

DE REACTIE VAN ALI-ESTERASE MET DIISOPROPYLFOSFOROFLUORIDAAT

(with a summary)

PROEFSCHRIFT

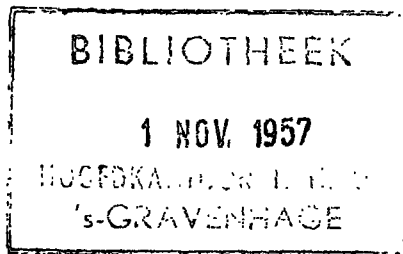
TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJSUNIVERSITEIT TE LEIDEN
OP GEZAG VAN DE RECTOR MAGNIFICUS
DR. S. E. DE JONGH, HOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER GENEESKUNDE,
PUBLIEK TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG
2 OCTOBER 1957 TE 14 UUR

DOOR

HENDRIK SIMON JANSZ

GEBOREN TE WONOSOBO (Indonesië)

in 1927



UITGEVERIJ EXCELSIOR - ORANJEPLEIN 96 - 'S-GRAVENHAGE

Promotor: Prof. Dr. J. A. Cohen

STELLINGEN

1. Bij het chromatografisch bepalen van de zuiverheid van synthetische peptiden verdient de kleurmethode van Reindel en Hoppe de voorkeur boven de gebruikelijke kleuring met ninhydrine.
F. Reindel en N. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).
W. Rittel, B. Iselin, K. Kappeler, B. Riniker en R. Schwijzer, Helv. Chim. Acta 40, 624 (1957).
2. Ten onrechte menen Wierzychowsky en Shugar dat de produkten die door bestraling (2537 Å) van cytosine en -derivaten ontstaan gevoelig zouden zijn voor dezelfde straling.
K. L. Wierzychowsky en D. Shugar, Bioch. Bioph. Acta 25, 355 (1957).
3. De bewering van Gutfreund en Sturtevant dat de ontleding van een geacyleerd enzym de reactiesnelheid van de door chymotrypsine gekatalyseerde estersplitsing bepaalt is aan bedenkingen onderhevig.
H. Gutfreund en J. M. Sturtevant, Bioch. J. 63, 656 (1956).
4. De gebogen basislijn die soms waargenomen wordt bij ultracentrifuge opnamen zou mede veroorzaakt kunnen worden door de deformatie die de cuvet t. g. v. de hydrostatische druk ondergaat.
5. Bij de bestudering van de kinetiek van de enzymatische esterhydrolyse in systemen waaraan alkanolen als oplosmiddel zijn toegevoegd wordt doorgaans, ten onrechte, geen rekening gehouden met transferase activiteit.
B. S. Hartley, Biochem. J. 64, 27^P (1956).
C. E. McDonnald en A. K. Balls, J. Biol. Ch. 221, 993 (1956).
6. Bij het affiltreren van onoplosbaar zwak-radioactief materiaal uit een vloeistof moet, indien bij de filtratie lucht door het filter gezogen wordt, rekening worden gehouden met de mogelijkheid van verontreiniging door natuurlijk of kunstmatig radioactief stof uit de atmosfeer.
Joh. Blok, dissertatie Vrije Universiteit, Amsterdam (1957).

7. Het door Dounce opgestelde schema voor de reactie van DFP en trypsine is in strijd met de experimentele feiten.
A. L. Dounce in A symposium on the structure of enzymes and proteins, *J. Cell. Comp. Physiol.* 47, 237 (1956).
8. De door Oosterbaan beschreven vorming van alanine bij hydrolyse van een diisopropylfosforylpeptide met barietoplossing verloopt waarschijnlijk via α -pyrrolidonderivaten.
R. A. Oosterbaan, dissertatie, Leiden (1956) p. 41.
J. P. Greenstein, *Arch. Bioch. Bioph.* 31, 83 (1951).
9. De theoretische beschouwingen en experimenten van Boissonas zijn niet een voldoende fundament voor zijn bewering dat het door hem verkregen produkt een cyclisch tripeptide is; het produkt zou zeer wel het cyclisch hexapeptide kunnen zijn.
R. A. Boissonas en I. Schumann, *Helv. Chim. Acta* 35, 2229 (1952).
J. C. Sheenan, M. Goodman en W. Richardson, *J. Am. Ch. S.* 77, 6391 (1955).

Aan mijn Ouders
Aan mijn Vrouw

INHOUD

GEBRUIKTE AFKORTINGEN	6
INLEIDING	7
Hoofdstuk I. ZUIVERING VAN ALI-ESTERASE	11
Hoofdstuk II. REMMING VAN ALI-ESTERASE DOOR DFP	16
Hoofdstuk III. VERBAND TUSSEN HET ACTIEVE CENTRUM EN DE DFP-BINDENDE GROEP VAN ALI- ESTERASE	18
Hoofdstuk IV. ONDERZOEK OVER DE STRUCTUUR VAN DE DFP-BINDENDE GROEP VAN ALI-ESTERASE	21
Hoofdstuk V. MATERIALEN EN METHODEN	45
ALGEMENE BESPREKING VAN DE RESULTATEN	51
SUMMARY	55
LITERATUUR	58
NAWOORD	60

GEBRUIKTE AFKORTINGEN

- MBL = Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigings
Organisatie T. N. O.
- DFP = Diisopropylfosforofluoridaat $[(\text{CH}_3)_2\text{CHO}]_2 \text{P}(\text{O})\text{F}$
- BAW = Butanol-Azijnzuur-Water
- BW = Butanol-Water
- DIP = Diisopropylfosfaat
- DP- = Diisopropylfosforyl
- DNFB = 2,4-dinitrofluorobenzeen
- DNP- = Dinitrofenyl
- PTC- = Fenylthiocarbamyl
- PTH = Fenylthiohydantoïne
- HMB = Heptaan-Mierenzuur-Butanol
- E = Eenheden enzymactiviteit
- R/mgN= Eenheden per mg eiwit-stikstof

INLEIDING

Het in dit proefschrift beschreven werk maakt deel uit van een onderzoek, dat in het Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie T.N.O. (M.B.L.) verricht werd over het werkingsmechanisme van esterasen, een groep eiwitten die katalytisch de hydrolyse van esters versnellen. In eerste aanleg had dit onderzoek ten doel inzicht te verkrijgen in de chemische structuur van de groepen waarop in diverse esterasen de katalytische werking plaats vindt m.a.w. in de structuur van het actieve centrum van deze enzymen. Deze voorstelling van zaken is gebaseerd op de algemeen aanvaarde hypothese, dat bij functioneren van een enzym de binding, activering en splitsing van het substraat zich afspelen op een bepaalde plaats van het enzymoppervlak, het z.g. actieve centrum (1). De huidige kennis is onvoldoende om te kunnen beoordelen of dit actieve centrum ook in staat is zelfstandig d.w.z. zonder interactie met de rest van het enzymmolecuul de volledige estersplitsing tot stand te brengen.

Uit de literatuur is bekend dat sommige groepen en bindingen in het molecuul van een enzym niet essentieel, andere daarentegen zeer belangrijk zijn voor de enzymwerking. Zo kunnen met chemische reagentia bepaalde groepen in het molecuul van een enzym geblokkeerd worden zonder dat de enzymactiviteit beïnvloed wordt (zie de overzichten van Olcott en Fraenkel-Conrat (2) en Putnam (3)). Bij sommige enzymen is zelfs een groot deel van de aminozuren niet essentieel voor de enzymwerking. Ter illustratie zij een enkel voorbeeld uit de recente literatuur genoemd: Kalman, Ottesen, Linderstrøm-Lang en Richards (4) enerzijds en Rogers en Kalnitsky (5) anderzijds konden met behulp van de exopeptidasen een groot deel van de aminozuren van ribonuclease verwijderen; de activiteit van het verkorte en van het oorspronkelijke enzym waren gelijk.

Tot nu toe hebben dergelijke resultaten niet een direct inzicht gegeven in het mechanisme van de enzymwerking. De identificatie van die groepen waarvan de blokkering door chemische reagentia verlies van de enzymactiviteit tengevolge heeft, heeft daarentegen reeds gegevens over de structuur van het actieve centrum geleverd. Uiteraard moet de blokkade van de essentiële groepen de enige oorzaak zijn van het verdwijnen van de enzymactiviteit. Secundaire effecten zoals denaturatie van het enzym mogen bij deze reactie niet optreden en de blokkerende groep zal relatief klein moeten zijn daar anders het effect door sterische hindering zou kunnen worden veroorzaakt. Een interpretatie van de resultaten wordt voorts pas mogelijk indien het reagens zeer specifiek is zodat slechts een enkele groep geblokkeerd wordt.

In dit verband is de remming van esterasen door diisopropylfosforofluoridaat (DFP) belangwekkend. Van een groot aantal onderzochte eiwitten reageren alleen esterasen met DFP in lage concentraties, hetgeen gepaard gaat met het verdwijnen van de enzymactiviteit. Door Balls en Jansen (6) werd de remming van chymotrypsine en trypsine, enzymen met o. a. esteraseactiviteit, onderzocht. Zij konden aantonen dat de remming van deze enzymen door DFP berust op invoering van een diisopropylfosforylgroep (DP-groep) in het enzym, waarbij HF vrijkomt. Bij een volledige remming is één DP-groep per enzymmolecuul gebonden. Men neemt aan dat de reactie van andere esterasen met DFP volgens eenzelfde mechanisme verloopt. Wilson en Ginsburg (7) en later ook Davies en Green (8) vonden, dat de enzymactiviteit terugkeert na verwijderen van de blokkerende DP-groep waarmee werd aangetoond dat denaturatie tijdens de reactie van esterasen met DFP niet plaats vindt. Uit het voorgaande volgt, dat er redenen zijn om te veronderstellen dat de groep van een esterase die met DFP reageert een essentieel onderdeel van het actieve centrum vormt. Bovendien is gebleken dat esterasen door hun substraat of door substraatanalogen beschermd kunnen worden tegen de reactie met DFP, hetgeen wijst op de identiteit van de substraat- en DFP-bindende groep (9).

Verschillende onderzoekers hebben getracht gegevens te verkrijgen over de structuur van de DFP-bindende groepen van esterasen. Bij het desbetreffende onderzoek in het M. B. L. (10) werd analytisch-chemisch te werk gegaan. Daarbij werd het te onderzoeken esterase met radioactief gemerkt $DF^{32}P$ geremd. Daarna werd de aldus door radioactiviteit gekenmerkte groep van het esterase structureel onderzocht. Het DP-esterase werd daartoe met behulp van proteolytische enzymen afgebroken; bij de afbraak ontstaan naast andere produkten peptiden waaraan de DP-groep gebonden is (DP-peptiden). Indien men aanneemt dat de DP-peptiden die groep van de esterasen bevatten, die met DFP gereageerd heeft, dan zal structuuronderzoek van deze DP-peptiden gegevens verschaffen over deze groep en dus over het actieve centrum.

Terwijl deze onderzoeken aan de gang waren verscheen een publikatie van Schaffer, May en Summerson (11) waarin werd aangetoond dat uit een met zoutzuur gehydrolyseerd $D^{32}P$ -chymotrypsine radioactief gemerkt O-serinefosfaat geïsoleerd kon worden. Cohen, Oosterbaan en Warringa (12) zetten dit onderzoek voort met andere esterasen. Het was verrassend dat uit alle (zeven) tot nu toe onderzochte DP-esterasen O-serinefosfaat kon worden geïsoleerd.

Bij voortzetting van het onderzoek van de DP-peptiden bleek dat door proteolyse van met DFP geremde chymotrypsine, al-esterase en trypsine DP-peptiden werden verkregen die na zuivering voorlopig werden geanalyseerd. Uit deze inmiddels gepubliceerde onderzoeken (13) bleek, dat de overeenkomst in aminozuursamenstelling van deze DP-peptiden, die alle serine bevat-

ten, groot was *. Deze gelijkenis doet vermoeden dat de reactie van verschillende esterasen met DFP plaats vindt door middel van eenzelfde chemische structuur.

Oosterbaan (14) kon vervolgens de aminozuurvolgorde van een DP-peptide van DP-chymotrypsine volledig ophelderen, terwijl aanwijzingen werden verkregen dat de DP-groep door middel van het P-atoom in de hydroxylgroep van serine gesubstitueerd was. Schaffer, Simet, Harshman, Engle en Drisko (15) konden dezelfde aminozuurvolgorde in de onmiddellijke omgeving van het P-atoom van DP-chymotrypsine aantonen.

In dit proefschrift worden de resultaten beschreven van een structuuronderzoek van de DFP-bindende groep van ali-esterase uit paardelever. De voor dit onderzoek benodigde enzympreparaten werden volgens een uit de literatuur (16) bekend voorschrift gemaakt. Gepoogd werd een zuiver enzym te bereiden opdat hiervan enige fysische constanten waaronder het moleculaire gewicht zouden kunnen worden bepaald. Deze nog niet afgesloten onderzoekingen zijn beschreven in Hoofdstuk I.

Bournsnel en Webb (17) hebben aangetoond dat de remming van ali-esterase door DFP gepaard gaat met binding van P aan het enzym. Wij konden dit bevestigen en bovendien aantonen dat de DP-groep in het enzym ingevoerd wordt. Dit kan als aanwijzing worden beschouwd dat de reactie van DFP met ali-esterase analoog verloopt aan die met chymotrypsine en trypsine. In verband hiermee was het van belang na te gaan of ook de reactie van ali-esterase met DFP equimoleculair is. Uit de hoeveelheid aan eiwit gebonden P kon de hoeveelheid eiwit (in grammen) per g atoom P berekend worden (Hoofdstuk II). De voor ons zuiverste enzympreparaat berekende verhouding was zeker niet groter dan de uit de literatuur bekende waarde. Hoewel dit getal als maat voor de relatieve zuiverheid van ons enzympreparaat betekenis heeft, kon hieruit het aantal DP-groepen per molecuul ali-esterase niet berekend worden bij gebrek aan onafhankelijke gegevens over het moleculaire gewicht van dit enzym. Uit andere resultaten blijkt evenwel dat het zeer waarschijnlijk is dat slechts één bepaalde structuur met DFP reageert.

