis-Konstante $3,2 \cdot 10^{-3}$ mol/l (siehe Abb. 3) und die Maximalgeschwindigkeit $3,6 \mu\text{mole} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$, also etwa $\frac{1}{5}$ von der Aktivität der Niere, bezogen auf die Gewichtseinheit. Die Spaltung von N-Acetylcystein geht also rascher als die von N-Acetyltyrosin, aber erst bei höheren Substratkonzentrationen. Bei Halbsättigungskonzentration von $4,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l = 734 mg/l an N-Acetylcystein könnte eine Ratte mit 2 g Nierengewicht allein durch die Nieren 1140 μmole oder 186 mg N-Acetylcystein pro Stunde spalten. Zusätzlich kann die Leber (ca. 18 g bei $\frac{1}{5}$ der Aktivität der Niere) noch einmal das 1,8fache dieses Betrags spalten.

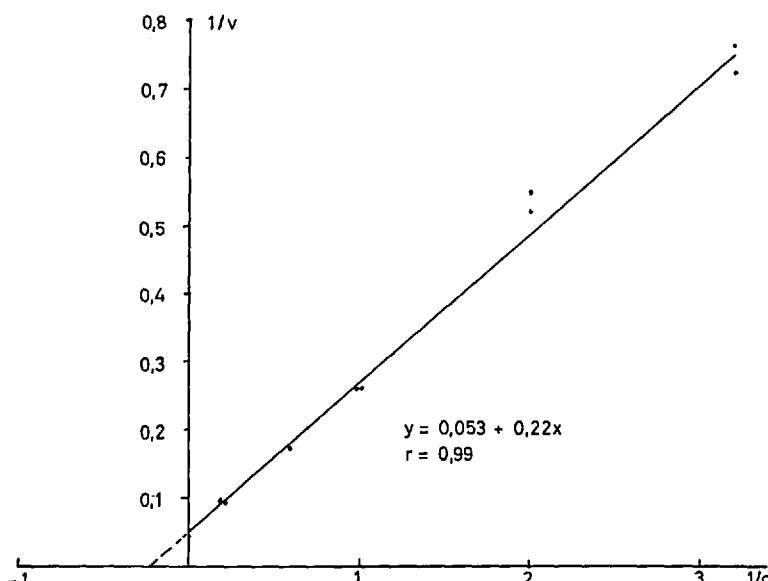


Abb. 2. Spaltung von N-Acetylcystein durch Nieren-Cytosol. Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. $v = \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{g}$ Feuchtgewicht; $c = \text{mmol}/\text{Liter}$. Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk. $K_m = 4,5 \cdot 10^{-3}$ mol/l; $V_{max} = 18,75 \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{g}$ Feuchtgewicht.

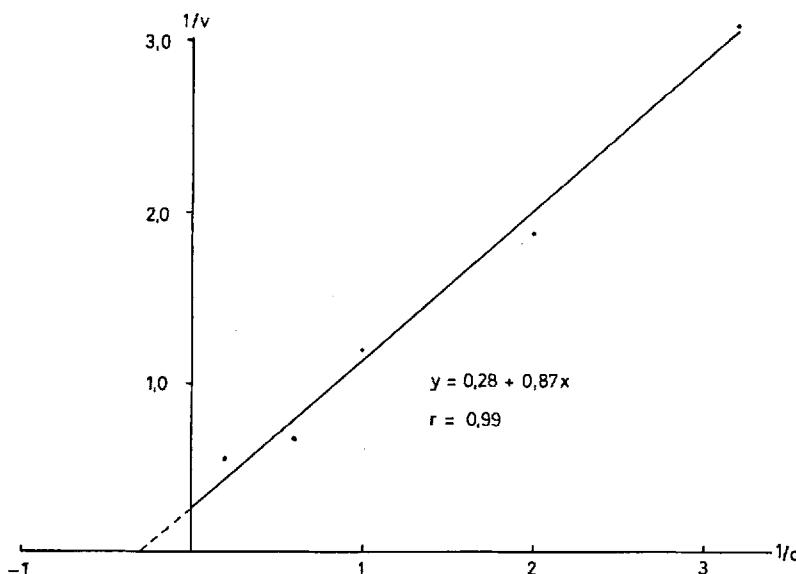


Abb. 3. Spaltung von N-Acetylcystein durch Leber-Cytosol. Abhängigkeit der Spaltungsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration. $v = \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$; $c = \text{mmol}/\text{Liter}$. Doppelt reziproke Auftragung nach Lineweaver und Burk. $K_m = 3,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol/l}$; $V_{max} = 3,6 \mu\text{mole}/\text{min} \cdot \text{g Feuchtgewicht}$.

Diskussion

In Säugetiergeweben sind verschiedene Acylasen beschrieben worden, die auf N-Acetylaminosäuren einwirken: Acylase I, EC 3.5.1.14., die auf verschiedene Substrate wirkt, aber nur mit sehr geringer Aktivität auf N-AcetylDerivate von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin (5,6,7); Acylase II oder Aspartoacylase, EC 3.5.1.15 (5,8,9); Acyllysin-Deacylase, EC 3.5.1.17 (10) und N-Acetyl- β -alanin-Deacylase, 3.4.1.21 (11). *Endo* (3, 12) hat darüber hinaus in Nierenextrakten eine Acylase III beschrieben, die auf die N-AcetylDerivate der aromatischen Aminosäuren wirkt. Wir haben keinen Versuch gemacht, unsere Aktivität einem dieser Enzyme zuzuordnen; es ist aber naheliegend, anzunehmen, daß es sich bei der Spaltung von N-Acetyltyrosin um die Acylase III von *Endo* handelt. Dafür spricht auch die gute Übereinstimmung der Michaelis-Konstanten: *Endo* $2,2 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$, unser Wert $3,6 \cdot 10^{-4} \text{ mol/l}$.