De in Hoofdstuk III beschreven experimenten betreffen de beschermende werking van enzymsubstraten tegen de reactie met DFP en de omkeerbaarheid van de DFP-remming. Een correlatie tussen de afsplitsing van de DP-groep van DP-ali-esterase en het herstel van de enzymactiviteit kon worden aangetoond. De in dit Hoofdstuk vermelde resultaten bevestigen de juistheid van de veronderstelling dat de DFP-bindende groep een essentieel onderdeel vormt van het actieve centrum van ali-esterase.

Tenslotte worden in Hoofdstuk IV de resultaten van een structuuronderzoek van de DFP-bindende groep van ali-esterase beschreven. Dit onderzoek werd volgens de bovenomschreven ana-

* Fosfopeptiden uit fosfoglucomutase bevatten ook deze aminozuren. (Koshland, J. Am. Ch. S. 79, 2657, 1957).

lytisch-chemische methode uitgevoerd. Aanvankelijk werd voor de bereiding van een DP-peptide uit DP-ali-esterase gebruik gemaakt van een mengsel van proteolytische enzymen uit de pancreas (cotazym). De aminozuursamenstelling van dit DP-peptide kon kwalitatief worden bepaald. Het verdere structuuronderzoek werd verricht met een DP-peptide dat uit DP-ali-esterase met pepsine verkregen werd. De volledige structuur van dit peptide kon worden bepaald. De met dit onderzoek verkregen gegevens over de DFP-bindende groep van ali-esterase, de informatie die uit dit onderzoek voortvloeit over de structuur van het actieve centrum en de relatie tot overeenkomstige structuren in andere esterasen worden in de Algemene Bespreking van de Resultaten uitvoerig besproken.

Hoofdstuk I.

ZUIVERING VAN ALI-ESTERASE

Voor de zuivering van ali-esterase uit paardelever komen twee uit de literatuur bekende methoden in aanmerking. Connors, Pihl, Dounce en Stotz (16) bereidden uit verse paardelever een „acetonpoeder”. Uit een waterig extract van dit poeder werd na verschillende bewerkingen een ali-esterasepreparaat verkregen, waarvan de zuiverheid door middel van „boundary”-elektroforese bij pH 7,4 werd onderzocht. Het beste preparaat bevatte een viertal componenten; de hoofdcomponent, die 70% van het eiwit vertegenwoordigde, bezat de enzymactiviteit. Het door Burch (18) langs enigszins andere weg bereide ali-esterasepreparaat was weliswaar elektroforetisch (pH 7,5) homogeen, doch de specifieke activiteit bedroeg slechts 43% van het preparaat van Connors et al.

Wij volgden voor de zuivering van ali-esterase steeds de methode van Connors et al., omdat volgens deze methode blijkbaar preparaten met een hogere specifieke activiteit kunnen worden bereid dan volgens de methode van Burch. Het bleek, dat de resultaten sterk afhankelijk waren van de specifieke activiteit van de acetonpoeders. Doorgaans werden poeders verkregen die een belangrijk lagere specifieke activiteit hadden dan die, welke Connors et al. gebruikten.

Wij konden enige wijzigingen in de oorspronkelijke methode aanbrengen die tot gevolg hadden, dat ook uit acetonpoeders met lage specifieke activiteit betrekkelijk zuivere ali-esterasepreparaten verkregen werden. Deze preparaten konden met behulp van elektroforese op preparatieve schaal verder worden gezuiverd.

Het bij de aanvang van dit onderzoek gestelde doel, een zuiver ali-esterase te bereiden en daarvan enige fysische grootheden, zoals het moleculaire gewicht, te bepalen werd niet bereikt. Tot nu toe werd niet meer dan een enkel preparaat in de ultracentrifuge op homogeniteit onderzocht.

EXPERIMENTEN

De methode van zuivering van ali-esterase is in het kort samengevat in Tabel I, waarin de verschillende stappen van de zuivering zijn genoemd. Voor een uitvoerige beschrijving van de methode zij verwezen naar het oorspronkelijke voorschrift (16). Een representatief resultaat van de zuivering van een ali-esterasepreparaat, waarbij werd uitgegaan van een acetonpoeder van hoge specifieke activiteit, is in kolom 2 van Tabel I weergegeven.

Tabel I
De zuivering van ali-esterase

	1		2		3	
	E	E/mg N	E	E/mg N	E	E/mg N
Acetonpoeder (100 g)	10580	0,7	10000	0,7	3500	0,25
H ₂ O-extract	5543	2,2	9900	2,2	3200	1,2
(NH ₄) ₂ SO ₄ -precipitatie	4275	6,0	5500	6,3	1650	3,0
Hitte-denaturatie	3225	11,9	4000	15,0	930	4,2
Aceton-fract. (25-45%)	1860	28,7	3500	27,5	-	-
Aceton-fract. (35-40%)	-	-	-	-	630	26
Cu-acetaat-precipitatie	735	72,1	-	-	250	53
Dialyse	591	193,9	-	-	200	60
Elektroforese pH 8,6	-	-	-	-	100	110

1 = De resultaten van Connors et al. (16).

2 = Zuivering van ali-esterase uitgaande van acetonpoeder met hoge specifieke activiteit.

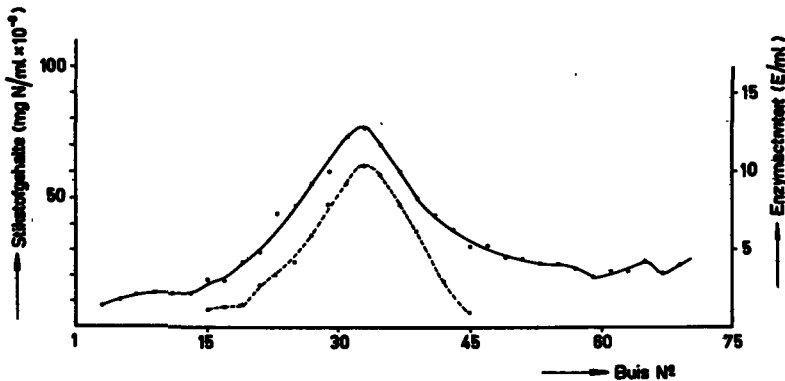
3 = Zuivering van ali-esterase volgens een gewijzigde methode.

In de verschillende stadia van de zuivering werden steeds de enzymactiviteit en de specifieke activiteit van de preparaten bepaald. De enzymactiviteit werd uitgedrukt in eenheden (E), bepaald en gedefinieerd zoals dit in Hoofdstuk V beschreven is. Onder de specifieke activiteit wordt verstaan het aantal eenheden per mg eiwit-stikstof (E/mg N). In kolom 1 van Tabel I zijn ter vergelijking de resultaten van Connors et al. opgenomen. De door hen opgegeven getallen voor enzymactiviteit en specifieke activiteit, die op andere wijze werden bepaald en gedefinieerd, zijn omgerekend in onze grootheden (Hoofdstuk V).

De wijzigingen die wij in de oorspronkelijke methode aanbrachten waren de volgende. De acetonfractionering, die in het oorspronkelijke voorschrift tussen 25 en 45% aceton wordt uitgevoerd, werd vervangen door een fractionering tussen 35 en 40%. Tevens werd de precipitatie met koperacetaat gewijzigd. In het oorspronkelijke voorschrift wordt het preparaat na de acetonfractionering geroerd met gepoederd koperacetaat. Een gedeelte van het eiwit slaat daarbij neer op de koperacetaatkristallen. Voor een verdere zuivering wordt het preparaat na centrifugeren gedialyseerd. Wij verkregen beter reproduceerbare resultaten indien het preparaat na acetonfractionering eerst werd gedialyseerd en daarna pas met koperacetaat werd gefractioneerd. Daartoe werd aan de gedialyseerde oplossing druppelsgewijs bij 0° C 0,5 ml van een oplossing van koperacetaat (1,7%) onder roeren toegevoegd. De pH die door het toevoegen van koperacetaat daalde, werd vervolgens op 7,0 gebracht, waarna de oplossing na centrifugeren in de koude werd gedialyseerd. Na 20 uur dialyse werd

het volume van de oplossing teruggebracht tot 10 ml waarna weer grondig werd gedialyseerd. Aldus werd een heldere oplossing verkregen van een enzympreparaat met een specifieke activiteit van 50 - 90 E/mg N.

De zuivering van deze preparaten werd met elektroforese voortgezet. Daartoe werd gebruik gemaakt van kolom-zone-elektroforese met cellulose als drager volgens de methode die door Porath (19) is aangegeven. Het volume van de ali-esterase-oplossing werd daartoe teruggebracht tot 3 ml en de oplossing door dialyse geëquilibreerd met 0,05 M veronalbuffer van pH 8,6. Daarna werd de oplossing op een van tevoren met buffer geëquilibreerde kolom van 30 x 2,6 cm gebracht, waarna gedurende 48 uur een spanning van 600 V over de kolom werd aangelegd (stroomsterkte 30 mA). De kolom was voorzien van een koelmantel, die doorstroomd werd met water van 0 - 20°C. Na afloop van de elektroforese werd de kolom geëluëerd met buffer, waarbij fracties van 1 ml werden opgevangen. In de fracties werd het eiwitgehalte volgens Lowry (20) en de enzymactiviteit met de in Hoofdstuk V beschreven titratiemethode bepaald. Een representatief resultaat van een aldus uitgevoerde elektroforese is weergegeven in Fig. 1. De fracties met enzymactiviteit werden verzameld en hadden een totale activiteit van 100 E en een specifieke activiteit van 110 E/mg N. De resultaten van de zuivering zijn samengevat in kolom 3 van Tabel I.

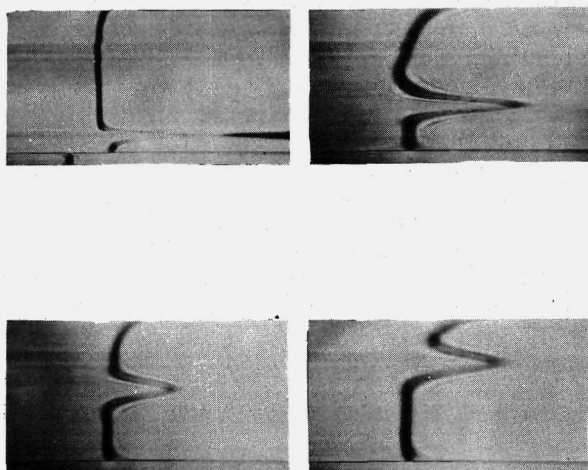


Figuur 1
Kolom-zone-elektroforese van ali-esterase (pH 8,6). Verdeling van de enzymactiviteit in ml (-----) en van stikstof in mg N/ml x 10⁻³ (—) in de fracties verkregen na elutie van de kolom.

Enkele ali-esterasepreparaten werden met behulp van een analytische ultracentrifuge (Phywe) op homogeniteit onderzocht. In Fig. 2 zijn enkele opnamen weergegeven die aantonen dat het preparaat zich ten opzichte van zwaartevelden homogeen gedraagt. Het ali-esterase was opgelost in een fosfaatbuffer van pH 7,5 (ionic strength 0,2). De concentratie bedroeg 3,3 mg eiwit per ml. Het toerental was 50.000 omwentelingen/min. (183000 g in het midden van de cuvet).

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Hoewel de met zone-elektroforese en ultracentrifuge bereikte resultaten wat betreft de zuiverheid van het ali-esterasepreparaat bemoedigend zijn, mag op grond van deze enkele experimenten zeker niet geconcludeerd worden dat het preparaat homogeen is. Uit het feit, dat de specifieke activiteit van ons preparaat lager is dan die van het preparaat van Connors et al. (16) blijkt dat verdere zuivering mogelijk moet zijn. In dit verband zij echter gewezen op de resultaten van Burch (18). Het door haar verkregen preparaat was in tegenstelling tot dat van Connors et al. homogeen, doch de specifieke activiteit was veel lager.



Figuur 2

Ultracentrifuge-opnamen van ali-esterase.

De opnamen werden gemaakt 37, 63, 86 en 109 minuten na het begin van de proef.

De Philpot-hoeken bedroegen bij deze opnamen 22,5, 57,5, 51,0 en 61,5°.

Hoofdstuk II

REMMING VAN ALI-ESTERASE DOOR DFP

Uit de literatuur (21) is bekend dat ali-esterase uit paardelever wordt geremd door DFP in lage concentraties. Bournsnel en Webb (17) konden met radioactief $DF^{32}P$ aantonen dat bij de remming fosfor aan het enzym gebonden wordt. Het door verhitten gedena-tureerde ali-esterase was daarentegen niet in staat DFP te bin-den. De remming was irreversibel; ook na grondige dialyse bleef het P aan het enzym gebonden en bleef het enzym geremd. Ook berekenden Bournsnel en Webb een maximaal „moleculair gewicht” van 125.000 uit de hoeveelheid aan eiwit gebonden P en de hoe-veelheid eiwit van een gezuiverd ali-esterasepreparaat dat behan-deld was met $DF^{32}P$. Zij gingen hierbij uit van de veronderstel-ling dat per molecuul ali-esterase niet meer dan 1 atoom P ge-bonden wordt.

EXPERIMENTEN

Een hoeveelheid ali-esterase van 32 E in een volume van 4 ml met een specifieke activiteit van 110 E/mg N werd bij pH 7,0 ge-incubeerd met $DF^{32}P$ in een concentratie van $1,25 \times 10^{-2}$ $\mu\text{mol/ml}$. Het preparaat was na de incubatie volledig geremd. Vervolgens werd de oplossing tegen water gedialyseerd tot de hoeveelheid ^{32}P binnen de dialysehuls constant geworden was. Gevonden werd dat aan het preparaat 0,018 μmol P gebonden was. De hoeveelheid eiwit-stikstof van het preparaat werd bepaald, zoals in Hoofdstuk V is aangegeven. Deze bedroeg 300 μg , waaruit de hoeveelheid eiwit berekend kon worden als 2010 μg ($N \times 6,7$). Uit deze gegevens volgt dat de hoeveelheid eiwit per g atoom P $1,1 \times 10^5$ gram be-draagt. Door de gemeten enzymactiviteit van dit preparaat te be-trekken op de gebonden hoeveelheid P kon een turnover getal van 18×10^3 berekend worden. Het turnover getal werd daarbij gede-finieerd als het aantal moleculen substraat, dat door het enzym per minuut gehydrolyseerd wordt per gewichtsequivalent enzym dat 1 atoom P kan binden bij volledige remming.

Het met DFP gerede ali-esterase werd vervolgens op pH 12 (NaOH) gebracht. De oplossing werd gedurende 5 minuten bij 100°C verhit, waardoor het P volledig van het enzym werd afgesplitst. Het afgesplitste product kon worden geïdentificeerd als diisopro-pylfosfaat. Bij de identificatie hiervan werd gebruik gemaakt van papierchromatografie (BAW en Fenol- NH_3) en van papierelektroforese (2500 V, pH 3,6 gedurende 30 minuten) (zie Hoofdstuk V).

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

De remming van ali-esterase door DFP gaat gepaard met het binden van één of mogelijk meer diisopropylfosforyl-groepen aan het enzym. De kleine hoeveelheid P, die per gram eiwit van een sterk gezuiverd ali-esterasepreparaat gebonden is na reactie met DFP suggereert dat deze reactie zeer specifiek is. Het bepaalde maximale „moleculaire gewicht” van ali-esterase (110.000) is in overeenstemming met de door Bournsnel en Webb (17) bepaalde waarde.

Hoofdstuk III

VERBAND TUSSEN HET ACTIEVE CENTRUM EN DE
DFP-BINDEnde GROEP VAN ALI-ESTERASE

Indien de groep van ali-esterase die met DFP reageert dezelfde is als of een essentieel onderdeel vormt van het actieve centrum, dan mag verwacht worden dat de remming door DFP de kenmerken van een competitieve remming zal vertonen. De mogelijkheid om de actieve groep met het substraat te blokkeren voordat de irreversibele remmer DFP de gelegenheid krijgt zich met dezelfde groep te binden, zal groter zijn naarmate de verhouding van de affiniteiten van substraat en remmer voor het enzym groter is. Uit een onderzoek in het M. B. L. is gebleken, dat pyrodruivenzuren esters substraten voor ali-esterase zijn. Deze substraten hebben een bijzonder grote affiniteit voor het enzym (22). Met de butylester van pyrodruivenzuur werd de aard van de remming door DFP onderzocht.

Een ander belangrijk argument voor een relatie tussen de DFP-bindende groep en het actieve centrum van ali-esterase betreft de omkeerbaarheid van de remming. Uit de literatuur was bekend, dat met DFP geremde esterasen te reactiveren zijn met nucleofiele reagentia. Zo konden Davies en Green (8) een aantal met DFP geremde esterasen reactiveren met isonitrosoaceton. De reactivatie van DP-ali-esterase met isonitrosoaceton werd bestudeerd.

EXPERIMENTEN

1. *Aard van de remming*

Een hoeveelheid ali-esterase van 11,4 E in een volume van 11 ml met een specifieke activiteit van 90 E/mg N werd gedurende 5 minuten bij 25° C geïncubeerd met butylpyruvaat in een concentratie van 1% (v/v). Daarna werd de oplossing gedurende 20 minuten bij 25° C met 0,18 μmol DF³²P geïncubeerd. Deze hoeveelheid DFP is voldoende om een tienvoudige hoeveelheid van het enzym bij afwezigheid van substraat volledig te remmen. De pH werd gedurende het experiment op 6,0 gehouden. De oplossing werd vervolgens tegen een oplossing van butylpyruvaat (0,5%) gedialyseerd. Daarna werd door grondige dialyse tegen water het substraat verwijderd. De enzymactiviteit van het gedialyseerde preparaat bedroeg 7,8 E. Het preparaat had totaal $0,24 \times 10^{-2}$ μmol P gebonden. Eenzelfde preparaat werd op overeenkomstige wijze met DF³²P geremd, ditmaal zonder toevoeging van pyru-

vaat. Na grondige dialyse kon worden bepaald, dat dit preparaat $0,60 \times 10^{-2}$ $\mu\text{mol P}$ gebonden had. Hieruit volgt dat het preparaat voor 60% beschermd was tegen DFP door het substraat. Deze uitkomst stemt redelijk goed overeen met de op grond van de resterende enzymactiviteit berekende bescherming van 68%.

2. Omkeerbaarheid van de remming

Het DP-esterasepreparaat werd door incubatie met $\text{DF}^{32\text{P}}$ bereid volgens het voorschrift dat in Hoofdstuk IV. gegeven is. Direct na de incubatie met DFP werd 5 ml van de oplossing bij 20°C geïncubeerd met 0,1 M isonitrosoaceton. De pH werd op 8,0 gebracht en gedurende het experiment constant gehouden. Tevens werd 5 ml van een niet met DFP behandelde ali-esterase-oplossing onder dezelfde omstandigheden met isonitrosoaceton geïncubeerd (blanco). De enzymactiviteit van beide oplossingen werd van tijd tot tijd bepaald. Het experiment werd eveneens verricht met DP-ali-esterasepreparaten die na de bereiding gedurende 24 en 48 uur bij kamertemperatuur bewaard waren. De uitkomsten van de bepalingen zijn samengevat in Tabel II. Uit de gegevens van deze Tabel blijkt dat de preparaten met isonitrosoaceton kunnen worden gereactiveerd.

Tabel II
Reactivatie van DP-ali-esterase door isonitrosoaceton

Incubatietijd met 0,1 M isonitrosoaceton (dagen)	Reactivatie *)		
1	22	22	20
3	50	50	42
5	50	60	55

*) De enzymactiviteit werd uitgedrukt als percentage van de activiteit van een blanco preparaat. De drie getallen hebben betrekking op preparaten die 20 minuten, 24 uur resp. 48 uur oud waren.

Vervolgens werd een DP-ali-esterasepreparaat dat door dialyse van de overmaat DFP bevrijd was (Hoofdstuk IV) op overeenkomstige wijze met 0,2 M isonitrosoaceton behandeld. Na deze behandeling werd zowel de enzymactiviteit als de hoeveelheid afgesplitst diisopropylfosfaat (DIP) bepaald. Daartoe werden monsters van het incubatiemengsel gechromatografeerd in BAW. Na lokalisatie van de radioactiviteit op het chromatogram kon de hoeveelheid DIP (Rf 0,88) en de hoeveelheid DP-ali-esterase (op de start van het chromatogram) t. o. v. de op het chromatogram gebrachte hoeveelheid P worden berekend. Gevonden werd dat na twee dagen incuberen met isonitrosoaceton de reactivatie 40% bedroeg terwijl eveneens 40% DIP was afgesplitst. Na 4 dagen be-

droegen deze waarden 60 resp. 58%. Hieruit blijkt dat herstel van enzymactiviteit en afsplitsen van de DP-groep parallel verlopen.

3. *Denaturatie van de DP-ali-esterase*

Gedenatureerd DP-ali-esterase kon zoals te verwachten was, niet meer met isonitrosoaceton gereactiveerd worden. Het afsplitsen van de DP-groep bleef eveneens achterwege. Op drie verschillende manieren werd de denaturatie tot stand gebracht nl. door behandeling met zuur (pH 1,5 gedurende 30 minuten), verhitten (5 minuten bij 100° C) en behandeling met ureum (incubatie met 8,0 M ureum waarna het ureum door dialyse weer werd verwijderd). Deze gedenatureerde preparaten werden met 0,2 M isonitrosoaceton geïncubeerd zoals boven beschreven is. Na 4 x 24 uur was geen afsplitsen van de DP-groep waar te nemen (chromatografisch in BAW bepaald).

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

De bescherming van ali-esterase tegen reactie met DFP door het substraat suggereert dat de groep die met DFP reageert een essentieel onderdeel van het actieve centrum vormt. Ook het feit dat de afsplitsing van de DP-groep van het met DFP geremde esterase gepaard gaat met terugkeer van de enzymactiviteit, is een sterke aanwijzing dat de door DFP geblokkeerde groep van ali-esterase essentieel is voor de enzymwerking.

In tegenstelling tot hetgeen bekend is bij andere DP-esterasen treedt bij DP-ali-esterase geen veroudering op. Uit de literatuur is bekend (23) dat DP-esterasen doorgaans na korte tijd bewaren niet meer te reactiveren zijn (verouderen). Er wordt wel aangenomen, dat de veroudering veroorzaakt wordt doordat de DP-groep van zijn oorspronkelijk aangrijpingspunt verplaatst (23, 24). Terwijl bij andere DP-esterasen de mogelijkheid tot afsplitsen van de DP-groep verdwijnt bij het bewaren van deze preparaten, blijkt dat bij ali-esterase dit verschijnsel bij denaturatie optreedt. Deze stabilisatie zou men ook hier kunnen toeschrijven aan een verplaatsen van de DP-groep, maar aantrekkelijker lijkt de verklaring dat tengevolge van een vormverandering van het eiwitmolecuul, groepen die voor de reactivatie van belang zijn uit de omgeving van de DP-groep verwijderd worden.

Hoofdstuk IV

ONDERZOEK OVER DE STRUCTUUR VAN DE DFP-BINDENDE GROEP VAN ALI-ESTERASE

In het voorgaande werd uiteengezet dat er redenen zijn om te veronderstellen, dat de groep van ali-esterase die met de specifieke esterase-remmer DFP reageert een essentieel onderdeel van het actieve centrum van dit enzym vormt. Gegevens over de structuur van de DFP-bindende groep zullen dus ook een inzicht in het actieve centrum kunnen verschaffen.

In dit hoofdstuk worden de resultaten van een dergelijk structuuronderzoek beschreven, dat volgens een in het M. B. L. ontwikkelde analytisch-chemische methode werd uitgevoerd (10). Ali-esterase werd daarbij met radioactief gemerkt diisopropylfosforofluoridaat ($DF^{32}P$) geremd. De in het enzym geïntroduceerde DP-groep kenmerkt de groep van het enzym die met DFP gereageerd heeft door radioactiviteit. Vervolgens werd het DP-ali-esterase met proteolytische enzymen afgebroken, waarbij radioactief gemerkte fragmenten ontstonden, waarvan enkele na zuivering konden worden geïdentificeerd als peptiden waaraan de DP-groep gebonden was (DP-peptiden).

Aanvankelijk werd bij de proteolyse gebruik gemaakt van cotazym. Hiermee werd een hydrolysaat verkregen dat naast een aantal radioactieve peptiden en andere radioactieve producten hoofdzakelijk aminozuren bevatte. Het in kwantitatief opzicht belangrijkste peptide kon, daar het een scheiding van een peptide en aminozuren betrof, vrij gemakkelijk worden geïsoleerd. Voorts kon de aminozuursamenstelling kwalitatief worden bepaald. Het was echter onbevredigend dat bij de afbraak met cotazym verschillende radioactieve fragmenten ontstonden.

Gevonden werd dat pepsine het DP-esterase snel afbreekt met een hoge opbrengst van slechts een enkel radioactief gemerkt peptide. Dit peptide werd voor de structuuranalyse van de DFP-bindende groep gekozen. Bij de isolering werd gebruik gemaakt van de kolomchromatografie met kationenuitwisselaars, papierchromatografie en -elektroforese. De zuiverheid kon worden bepaald. De structuur werd met micro-analytische methoden onderzocht. Vanaf het carboxyleindstandige aminozuur kon de aminozuurvolgorde gedeeltelijk worden vastgesteld met behulp van carboxypeptidase. De selectieve afbraakmethode van Edman (25) werd gebruikt voor structuurbevestiging vanaf het amino-eindstandige aminozuur, waarbij als spoedig moeilijkheden werden ondervonden, zodat het middenstuk van de peptidestructuur op een andere wijze werd onderzocht.

Tenslotte werd ook de plaats van de DP-groep in het peptide

bepaald. Zodoende kon de volledige structuur van het DP-peptide worden opgehelderd. De met dit onderzoek over de DFP-bindende groep en daarmee over het actieve centrum verkregen informatie en de relatie tot overeenkomstige structuren in andere esterasen worden in de Algemene Bespreking van de Resultaten nader besproken.

EXPERIMENTEN *

A. Bereiding van DP-ali-esterase

Voor de produktie van DP-ali-esterase werden doorgaans preparaten gebruikt met een specifieke activiteit van 50 E/mg N. Hoewel het zeer zeker mogelijk is de preparaten verder te zuiveren werd daarvan afgezien omdat enerzijds veel van de enzymactiviteit verloren gaat en er anderzijds geen reden was om te veronderstellen dat in het onzuivere preparaat andere groepen dan die van ali-esterase met DFP reageren.