Alle Untersucher, die Aktivitäten in verschiedenen Geweben verglichen haben, fanden wesentlich geringere Acylaseaktivitäten in der Leber als in der Niere (3, 12, 13, 14).

Nach Angaben von *Reinauer* (15) wird N-Acetyltyrosin durch Acylase der proximalen Tubulusepithelien gespalten, und Tyrosin wird dann rückresorbiert. Bei Überlegungen über die Utilisierbarkeit von N-Acetyltyrosin aus Infusionslösungen muß also in Betracht gezogen werden, welche intrazellulären Konzentrationen und damit welche Spaltungs geschwindigkeit bei intravenöser Infusion erreicht wird; ferner muß über-

legt werden, ob eine ausreichende Verwertung auch bei Störungen der Rückresorption in der Niere möglich ist. Welcher der bisher beschriebenen Acylasen die Spaltung von *N*-Acetylcystein zugeschrieben werden muß, läßt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht ableiten. Verschiedene Beobachtungen sprechen aber dafür, daß *N*-Acetylcystein durch ein anderes Enzym gespalten wird als *N*-Acetyltyrosin. So erhielten wir gelegentlich Enzympräparate, die gegen *N*-Acetyltyrosin inaktiv, gegen *N*-Acetylcystein aber voll aktiv waren. Dieser Frage muß in gesonderten Untersuchungen nachgegangen werden.

Ein besonders gutes Substrat für Acylasen ist *N*-Acetylmethionin. Bei dieser Aminosäure ist nachgewiesen worden, daß sie im Fütterungsversuch Methionin ersetzen kann (16, 17). Das gleiche gilt für *N*-Acetyllysin (17). Für die aromatischen Aminosäuren oder Cystein liegen derartige Untersuchungen nicht vor. Nach den hier vorgelegten Befunden ist eine Verwertung von *N*-Acetyltyrosin und von *N*-Acetylcystein möglich. Zur endgültigen Klärung der Verhältnisse bei Patienten sind pharmakokinetische Messungen unter Berücksichtigung der renalen Ausscheidung sowohl der freien als auch der acetylierten Aminosäuren erforderlich.

Danksagung

Wir danken der Jacques-Pfriemer-Gedächtnisstiftung für die Unterstützung der Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

Zusammenfassung

N-Acetyl-L-tyrosin und *N*-Acetyl-L-cystein werden *in vitro* durch Enzympräparate aus Niere und Leber der Ratte gespalten. Wahrscheinlich handelt es sich um zwei verschiedene Acylasen. Michaelis-Konstanten und Aktivitäten werden angegeben. Niere enthält pro Gewichtseinheit wesentlich mehr Aktivität als Leber. In der Muskulatur wird keine meßbare Aktivität gefunden.

Summary

N-Acetyl-L-tyrosine and *N*-acetyl-L-cysteine are deacylated by enzyme preparations from kidney and liver *in vitro*. It is likely that this is caused by two different acylases. Michaelis constants and activities are shown. Kidney contains much more activity than liver per unit of weight. No activity can be detected in muscles.

Schlüsselwörter: *N*-Acetyl-L-tyrosin, *N*-Acetyl-L-cystein, Acylasen, Niere, Leber

Literatur

1. Schmiedeberg, O.: Arch. Exp. Pathol. Pharmakol. **14**, 379-392 (1881).
2. Moore, S., W. H. Stein: J. biol. Chem. **176**, 367-388 (1948).
3. Endo, Y.: Biochim. Biophys. Acta **523**, 207-214 (1978).
4. Lineweaver, H., D. Burk: J. Amer. Chem. Soc. **56**, 658 (1934).
5. Greenstein, J. P., M. Winitz: Chemistry of the Amino Acids, Vol. 2, p. 1753-1767. John Wiley (New York 1961).
6. Bruns, F. H., C. Schulze: Biochem. Z. **336**, 162-181 (1962).
7. Lorentz, K., J. Voss, B. Flatter: Clin. Chim. Acta **63**, 263-269 (1975).
8. D'Adamo, A. F., J. C. Smith, C. Woiler: J. Neurochem. **20**, 1275-1278 (1973).
9. Goldstein, F. B.: J. Neurochem. **36**, 45-49 (1976).
10. Paik, W. K., L. B. Frankenthal, S. M. Birnbaum, M. Winitz, J. P. Greenstein: Arch. Biochem. Biophys. **69**, 56-66 (1957).

11. Fujimoto, D., T. Koyama, N. Tamiya: *Biochim. Biophys. Acta* **167**, 407–413 (1968).
12. Endo, Y.: *Biochim. Biophys. Acta* **628**, 13–18 (1980).
13. Hanson, H., P. Hermann, W. Blech: *Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem.* **315**, 201–207 (1959).
14. Reglero, A., J. Rivas, J. Mendelson, R. Wallace, S. Grisolia: *FEBS Letters* **81**, 13–16 (1977).
15. Schwartz, H.-H., H. Reinauer: *Z. Ernährungswiss.* **18**, 149–159 (1979).
16. Boggs, R. W., J. T. Rotruck, R. A. Damico: *J. Nutr.* **105**, 326–330 (1975).
17. Boggs, R. W.: *Adv. Exp. Med. Biol.* **105**, 571–586 (1978).

Für die Verfasser:

Dr. Monika Neuhäuser, Physiologisch-chemisches Institut der Universität Mainz,
Saarstraße 21, D-6500 Mainz