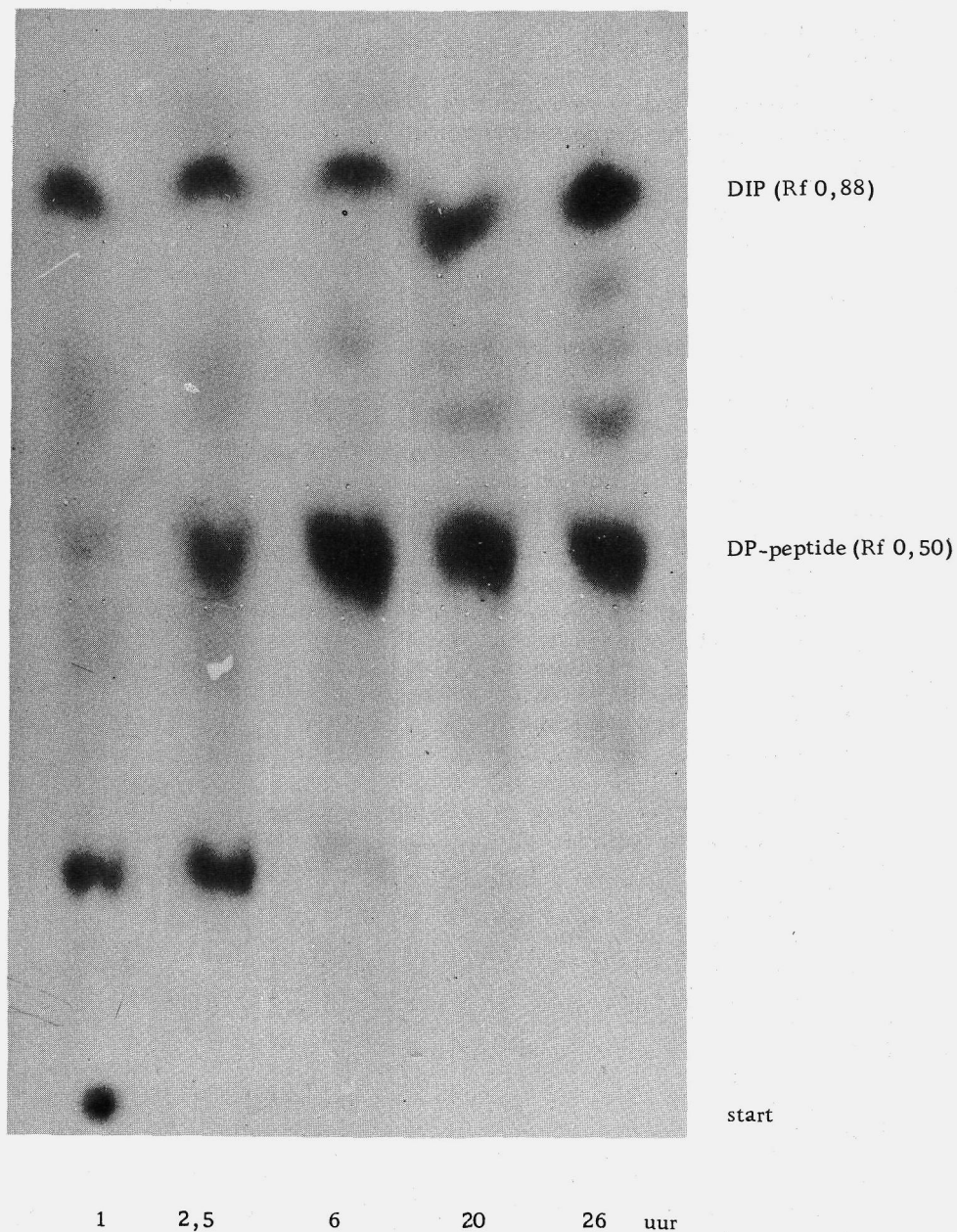
Een oplossing van ongeveer 3.000 E ali-esterase in een volume van 50 ml werd bij pH 7,0 met 4,5 $\mu\text{mol DF}^{32}\text{P}$ gedurende 30 minuten bij 20° C geïncubeerd. Hierdoor werd het enzym voor meer dan 95% geremd. De overmaat DF^{32}P werd verwijderd door dialyse tegen gedestilleerd water. De dialyse werd voortgezet totdat de hoeveelheid ^{32}P binnen de dialysehuls constant bleef. De hoeveelheid door het ali-esterase gebonden P bedroeg 1,6 μmol , waaruit een turnover-getal van 18.000 werd berekend (zie Hoofdstuk II).

B. Het met cotazym verkregen DP-peptide

1. De proteolyse van DP-ali-esterase door cotazym

Met behulp van cotazym kunnen uit DP-ali-esterase DP-peptiden verkregen worden. De juiste condities voor de enzymatische afbraak werden gevonden door een aantal proefhydrolyses uit te voeren, waarbij de vorming van radioactieve peptiden kwantitatief werd bepaald als functie van de tijd. Daartoe werd een kleine hoeveelheid DP-ali-esterase met cotazymoplossing geïncubeerd bij 37° C terwijl de pH met ammoniak op 8,0 gehouden werd. Uit het mengsel werden op verschillende tijden monsters genomen die op Whatman No. 1 papier werden gebracht, waarna het cotazym op het papier werd geïnactiveerd door een hitte-denaturatie. Na chromatografie in BAW werd een autoradiogram van het chromatogram vervaardigd, aan de hand waarvan de hoeveelheid verkregen DP-peptide en de hoeveelheid diisopropylfosfaat (DIP) ten opzichte van de opgebrachte hoeveelheid P konden worden bepaald. Verschillende zwartingen waren op de fotografische plaat zichtbaar, waarbij een zwarting overeenkomende met een R_f van 0,50 overheerste; de radioactieve verbinding met een R_f van 0,88 kon worden geïdentificeerd als DIP (Fig. 3). Tabel III geeft het kwan-

* Voor experimentele bijzonderheden zij verwezen naar Hoofdstuk V.



Figuur 3
Autoradiogram van de chromatografisch (BAW) vervolgde proteolyse
van DP-ali-esterase tot DP-peptide door cotazym.

titatieve resultaat van een dergelijk experiment, uitgevoerd met 1 ml DP-ali-esterase (1,2 mg N/ml) en 2 ml cotazymoplossing.

Tabel III

Het ontstaan van DP-peptide en DIP uit DP-ali-esterase door proteolyse met cotazym als functie van de tijd

Tijd (uren)	DP-peptide (R _f 0,50) (%) *	DIP (R _f 0,88) (%) *
1	11	22
2,5	24	20
6	42	20
20	40	24

* Berekend t.o.v. de op het chromatogram gebrachte hoeveelheid 32p.

Op geleide van dergelijke proefhydrolyses werd het DP-ali-esterase preparaat met cotazym gehydrolyseerd. Na de proteolyse werden resterende eiwitten neergeslagen door toevoegen van ethanol bij 5° C tot een eindconcentratie van 80%. De oplossing werd gecentrifugeerd en de bovenstaande vloeistof werd door indampen in vacuo van ethanol bevrijd.

2. De isolatie van het DP-peptide

Papierchromatografie en -elektroforese zijn de beste zuiveringstechnieken voor de betrekkelijk kleine hoeveelheden DP-peptide waarover wij beschikten. Voordat echter deze methoden gebruikt konden worden, moest het DP-peptide gescheiden worden van de grote hoeveelheid begeleidende aminozuren. Daartoe werd een efficiënte voorscheiding toegepast, waarbij een niet-gebufferde kationenuitwisselaar Amberlite-IRC-50, werd gebruikt. Bij pH 3 is het dissociatie evenwicht van de COOH groepen van deze zwak-zure kationenuitwisselaar reeds voor een groot deel teruggedrongen (26). Ionenuitwisseling speelt bij deze pH geen grote rol meer. Daarentegen zullen adsorptiekrachten (zoals waterstofbruggen) nog een aanzienlijke invloed hebben. Daar deze krachten een relatief sterk verschillende invloed op grote en kleine moleculen uitoefenen, mag men verwachten dat chromatografische scheiding van peptiden en aminozuren met IRC-50 mogelijk zal zijn. Daarbij is een groot voordeel dat een buffer niet gebruikt hoeft te worden. Door buffers worden zouten geïntroduceerd die zeer moeilijk te verwijderen zijn en storen bij de in een later stadium van de zuivering toe te passen papierchromatografie. Voor de elutie van een IRC-50 kolom kan men volstaan met een oplossing van azijnzuur.

Het in vacuo geconcentreerde cotazym-hydrolysaat (3 ml) werd na aanzuren met azijnzuur tot pH 4, op een IRC-50 kolom gebracht. Voor bijzonderheden over de kolomvulling zij verwezen naar

Hoofdstuk V. De kolomdoorsnede bedroeg $5,4 \text{ cm}^2$, de lengte was 40 cm. Er werd geëlueerd met water dat aangezuurd was met azijnzuur tot pH 4. Bij gebruik van deze elutievloeistof kwam het DP-peptide, vóór de basische en na de zure en neutrale aminozuren uit de kolom met als voornaamste verontreiniging aromatische aminozuren. Bij gebruik van verdund azijnzuur van pH 3,1 kwam het DP-peptide samen met de basische aminozuren uit de kolom.

Het DP-peptide werd verder met behulp van papierchromatografie gezuiverd. In BAW had het DP-peptide een R_f -waarde van 0,50. Dit betekent dat het geheel of gedeeltelijk zou samenvallen met eventueel aanwezig valine, methionine, tryptofaan, tyrosine en fenylalanine. In BW had het DP-peptide echter een andere R_f dan deze aminozuren zodat het peptide na opeenvolgende chromatografie in deze solventia gescheiden was van aminozuren.

Een laatste zuivering, waarbij het DP-peptide van andere peptiden gescheiden werd, had plaats door middel van papierelektroforese bij een pH van 4,6 in een 0,1 M Na-acetaatbuffer gedurende 8 uur bij 450 V. Het DP-peptide migreerde daarbij 2 cm naar de positieve pool, terwijl het merendeel van het ninhydrine-positieve materiaal naar de negatieve kant werd verplaatst. Tenslotte werd het door de papierelektroforese geïntroduceerde Na-acetaat verwijderd door papierchromatografie met BAW als solvens. Het aldus gezuiverde DP-peptide was vrijwel bevrijd van aminozuren en andere peptiden.

3. De aminozaursamenstelling van het DP-peptide

Met $0,05 \mu\text{mol}$ van het gezuiverde DP-peptide werd een kwalitatieve aminozuuranalyse uitgevoerd. Het DP-peptide werd volledig gehydrolyseerd. Het met zoutzuur verkregen hydrolysaat werd twee-dimensionaal gechromatografeerd (BAW stijgend, Fenol- NH_3 dalend) nadat de in Hoofdstuk V beschreven oxydatie was toegepast. De in Tabel XII genoemde aminozuren werden aangetoond. De opgegeven getallen berusten op een visuele vergelijking van de met ninhydrine verkregen kleur met die van een overeenkomstig testchromatogram waarvan de opgebrachte hoeveelheden aminozuren waren afgestemd op de op het proefchromatogram gebrachte hoeveelheid ^{32}P . Op het chromatogram werden te verwaarlozen hoeveelheden treonine, valine en asparaginezuur waargenomen.

C. Het met pepsine verkregen DP-peptide

1. De proteolyse van DP-ali-esterase door pepsine

DP-ali-esterase wordt snel en volledig door pepsine afgebroken tot een complex mengsel van peptiden waarin hoofdzakelijk één DP-peptide voorkomt. Dé proteolyse werd ook hier weer chromatografisch analytisch vervolgd. Daartoe werden monsters van het DP-ali-esterasepreparaat ($0,5 \text{ mg N/ml}$) bij 37°C en pH 2,0 met pepsine in verschillende concentraties geïncubeerd. Vervolgens werd de proteolyse als functie van de tijd bepaald zoals dit in pa-



Figuur 4
Autoradiogram van de chromatografisch (BAW) vervolgde afbraak van
DP-ali-esterase tot DP-peptide door pepsine

ragraaf B1 beschreven werd. Een representatief resultaat van een dergelijk experiment is weergegeven in Fig. 4. Uit deze figuur blijkt dat hoofdzakelijk één radioactief peptide met een R_f van 0,20 ontstaat, dat resistent is tegen verdere inwerking van pepsine. In Tabel IV zijn de resultaten van een tweetal chromatografische analyses samengevat.

Tabel IV

De omzetting van DP-ali-esterase door pepsine in twee concentraties tot DP-peptide als functie van de tijd

	0-0,25	0,5	1	2	4	20 uur
0,005% pepsine						
% DP-esterase (start)	84	60	39	21	18	9
% DP-peptide (R_f 0,20)	0	7	14	32	47	82
0,05% pepsine						
% DP-esterase (start)	84	9	5	4	5	3
% DP-peptide (R_f 0,20)	3	74	89	79	85	88

De hoeveelheid DP-esterase op de start van het chromatogram en de hoeveelheid DP-peptide op een R_f van 0,20 werden berekend t.o.v. de totale op het chromatogram gebrachte hoeveelheid 32p.

2. De isolatie van het DP-peptide

a. Oriënterende experimenten

Ook voor de isolatie van het met pepsine verkregen DP-peptide zijn papierchromatografie en -elektroforese de aangewezen methoden. De isolatie was echter vrij moeilijk, daar een complex mengsel van peptiden gescheiden moest worden. Hoewel op grond van in paragraaf B2 genoemde beschouwingen niet verwacht mocht worden, dat de IRC-50 kolom bij lage pH een scheiding van peptiden zou kunnen geven, bleek dat deze kolom toch zeer goed bruikbaar was om een voorscheiding te verkrijgen. Eveneens werd een Dowex-50 x 8 kationenuitwisselaar zonder buffer gebruikt.

Het over IRC-50 en Dowex-50 gezuiverde DP-peptide werd gechromatografeerd in BAW, Fenol-NH₃, BW en Pyridine-H₂O, teneinde een indruk te krijgen welk solvens voor de verdere zuivering het best bruikbaar was. Tabel V geeft een overzicht van de R_f -waarden van het DP-peptide in genoemde solventia.

In BW lag het DP-peptide op de start van het chromatogram. De verontreinigingen lagen voor het merendeel eveneens op de start, hetgeen na kleuring met het ninhydrine-reagens te constateren was. In Pyridine-H₂O vormde het DP-peptide een vrij langgerekte vlek, zodat ook dit solvens minder geschikt leek voor de zuivering

Tabel V

R_f-waarden van het DP-peptide in verschillende solventia

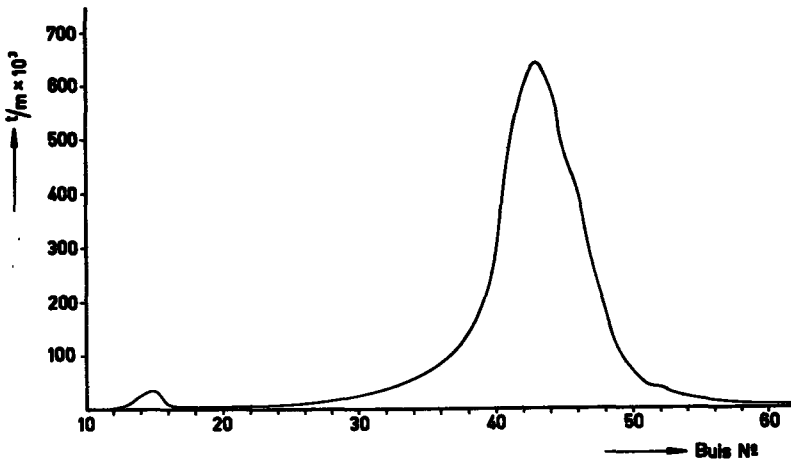
Solvens	R _f DP-peptide
BW	start
BAW	0,20
Fenol-NH ₃	0,69
Pyridine-H ₂ O	0,38

van het DP-peptide. In Fenol-NH₃ lag het DP-peptide vrij gunstig, daar de meeste verontreiniging in het front van het chromatogram lagen. De verontreinigingen waren in BAW over de gehele baan van het chromatogram verspreid, terwijl het DP-peptide als een scherp begrensde vlek waargenomen werd. Beide laatste solventia werden dan ook aanvankelijk gebruikt om het DP-peptide te scheiden van andere peptiden. Na chromatografie in beide solventia was het DP-peptide echter nog niet volledig gescheiden van begeleidende peptiden, zodat tenslotte nog papierelektroforese als zuivering werd toegepast. Maakten wij gebruik van „high voltage”-elektroforese op papier, dan kon de chromatografie in Fenol-NH₃ achterwege blijven.

b. De toegepaste isolatiemethode

De isolatiemethode die verschillende malen met reproduceerbare resultaten werd toegepast was als volgt: de gehele hoeveelheid DP-ali-esterase (zie paragraaf A) werd met pepsine (0,01%) gedurende 6 uur bij 37° C en pH 2,0 geïncubeerd. Daarna werd nagegaan hoever de proteolyse gevorderd was door aan een monster een gelijke hoeveelheid van een 20% oplossing van trichloorazijnzuur toe te voegen. Na centrifugeren werd de radioactiviteit van het eventueel gevormde neerslag en van het centrifugaat bepaald. Doorgaans was na een 6-urige proteolyse de radioactiviteit volledig in het centrifugaat aanwezig. De pH van het peptidenmengsel werd nu op 7,0 gebracht met NH₄OH, waarna ethanol werd toegevoegd tot een eindconcentratie van 80%. Na centrifugeren werd het volume van de bovenstaande vloeistof in vacuo gereduceerd tot 2 ml. Deze oplossing werd zonder voorafgaande controle van de pH geheel op de IRC-50 kolom gebracht. De kolom (39 cm x 5,4 cm²) werd geëluëerd met verdund azijnzuur (pH 3,1; 0,05 M). Fracties van ongeveer 12 ml werden opgevangen bij een uitloopsnelheid van 1,5 - 2,0 ml per minuut. Een representatief diagram van de verdeling van de radioactiviteit over deze fracties is weergegeven in Fig. 5. De snellopende radioactieve top kon worden geïdentificeerd als diisopropylfosfaat. Van de grote radioactieve top, die het DP-peptide bevatte, werden de fracties

39 - 48 bijeengevoegd en gelyofiliseerd, waardoor tevens het azijnzuur werd verwijderd.



Figuur 5

Diagram van de verdeling van de radioactiviteit (in tellen per minuut) in de fracties (12 ml) verkregen na elutie van de IRC-50 kolom ($39 \times 5,4 \text{ cm}^2$) met 0,05 M azijnzuur pH 3,1.

Het aldus gezuiverde DP-peptide werd na oplossen in 1 ml water op een Dowex-50 x 8 kolom gebracht. De kolom ($20 \text{ cm} \times 0,8 \text{ cm}^2$) was van tevoren in de H^+ -vorm gebracht en met H_2O gewassen totdat de pH van de uitstromende vloeistof 7,0 bedroeg. Het radioactieve peptide werd boven in de kolom geadsorbeerd. Nadat een eluaat van ongeveer 200 ml verkregen was werd de radioactieve fractie uit de kolom gesneden en vervolgens met een waterige oplossing van NH_4OH (pH 9) aan de hars onttrokken.

De zo verkregen oplossing werd, verdeeld over 20 punten, op 2 vellen papier gebracht en gechromatografeerd in BAW. Het DP-peptide ($R_f = 0,20$) werd zodoende gescheiden van veel ninhydrine-positief materiaal dat over de gehele baan van het chromatogram verspreid lag. Na chromatografie in BAW werd het DP-peptide elektroforetisch gezuiverd (pH 6,5, 2500 V, gedurende 1 uur). Het DP-peptide migreerde 6 cm naar de positieve pool, gerekend vanaf het startpunt. Aan weerskanten van het DP-peptide was ninhydrine-positief materiaal aanwezig. Het DP-peptide was nu voor analyse gereed.

Het verloop van de zuivering is weergegeven in Tabel VI. De in deze tabel weergegeven N/P verhouding werd als volgt bepaald. Van de peptidmengsels werden in verschillende stadia van de zuivering monsters genomen die vervolgens met zoutzuur totaal werden gehydrolyseerd. De hoeveelheid aminozuur werd in deze monsters volgens de in Hoofdstuk V beschreven ninhydrinemethode bepaald, terwijl de hoeveelheid P aan de hand van de radio-

activiteit werd bepaald. De N/P verhouding werd gedefinieerd als het aantal vrije NH_2 -groepen per P-atoom. De N/P verhouding na de elektroforese werd niet op deze wijze bepaald doch uit het bij de kwantitatieve bepaling verkregen resultaat (zie paragraaf C3).

Tabel VI

Het verloop van de zuivering van het DP-peptide

	$\mu\text{mol P}$	N/P verhouding
Pepsine hydrolysaat	1,6	2400
Na IRC-50 kolom	1,0	140
Na Dowex-50 kolom	0,9	70
Na BAW	0,6	35
Na elektroforese	0,4	7,4

3. De aminozuursamenstelling van het DP-peptide

Een hoeveelheid van het DP-peptide werd met zoutzuur volledig gehydrolyseerd. In het verkregen aminozuurmengsel konden de volgende aminozuren worden aangetoond: glutaminezuur, serine, glycine en alanine (chromatografie van een hoeveelheid corresponderend met $0,01 \mu\text{mol P}$ in Fenol- NH_3). Ongeveer $0,05 \mu\text{mol}$ werd vervolgens twee-dimensionaal gechromatografeerd (BAW stijgend, Fenol- NH_3 dalend). Een overeenkomstig testchromatogram, waarop de genoemde aminozuren aanwezig waren in hoeveelheden, afgestemd op de op het proefchromatogram gebrachte hoeveelheid P, werd eveneens gechromatografeerd. De hoeveelheden van de aminozuren op het proefchromatogram konden semi-kwantitatief worden bepaald door de met ninhydrine verkregen kleur te vergelijken met die van het testchromatogram. Op proline werd afzonderlijk gereageerd met het isatine-reagens. Uit deze semi-kwantitatieve bepaling volgde dat er in het DP-peptide aanwezig waren: glutaminezuur (glutamine) (2), serine (1-2), glycine (2-3) en alanine (1). Andere aminozuren waren op het chromatogram niet zichtbaar.

Een kwantitatieve bepaling werd vervolgens op het met zoutzuur verkregen hydrolysaat van $0,1 \mu\text{mol}$ van het DP-peptide aldus uitgevoerd. Een hoeveelheid corresponderend met $0,04 \mu\text{mol P}$ werd aan papierelektroforese onderworpen (1 uur, pH 3,6, 2500 V). De strook papier werd na elektroforese 3,5 cm naar de positieve kant (gerekend vanaf het startpunt) doorgeknipt en vervolgens gechromatografeerd in Fenol- NH_3 . Bij deze bewerking werd een goede scheiding van de aminozuren verkregen. Een testmengsel bestaande uit $0,08 \mu\text{mol}$ glutaminezuur, $0,08 \mu\text{mol}$ serine, $0,12 \mu\text{mol}$ glycine en $0,04 \mu\text{mol}$ alanine werd op dezelfde strook papier meegenomen. De bewerking werd in duplo uitgevoerd.

Vervolgens werd de bepaling volgens de methode van Boissonnas (27) uitgevoerd. De uitkomsten zijn in Tabel VII weergegeven.

Tabel VII

Kwantitatieve analyse van het DP-peptide

	g mol aminozuur/g atoom P
glutaminezuur	2,10 ± 0,04
serine	1,50 * ± 0,10
glycine	2,71 ± 0,09
alanine	1,10 ± 0,02

* Het is bekend, dat serine bij de hydrolyse aan destructie onderhevig is. De mate van destructie is bij O-fosforylserine niet bekend.

Uit de gegevens van Tabel VII blijkt, dat het DP-peptide is samengesteld uit 2 glutaminezuur (glutamine), 2 serine, 3 glycine, 1 alanine en 1 P-groep. De bevredigende stoichiometrische verhouding tussen de aminozuren onderling en de hoeveelheid P wijst reeds op de zuiverheid van het DP-peptide; in de volgende paragraaf zullen nog meer argumenten voor de homogeniteit naar voren worden gebracht.

4. De aminozuurstructuur van het DP-peptide

a. Bespreking van de gebruikte methoden

Er bestaan verschillende goede biochemische en chemische methoden ter bepaling van de aminozuurvolgorde van peptiden. Het gebruik van de verschillende methoden naast elkaar is meestal wel noodzakelijk. Het amino-eindstandige aminozuur van het DP-peptide kon worden bepaald met behulp van 2,4-dinitrofluorobenzeen (DNFB) volgens Sanger (28). Het met DNFB gekoppelde eindstandige aminozuur werd door een verhitting met zoutzuur afgesplitst en vervolgens chromatografisch geïdentificeerd. Voor verdere structuuranalyse wordt het gedinitrofenyleerde peptide (DNP-peptide) partieel gehydrolyseerd. Uit de verkregen deelpeptiden kan de structuur worden afgeleid. Daar uit een octapeptide een zeer groot aantal deelpeptiden kan ontstaan waardoor de opbrengst van elk peptide doorgaans laag is, is het noodzakelijk van een grote hoeveelheid DNP-peptide uit te gaan. De methode komt daarom niet in aanmerking voor verder structuuronderzoek van het onderhavige DP-peptide.

Een bijzonder elegante chemische methode afkomstig van Edman (25) is uitvoerig beschreven door Fraenkel-Conrat, Harris en Levy (29). Het amino-eindstandige aminozuur wordt gekoppeld met fenylisothiocyanaat in alkalisch milieu, waarna het ontstane fenylthiocarbamyl-derivaat van het peptide (PTC-peptide) in zuur milieu een intra-moleculaire ringsluiting ondergaat, waarbij het

eindstandige aminozuur tevens wordt afgesplitst als fenylthiohydantoïne-derivaat (PTH-aminozuur). De ringsluiting kan spectrofotometrisch worden vervolgd, waarbij het eindpunt van de reactie nauwkeurig kan worden bepaald, zodat het DP-peptide niet langer dan noodzakelijk aan het zure milieu blootgesteld wordt. Het peptide dat aldus ontdaan is van zijn eindstandig aminozuur is weer beschikbaar voor de volgende koppeling en ringsluiting. De methode kan worden uitgevoerd met kleine hoeveelheden peptide.

Het exopeptidase carboxypeptidase wordt gebruikt om de volgorde van peptideketens te bepalen vanaf het carboxyl-eindstandige aminozuur. Men kan overigens, gezien de specificiteit van proteolytische enzymen, verwachten dat de „vreemde“ DP-groep in het DP-peptide een obstakel zal vormen voor de werking van carboxypeptidase, zodat dit enzym hoogstens in beperkte mate bruikbaar zal zijn.

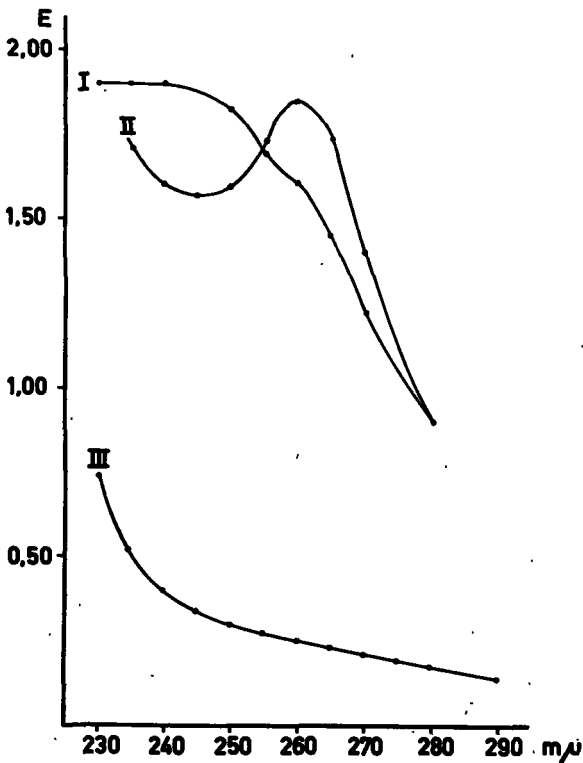
b. Het amino-eindstandige aminozuur van het DP-peptide, bepaald volgens de DNFB-methode

0,1 μmol van het DP-peptide werd gekoppeld met DNFB. Na afloop van de koppeling werd op de gebruikelijke wijze met ether en na aanzuren met HCl nogmaals met ether en tenslotte met methylacetaat uitgeschud. De lichtgeel gekleurde methylacetaat-oplossing werd drooggedampt, waarna het residu werd gechromatografeerd in het solvens van Blackburn en Lowther. De radioactiviteit op het chromatogram viel volledig samen met de gele vlek van een DNP-derivaat; de R_f bedroeg 0,50. Het peptide werd van het chromatogram uitgelooft. Van het aldus gezuiverde DNP-DP-peptide werd in 2 N HCl het absorptiespectrum gemeten. Er werd een absorptiemaximum bij 352 - 355 $m\mu$ gevonden, terwijl een molaire extinctiecoëfficiënt van 18×10^3 kon worden berekend uit de gemeten extinctie voor een bekende concentratie DNP-DP-peptide (berekend uit het ^{32}P). Aangezien de aldus berekende waarde goed overeenstemt met de uit de literatuur (29) bekende waarden van mono-DNP-aminozuren ($E_m = 16 - 18 \times 10^3$) mag worden aangenomen dat in het DNP-DP-peptide slechts één DNP-groep per P atoom aanwezig is; tevens blijkt hieruit dat het DP-peptide niet verontreinigd is met andere peptiden.

Een hoeveelheid van 0,04 μmol DNP-DP-peptide werd gehydrolyseerd met zoutzuur (6 N HCl, 103° C gedurende 3½ uur). De duur van de hydrolyse diende zo kort mogelijk te zijn in verband met de instabiliteit van sommige DNP-aminozuren onder deze omstandigheden. Na afloop van de hydrolyse werd het afgesplitste eindstandige DNP-aminozuur uit de oplossing met ether geëxtraheerd. Het drooggedampte etherextract werd gechromatografeerd in het solvens van Biserte en Osteux ter identificatie van het eindstandige aminozuur. Als testmengsel werden op hetzelfde chromatogram mede-gechromatografeerd de DNP-derivaten van serine, glycine, glutaminezuur en alanine. Het amino-eindstandige aminozuur van het DP-peptide kon zodoende worden geïdentificeerd als DNP-glycine.

c. De aminozuurvolgorde van het DP-peptide vanaf het amino-eindstandige aminozuur bepaald volgens de methode van Edman

0,6 μmol van het DP-peptide in een volume van 2 ml H_2O werd driemaal uitgeschud met eenzelfde volume ethylacetaat om pyridineresten afkomstig van de papierelektroforese (zie C2b) te verwijderen. De oplossing werd in vacuo drooggedampt en van het in water opgenomen residu werd een ultraviolet absorptiespectrum bepaald. De verkregen curve (concentratie DP-peptide 4×10^{-4} M) is in Fig. 6 weergegeven.



Figuur 6

Spectrofotometrisch vervolgde Edman-reactie bij het DP-peptide
Curve III geeft het absorptiespectrum van het in H_2O gemeten gezuiverde DP-peptide weer (conc. 4×10^{-4} M). De beide andere curven geven de ringsluiting in 3 N HCl van PTC-peptide (I) tot PTH-aminozuur (II) weer.

Het DP-peptide (0,6 μmol) werd gekoppeld met fenylisothiocyaanaat. Na verwijdering van de overmaat van dit reagens werd het gevormde PTC-peptide opgenomen in 3 N HCl waarna het absorptiespectrum bij 235 - 280 $\text{m}\mu$ werd bepaald (conc. PTC-peptide 10^{-4} M, berekend uit het ^{32}P). De oplossing werd bij 20 - 30° C

bewaard en het spectrum van tijd tot tijd gemeten waardoor de ringsluiting van het PTC-peptide tot het PTH-aminozuur kon worden vervolgd. Een representatief resultaat is weergegeven in Fig. 6 waarbij curve I direct en curve II na 4 uur bepaald werd. Na 4 uur nam de extinctie bij 260 m μ niet meer toe, zodat aangenomen mocht worden dat het eindpunt van de reactie was bereikt. Het gevormde PTH-aminozuur werd uit de oplossing met ethylacetaat geëxtraheerd. De oplossing werd daarna snel boven KOH in vacuo drooggedampt, waarna op het residu de tweede „Edman reactie” werd uitgevoerd. Na een incubatie met 3 N HCl gedurende 2 uur bij 20° C nam de extinctie bij het absorptiemaximum niet meer toe, zodat de behandeling met zoutzuur werd afgebroken. De resultaten van de derde „Edman reactie” zullen in de volgende paragraaf afzonderlijk worden besproken.

In Tabel VIII zijn de resultaten van een tweemaal uitgevoerde „Edman reactie” samengevat. In de eerste kolom van deze tabel is de hoeveelheid DP-peptide aangegeven, waarvan werd uitgegaan, berekend uit de hoeveelheid ³²P. Van de verkregen PTH-aminozuren werd steeds in 99% ethanol het absorptiespectrum bepaald. De zuiverheid van het verkregen PTH-derivaat kan worden beoordeeld aan de verhouding E260/E_{max} die ongeveer 0,85 moet zijn (29). De uit het absorptiespectrum berekende waarde is in kolom 2 van Tabel VIII vermeld.

Daar ons bleek, dat bij berekening van de opbrengst aan PTH-aminozuur uit het in ethanol gemeten absorptiespectrum te hoge waarden werden verkregen, werden de PTH-aminozuren eerst chromatografisch gezuiverd. Daartoe werden bekende porties van de PTH-aminozuuroplossingen gechromatografeerd in HMB, tezamen met authentieke monsters van PTH-glutaminezuur en PTH-glycine, in hoeveelheden van 0,1 μ mol. De PTH-aminozuren werden gelokaliseerd door van het chromatogram in ultraviolet licht een contactfoto te maken, waarna deze werden uitgelooft met 3 ml ethanol (99%). Door de gemeten waarde van de extinctie bij het maximum van de aldus gezuiverde PTH-aminozuren van de eerste en de tweede „Edman reactie” te betrekken op die van de authentieke monsters van PTH-aminozuren, konden de hoeveelheden vermeld in kolom 3 van Tabel VIII voor beide aminozuren worden berekend.

De PTH-aminozuren van de eerste en tweede „Edman reactie” werden met 5,7 N HCl gedurende 16 uur bij 150° C in geëvacueerde pyrex ampullen verhit en de verkregen produkten ter identificatie gechromatografeerd in pyridine-H₂O. De meeste PTH-aminozuren worden bij deze bewerking geregenereerd tot aminozuur met een opbrengst van 60 - 70%. In Tabel VIII, kolom 4, zijn de resultaten van dit experiment vermeld. Het eerste aminozuur van het DP-peptide is dus glycine, het is echter niet mogelijk vast te stellen of het tweede aminozuur glutaminezuur of glutamine is. Wel kon dit worden bepaald door directe identificatie van de PTH-aminozuren. Het eerste PTH-aminozuur kon worden geïdentificeerd als PTH-glycine en het tweede als PTH-glutaminezuur. Hierbij werd gebruik gemaakt van het solvens py-

ridine-heptaan, waarin PTH-glutaminezuur en PTH-glutamine samenvallen, doch alle andere PTH-derivaten van in het DP-peptide voorkomende aminozuren een verschillende R_f hebben. Voor de identificatie van het tweede PTH-aminozuur werd gebruik gemaakt van het solvens HMB, waarin PTH-glutamine en PTH-glutaminezuur een verschillende R_f hebben. Deze resultaten zijn in kolom 5 van Tabel VIII weergegeven.

Tabel VIII

De resultaten van twee opeenvolgende Edman-degradaties op het DP-peptide

	1	2	3	4	5
	DP-pept. μmol	E260/ E_{max}	PTH μmol	amino- zuur	PTH
Edman I	0,6	0,86	0,4	glyc.	glyc.
Edman II	0,5	0,86	0,4	glut. zuur	glut. zuur (spoor glycine)

Resumeren we de tot nu toe verkregen resultaten dan volgt daaruit de volgende structuur van het DP-peptide: glycyl-glutamyl-(serine, alanine, glycine, glycine, glutaminezuur, serine) + P.

d. De reactie van het derde aminozuur met fenylisothiocyanaat

Na twee opeenvolgende Edman-degradaties werd het resterende DP-peptide gezuiverd door papierelektroforese (pH 6,5 bij 2500 V gedurende 1 uur). Het lag voor de hand te veronderstellen dat de daarbij verkregen radioactieve hoofdcomponent (6 cm naar de positieve kant, vanaf het startpunt gerekend) het resterende peptide zou zijn. Ter bevestiging van dit vermoeden werd deze component kwantitatief geanalyseerd. De analyse werd na chromatografie in pyridine- H_2O van 0,04 μmol van een met zoutzuur verkregen hydrolysaat van deze component volgens Boissonnas (27) uitgevoerd. Het resultaat van de analyse is samengevat in Tabel IX. Uit de gegevens van deze tabel blijkt dat in het peptide per P-atoom 1 glutaminezuur (glutamine), 2 serine, 2 glycine en 1 alanine voorkomen.

Vervolgens werd 0,1 μmol van dit peptide, dat in het vervolg zal worden aangeduid als DP-serylpeptide (zie paragraaf C4e), gekoppeld met fenylisothiocyanaat. Daarna werd de oplossing op de gebruikelijke wijze uitgeschud met cyclohexaan en benzeen en drooggedampt. Voorts werd nagegaan of de P-groep nog aan het peptide gebonden was. Daartoe werden afzonderlijke porties van het verkregen produkt gechromatografeerd in BAW en Fenol- NH_3 en aan elektroforese onderworpen (pH 3,6; 2500 V; $\frac{1}{2}$ uur). Bij ieder van deze bewerkingen werd niet-radioactief DIP als carrier

toegevoegd. Na kleuring van de chromatogrammen met Hanes-reagens kon worden vastgesteld, dat vrijwel alle radioactiviteit als DIP afgesplitst was.

De rest van het reactieproduct werd opgelost in 3 N HCl, waarna het ultraviolet absorptiespectrum werd gemeten. Hoewel de sterke absorptie bij 240 m μ deed vermoeden dat een PTC-derivaat aanwezig was, kon zelfs door langdurige behandeling met HCl geen toename van de extinctie bij 260 m μ worden waargenomen. Hieruit blijkt dat er geen PTH-derivaat gevormd wordt. De ontstane reactieproducten werden tot nu toe niet geïdentificeerd.

Tabel IX

Kwantitatieve analyse van het DP-serylpeptide

	g mol aminozuur/g atoom P		
Glutaminezuur	1,04	±	0,07
Serine	1,63 *	±	0,17
Glycine	1,90	±	0,03
Alanine	0,94	±	0,04

* Zie noot bij Tabel VII

e. Identificatie van het derde aminozuur volgens de methode van Sanger

De in de vorige paragraaf beschreven moeilijkheden bij toepassing van de Edman-reactie op het DP-serylpeptide noopten ons een andere methode voor de identificatie van het eindstandige-aminozuur van dit peptide te gebruiken. Daarbij werd weer de methode van Sanger (28) gebruikt.

Ongeveer 0,3 μ mol van het DP-serylpeptide werd daartoe gedurende 16 uur gekoppeld met DNFB en vervolgens met ether, na aanzuren van de oplossing weer met ether en tenslotte met methylacetaat uitgeschud. De methylacetaat bevatte 57% van de radioactiviteit, het water 27% en de zure ether 16%. Na chromatografische zuivering van het produkt uit de methylacetaatoplossing (Blackburn, dalend) bleek dat ongeveer de helft van de radioactiviteit als DIP aanwezig was en de rest samenviel met een geel gekleurd produkt (4 cm van de start). Het gele radioactieve produkt werd uitgeloozd waarna het absorptiespectrum gemeten werd in 0,1 N HCl. Het produkt had de voor een DNP-derivaat karakteristieke absorptiemaxima bij 265 en 355 m μ . Uit de gemeten extinctie bij 355 m μ en de bekende concentratie 32 P kon een molaire extinctie-coëfficiënt van 17×10^3 berekend worden. Deze waarde stemt goed overeen met de uit de literatuur (29) bekende waarden van mono-DNP-aminozuren. Zodoende kon de zuiverheid van het aldus verkregen DNP-DP-serylpeptide worden vastgesteld.

Ter identificatie van het amino-eindstandige aminozuur van het DP-serylpeptide werd het DNP-derivaat in 2 N HCl gedurende 2 uur bij 105°C gehydrolyseerd. De oplossing werd uitgeschud met methylacetaat dat werd gechromatografeerd in het solvens van Biserter en Osteux. Monsters van DNP-derivaten van glutaminezuur, serine, glycine, alanine en O-serinefosfaat werden op hetzelfde chromatogram mede-gechromatografeerd. Het te identificeren produkt was evenals N-DNP-O-fosforylserine op de start van het chromatogram als gele vlek aanwezig. De radioactieve gele component op de start van het chromatogram werd uitgeloozd en wederom gechromatografeerd, nu in fosfaatbuffer (1,5 M, pH 6,0). Ditmaal werd een authentiek monster van N-DNP-O-fosforylserine aan het te identificeren produkt toegevoegd. De R_f bedroeg 0,50 en de gele kleur viel volledig samen met de radioactiviteit. Geen van de andere uit het peptide voortkomende DNP-aminozuren heeft deze hoge R_f in dit solvens. Zodoende kon het derde aminozuur van het DP-peptide worden geïdentificeerd als een O-gefosforyleerd serine.

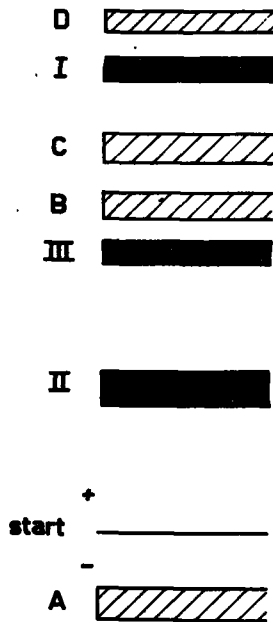
f. Verdere structuurbeplating door partiële hydrolyse van het DP-serylpeptide

0,6 μ mol van het DP-serylpeptide werd gedurende 15 uur bij 40°C met 4 N HCl gehydrolyseerd, waarna de oplossing in 2½ uur boven KOH in vacuo werd drooggedampt. Door toepassing van elektroforese op papier (pH 6,5, 2500 V gedurende 1 uur) werd de in Fig. 7 weergegeven scheiding verkregen. De met letters A, B, C, en D aangegeven componenten (gearceerd) werden zichtbaar gemaakt door een strook van het papier te kleuren met ninhydrine terwijl de componenten I, II en III met zwartingen op een autoradiogram overeenkwamen. Na uitloggen van het papier kon component A door chromatografie in pyridine-H₂O worden geïdentificeerd als een mengsel van glycine en serine, component C als glutaminezuur.

Een gedeelte van de uitgeloozde component B werd volledig gehydrolyseerd en vervolgens in pyridine-H₂O gechromatografeerd. In het hydrolysaat konden glycine, glutaminezuur en serine en tevens een spoor alanine worden aangetoond.

Voor structuuranalyse was de hoeveelheid te gering. Ook van component D was te weinig aanwezig voor verdere analyse.

Van de radioactieve componenten werd alleen II, die ongeveer de helft van de aanwezige radioactiviteit bevatte, verder onderzocht. Daartoe werd deze component aan elektroforese onderworpen (pH 3,6, 2500 V, 1 uur) waarbij twee radioactieve componenten, die in het vervolg zullen worden aangeduid als IIa (5,5 cm naar de negatieve pool) en IIb (4,2 cm naar de negatieve pool) werden verkregen. De hoeveelheid van component IIa bedroeg ongeveer 0,2 en van IIb ongeveer 0,1 μ mol. Na volledige hydrolyse van gedeelten van deze componenten konden de aminozuren kwalitatief worden bepaald door chromatografie van de hydrolysaten in pyridine-H₂O. In component IIa konden alanine,



Figuur 7
 Resultaat van de elektroforese van het partieel gehydrolyseerde DP-seryl-peptide.
 Voor verklaring zie tekst

serine en glycine worden aangetoond; component Iib bevatte dezelfde aminozuren, doch de hoeveelheid glycine was groter. Beide componenten werden kwantitatief geanalyseerd. De analyse werd op hoeveelheden overeenkomend met $0,04 \mu\text{mol P}$ van met zoutzuur verkregen hydrolysaten van deze componenten volgens Boissonnas (27) uitgevoerd na chromatografie in pyridine- H_2O . De resultaten zijn samengevat in Tabel X.

Tabel X
 Kwantitatieve analyse van componenten Iia en Iib

	g mol aminozuur/g atoom P	
	Iia	Iib
Serine	$0,75 * \pm 0,05$	$0,88 *$
Glycine	$0,57 \pm 0,02$	$2,00$
Alanine	$0,93 \pm 0,02$	$1,00$

* Zie noot bij Tabel VII.

Uit de kwantitatieve analyse volgt, dat component Iib een peptide is dat bestaat uit 1 serine, 2 glycine, 1 alanine en 1 P. Op

grond van het te kleine glycine gehalte blijkt dat component IIa uit een mengsel van peptiden moet bestaan.

Ongeveer 0,1 μmol van component IIa werd met 12 N HCl gedurende 15 uur bij 40° C gehydrolyseerd waarna de oplossing in 2½ uur boven KOH werd drooggedampt. Na elektroforese van het hydrolysaat bij pH 3,6 en 2500 V gedurende 30 minuten werden twee radioactieve componenten verkregen (IIa₁ 2,3 cm en IIa₂ 3,5 cm naar de positieve pool). In een met zoutzuur verkregen hydrolysaat van component IIa₂ waren alleen serine en alanine aanwezig (chromatografie in pyridine-H₂O). Component IIa₁ bevatte dezelfde aminozuren en bovendien nog glycine. Vrije aminozuren als verontreinigingen kunnen uitgesloten worden geacht op grond van de loopsnelheden bij elektroforese van deze componenten. Hieruit en uit hetgeen in paragraaf C4e bewezen is nl. dat radioactieve componenten een gefosforyleerd amino-eindstandig serine bevatten, volgt dat component IIa₂ een peptide moet zijn van de volgende structuur: P-seryl-alanine.

Dit resultaat kon worden bevestigd met een indirecte DNFB methode. 0,02 μmol van IIa werd met DNFB gekoppeld en vervolgens op de gebruikelijke wijze uitgeschud met ether en methylacetaat. Het radioactieve produkt in de methylacetaatoplossing werd volledig gehydrolyseerd. In het hydrolysaat was alleen alanine aanwezig (chromatografie in Fenol-NH₃).

Resumeren we de tot nu toe verkregen resultaten dan volgt daaruit de volgende structuur voor het DP-peptide:

glycyl-glutamyl-seryl-alanyl-glycyl-glycyl (glutaminezuur-serine) + P.

g. De aminozuurvolgorde van het DP-peptide vanaf het carboxyl-eindstandige aminozuur bepaald met carboxypeptidase

Aan 0,3 μmol van het DP-peptide in 0,15 ml H₂O werd 0,03 ml van de in Hoofdstuk V beschreven carboxypeptidase-suspensie toegevoegd. De pH werd met NH₃ op 9,0 gebracht. Na een incubatie van 3½ uur bij kamertemperatuur werd aan de suspensie een vijfvoudige overmaat ethanol (99%) toegevoegd. Neergeslagen eiwit werd afgecentrifugeerd, waarna van de bovenstaande oplossing een hoeveelheid overeenkomend met 0,023 μmol P werd gechromatografeerd in Fenol-NH₃. Een tweemaal grotere hoeveelheid van een op dezelfde wijze geïncubeerde en behandelde carboxypeptidase-suspensie werd als blanco mede-gechromatografeerd. Na kleuring van het chromatogram met het ninhydrine-reagens kon worden aangetoond dat ongeveer 0,015 μmol serine en ongeveer 0,005 μmol glutaminezuur was vrijgekomen (visueel bepaald). Zwak ninhydrine-positief materiaal werd aangetroffen op R_f-waarden van 0,70 en van 0,83. Het bleek dat laatstgenoemde vlekken samenvielen met radioactiviteit. De blanco gaf geen ninhydrinekleuring. Uit dit experiment volgt dus dat de carboxyl-eindstandige groep van het DP-peptide serine is met als daaraan voorafgaand aminozuur glutaminezuur.

Vervolgens werd de rest van het met carboxypeptidase gede-

gradeerde DP-peptide aan papierelektroforese onderworpen (pH 6,5, 2500 V, gedurende 1 uur), waarbij twee radioactieve componenten werden verkregen (component-A op 6 cm, component-B op 4 cm vanaf het startpunt naar de positieve kant). Van component-A was ongeveer viermaal zoveel aanwezig als van component-B. Beide componenten werden van het papier geëluëerd, waarna de rest van het papier gekleurd werd met het ninhydrine-reagens. Twee banden met ninhydrine-positief materiaal, die later konden worden geïdentificeerd als serine en glutaminezuur, waren zichtbaar. Ook hier was de hoeveelheid serine veel groter dan de hoeveelheid glutaminezuur. Van beide radioactieve componenten werden monsters volledig gehydrolyseerd. Een hoeveelheid overeenkomend met 0,01 μmol P werd gechromatografeerd in pyridine- H_2O naast 0,01 μmol van een testmengsel. In component A kwamen de volgende aminozuren voor, waarvan de hoeveelheden visueel werden bepaald: alanine (1), serine (1-2), glycine (3), glutaminezuur (2). In component-B konden eveneens visueel worden bepaald: alanine (1), serine (1), glycine (3) en glutaminezuur (1). Dit resultaat is in overeenstemming met het elektroforetisch gedrag van beide componenten. Zoals in de volgende paragraaf zal blijken kon de aanwezigheid van slechts één serine-residu in component-B worden bevestigd. Component-A is waarschijnlijk een mengsel van het oorspronkelijke DP-peptide en het peptide waarin het eindstandige serine ontbreekt.

5. De plaats van de DP-groep in het DP-peptide

Bij partiële hydrolyse met zoutzuur van het DP-peptide ontstaat naast andere producten O-serinefosfaat. Dit kon als volgt worden aangetoond. Een hoeveelheid van het DP-peptide werd bij 100° C in 2 N HCl gedurende 6 uur verhit. Een gedeelte van het hydrolysaat werd gechromatografeerd in BAW en de rest in Isoboterzuur- NH_3 onder toevoeging van niet-radioactieve hoeveelheden O-serinefosfaat en H_3PO_4 . Na lokalisatie van de toegevoegde fosforverbindingen en de radioactiviteit, bleek dat een gedeelte van de radioactiviteit op de chromatogrammen samenviel met O-serinefosfaat en de rest met H_3PO_4 .

Vervolgens werd de vorming van deze producten als functie van de hydrolysetijd bepaald. Daartoe werden monsters van het DP-peptide met 2 N HCl bij 105° C gehydrolyseerd. Na hydrolyse gedurende 1, 2, 4 en 5 uur werd een monster snel boven KOH in vacuo gedroogd en gechromatografeerd in Isoboterzuur- NH_3 . Op het chromatogram werden de hoeveelheden ^{32}P op de R_f -waarden van O-serinefosfaat en H_3PO_4 t. o. v. de op het chromatogram gebrachte hoeveelheid ^{32}P bepaald. In Tabel XI zijn de resultaten van dit experiment weergegeven.

De vorming van O-serinefosfaat uit het DP-peptide is een aanwijzing dat de DP-groep d. m. v. het P-atoom gebonden is aan het hydroxyl O-atoom van serine. Uit de resultaten verkregen in paragraaf C4e waarbij aangetoond werd dat N-DNP-O-fosforylse-

Tabel XI

Vorming van O-serinefosfaat en H_3PO_4 uit het DP-peptide door hydrolyse met 2 N HCl bij $105^\circ C$ gedurende verschillende tijden

Tijd (uren)	O-serinefosfaat (%) *	H_3PO_4 (%) *
1	24	29
2	32	35
4	44	46
5	43	50

* De getallen geven het percentage van de op het chromatogram gebrachte hoeveelheid ^{32}P aan.

rine uit het DP-serylpeptide gevormd kon worden blijkt, dat het eerste serineresidu van het DP-peptide gefosforyleerd is.

Door alalkische verhitting van het DP-peptide ($100^\circ C$ bij pH 12 gedurende 5 minuten) wordt het gebonden P volledig afgesplitst als DIP (chromatografisch geïdentificeerd in BAW en Fenol- NH_3). De afsplitsing gaat gepaard met verandering in het eerste serineresidu van het DP-peptide. Dit kon niet op eenvoudige wijze met het DP-peptide worden aangetoond daar hierin twee serineresiduen voorkomen. Deze verandering in het eerste serineresidu werd als volgt aangetoond: Van het in paragraaf C4g beschreven peptide-B, dit is dus een peptide dat in vergelijking met het DP-peptide het eindstandige serine en het daaraan voorafgaande glutaminezuur mist, werd de DP-groep door een alkalische verhitting volledig afgesplitst. Vervolgens werden de reactieproducten met HCl volledig gehydrolyseerd, waarna het hydrolysaat werd gechromatografeerd in pyridine- H_2O . Alle in peptide-B voorkomende aminozuren waren aanwezig met uitzondering van serine. De destructie van het gefosforyleerde serineresidu bij opeenvolgende alkalische en zure behandeling kon worden bevestigd bij component I_{2a} (deze component bevat één gefosforyleerd serine, zie paragraaf C4f). Deze destructie van serine is bij serine en serinepeptiden niet bekend en moet dan ook het gevolg zijn van een bijzondere inbouw of substitutie van dit residu in het DP-peptide. Zoals in de discussie van dit Hoofdstuk zal worden uiteengezet is de destructie van het eerste serineresidu bij opeenvolgende hydrolyse met alkali en zuur een aanwijzing dat het hydroxyl O-atoom van dit residu gebonden is aan de DP-groep.

In tegenstelling tot hetgeen waargenomen werd bij DP-ali-esterase kon de DP-groep van het DP-peptide niet worden afgesplitst met isonitrosoaceton, zelfs niet bij langdurige incubatie of verwarmen met een oplossing van deze verbinding.

BESPREKING VAN DE RESULTATEN

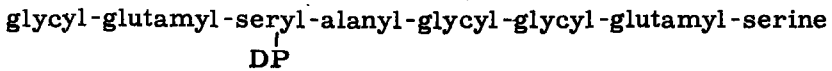
Uit een structuuronderzoek van radioactief gemerkte peptiden, die konden worden geïsoleerd uit een proteolysaat van met $DF^{32}P$

geremde ali-esterase, werden gegevens verkregen over de DFP-bindende groep.

Van essentieel belang voor de beoordeling van de resultaten is het te weten of andere groepen dan die van (het onzuivere) ali-esterase met DFP gereageerd hebben. Tegen deze mogelijkheid pleit dat het gevonden turnover-getal van het gebruikte ali-esterasepreparaat overeenstemt met dat van een 2 maal zo zuiver preparaat. Bovendien wordt bij proteolyse van het DP-ali-esterasepreparaat met pepsine hoofdzakelijk één radioactief gemerkt peptide in hoge opbrengst verkregen. Het is derhalve zeer waarschijnlijk, dat één bepaalde structuur met DFP gereageerd heeft.

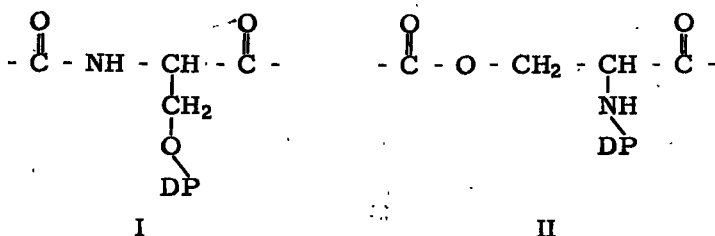
Een tweede punt van groot belang is de vraag of het oorspronkelijke aangrijpingspunt van DFP in ali-esterase overeenkomt in structuur met het onderzochte peptide. De onwaarschijnlijkheid van een verplaatsen van de DP-groep na invoering in het enzym of tijdens de proteolyse van het DP-esterase, zal in de Algemene Bespreking van de Resultaten nader worden aangetoond. Veranderingen in de wijze van binding van de DP-groep of in de omringende aminozuurstructuur als gevolg van de isolatie van het DP-peptide zijn, voor zover dit uit het gelijke elektroforetische en chromatografische gedrag van het DP-peptide voor en na de zuivering volgt, niet opgetreden.

Wij nemen daarom aan dat de wijze van binding van de DP-groep en de aminozuurstructuur in de omgeving van die groep in met DFP geremde ali-esterase overeenkomen met een uit DP-ali-esterase met pepsine verkregen DP-peptide van de volgende structuur:



De zuiverheid van het DP-peptide kon worden aangetoond door een kwantitatieve aminozuuranalyse, waarbij een redelijke stoichiometrische verhouding tussen de aminozuren onderling en de hoeveelheid P gevonden werd. Bovendien kon na koppeling met 2,4-dinitrofluorobenzeen (DNFB) worden aangetoond dat het DP-peptide één vrije NH_2 -groep per P atoom heeft. Tevens kon worden vastgesteld dat het hier de vrije NH_2 -groep van glycine betreft. De amino-eindstandige plaats van glycine kon worden bevestigd met de methode van Edman, terwijl met deze methode eveneens het daaropvolgende aminozuur kon worden geïdentificeerd als glutaminezuur. Het glutaminezuur werd daarbij verkregen als PTH-derivaat van α -glutaminezuur, waaruit volgt dat dit aminozuur α -peptidisch in de keten gebonden is. Na afsplitsing van glycine en glutaminezuur van het DP-peptide kon het verkorte peptide, dat als DP-serylpeptide werd aangeduid, worden geïsoleerd en vervolgens nader worden geïdentificeerd door een kwantitatieve aminozuuranalyse. Het beginstandige aminozuur van het DP-serylpeptide, dat dus overeenkomt met het derde aminozuur van het DP-peptide, kon m.b.v. DNFB worden geïdentificeerd als een gefosforyleerd serine. In het DP-serylpeptide is eveneens één vrije NH_2 -groep

per P atoom aanwezig. Tevens kon uit een met zoutzuur verkregen hydrolysaat van het met DNFB gekoppelde DP-serylpeptide N-DNP-O-fosforylserine worden geïsoleerd. Dit resultaat is in overeenstemming met de vorming van O-serinefosfaat uit het oorspronkelijke DP-peptide en zou als aanwijzing gezien kunnen worden dat de DP-groep in het peptide gebonden is aan het hydroxyl O-atoom van dit serineresidu. Het is echter bekend dat N-O migratie van een fosforgroep onder invloed van zuur kan optreden. Zo hebben Plapinger en Wagner Jauregg (23) aangetoond dat door hydrolyse van N-DP-serine esters met zoutzuur (2 N HCl, 100° C gedurende 6 uur) O-serinefosfaat ontstaat. O-serinefosfaat zou ook uit het DP-peptide kunnen ontstaan indien hierin onderstaande structuur II voorkomt



Hoewel het DP-serylpeptide verkregen werd door een Edman degradatie en daarbij noodzakelijkerwijs enige tijd met zuur in aanraking is geweest, lijkt het onwaarschijnlijk dat door deze milde zure behandeling een N-O migratie van de gehele DP-groep opgetreden zou zijn. De aanwezigheid van een vrije NH₂-groep in het DP-serylpeptide en de vorming van N-DNP-O-fosforylserine uit dit peptide pleiten ervoor dat structuur I in het DP-peptide voorkomt. Anderzijds zou de gemakkelijke afsplitsing van DIP bij pogingen om de vrije NH₂-groep van het DP-serylpeptide met fenylisothiocyanaat te koppelen doen vermoeden, dat de groep die met dit reagens reageert dezelfde is als die waaraan de DP-groep gebonden is. Echter splitsen N-gesubstitueerde diisopropylfosforylderivaten van serine DIP niet af bij behandeling met fenylisothiocyanaat (22).

De destructie die het gefosforyleerde serineresidu in het peptide ondergaat bij achtereenvolgende alkalische en zure verhitting, is ook een argument voor de aanwezigheid van een O-gefosforyleerd serineresidu. Door Riley, Turnbull en Wilson (31) werd waargenomen dat bij alkalische afsplitsing van difenylfosfaat van O-difenylfosforyl-serinederivaten dehydro-alaninederivaten ontstaan, die door voortgezette hydrolyse ontleden in ammoniak en pyruvaten. De destructie van het gefosforyleerde serineresidu in het DP-peptide zou zeer wel volgens dit mechanisme kunnen verlopen. Steun voor deze opvatting wordt verkregen uit nog niet gepubliceerde onderzoeken in het M. B. L. De vorming van dehydroalanine, na afsplitsing van de DP-groep met alkali in een DP-peptide van DP-chymotrypsine kon worden aangetoond.

De identiteit van de drie op serine volgende aminozuren kon worden vastgesteld door kwantitatieve analyse van fragmenten, die bij partiële hydrolyse van het DP-serylpeptide werden verkregen. Gebruik makend van het feit dat de verkregen radioactieve fragmenten een beginstandig gefosforyleerd serine moeten bevatten, kon worden aangetoond dat het vierde, vijfde en zesde aminozuur alanine, glycine en glycine waren. De positie van een carboxyl-eindstandig serine met daaraan voorafgaand glutaminezuur werd door afbraak met carboxypeptidase bewezen.

Tenslotte zij opgemerkt dat uit het in Fig. 6 weergegeven absorptie-spectrum volgt dat in het DP-peptide geen tryptofaan * voorkomt. (Voor tryptofaan is $E_m 278 = 5,55 \times 10^3$ in 0,1 N HCl (32).

* Tryptofaan kan niet in met zoutzuur verkregen hydrolysaten van peptiden worden aangetoond.

Hoofdstuk V

MATERIALEN EN METHODEN

1. *Enzymactiviteit en specifieke activiteit*

De enzymactiviteit van ali-esterase uit paardelever werd bepaald in een door Cohen, Kalsbeek en Warringa (33) beschreven opstelling voor continue titratie. In het reactievaatje (25 ml) werd 5 ml 1,2% (v/v) methylbutyraat oplossing, 0,5 ml 0,01 M fosfaatbuffer van pH 7,5 en enzym gebracht waarna het volume met H₂O werd aangevuld tot 10 ml. De titratie werd bij 25° C uitgevoerd en de hoeveelheid enzym werd zodanig gekozen, dat per minuut ongeveer 0,1 ml 0,01 N NaOH moest worden toegevoegd om een pH van 7,5 te houden. Gedurende 30 minuten werd om de minuut de hoeveelheid toegevoegd NaOH geregistreerd. Onder deze omstandigheden werd een lineair verband gevonden tussen de toegevoegde hoeveelheid loog en de tijd. De enzymactiviteit werd uitgedrukt in eenheden (E) d. w. z. het aantal ml 0,01 N NaOH dat, onder de omstandigheden van de proef, per minuut moest worden toegevoegd om een pH van 7,5 te handhaven. Het aantal eenheden per mg eiwit-stikstof (E/mgN) werd gedefinieerd als de specifieke activiteit van ali-esterase. Eiwit-stikstof werd steeds bepaald volgens de micro Kjehldahl-methode.

Wij bepaalden eveneens de enzymactiviteit van ali-esterase volgens de manometrische methode van Connors, Pihl, Dounce en Stotz (16). In het hoofdvat werd 0,45 ml 0,15 M NaHCO₃ en 0,038 ml methylbutyraat gebracht waarna het volume werd aangevuld tot 2,7 ml met H₂O. Het zijvat bevatte 0,1 ml 0,15 M NaHCO₃, het volume werd met H₂O en enzym tot 0,5 ml aangevuld. Er werd gedurende 4 minuten geëquilibreerd bij 30° C met een gasmengsel dat 95% N₂ en 5% CO₂ bevatte. Na het mengen werd de manometer om de 4 minuten afgelezen. De hoeveelheid enzym was afgestemd op een gasontwikkeling van 150 - 200 μ l CO₂/min. De enzymactiviteit werd uitgedrukt in het aantal μ l CO₂/uur. De specifieke activiteit werd gedefinieerd als het aantal μ l CO₂/uur per mg drooggewicht van het preparaat. Voor verschillende ali-esterase preparaten werden activiteit en specifieke activiteit op beide wijzen bepaald, waaruit de volgende betrekkingen konden worden afgeleid:

1 eenheid (titrimetrisch) = 0,1 eenheid (manometrisch)
 spec. act. (E/mgN) = 0,7 spec. act. (μ l CO₂/uur/mg drooggewicht)

2. $DF^{32}P$

Het preparaat werd op het M.B.L. volgens de methode van Oosterbaan en van Rotterdam (34) bereid. De specifieke activiteit was 200 $\mu\text{C}/\text{mg}$ of groter.

3. Papierchromatografie

a. Zuivering van peptiden

Er werd steeds Whatman No. 1 papier gebruikt dat in een dalende opstelling met 2 N HCl (24 uur) en vervolgens met H_2O (2 x 24 uur) gewassen was.

Voor de papierchromatografische zuivering van DP-peptiden werd het peptidemengsel over 10 punten (2,5 cm afstand) van een vel papier (28 x 35 cm) verdeeld (per punt ongeveer 0,3 mg materiaal). Na ontwikkeling in een geschikt solvens werd het chromatogram op een fotografische plaat gelegd (Kodak Medical X-Ray film), waardoor radioactiviteit op het chromatogram kon worden gelokaliseerd (autoradiogram). De strook papier die radioactief materiaal bevatte werd uit het chromatogram geknipt waarna het materiaal van deze strook met H_2O werd geëluëerd in een dalende opstelling. Het eluaat werd glyofiliseerd.

Chromatografie werd bij 25° C uitgevoerd in een van de volgende solventia: de bovenlaag van een mengsel dat bestond uit butanol-azijnzuur-water 4 : 1 : 5 (BAW), butanol verzadigd bij 25° C met water (BW) en fenol bij 18° C verzadigd met H_2O , de chromatografie vond plaats in een ammoniakale atmosfeer (Fenol- NH_3). De stijgende methode werd gebruikt bij chromatografie in BAW (16 uur). Voor chromatografie in BW (40 uur) en Fenol- NH_3 (18 uur) werd de dalende methode gebruikt.

b. Identificatie van aminozuren

Chromatografie werd op 2043 b papier van Schleicher en Schüll uitgevoerd.

Van met zoutzuur verkregen hydrolysaten van peptiden werden meestal hoeveelheden overeenkomend met 0,01 - 0,03 $\mu\text{mol P}$ op papier gebracht. Een testmengsel, waarin de hoeveelheid aminozuren (in μmol) overeenkwam met het aantal $\mu\text{mol P}$ (bepaald aan de hand van het ^{32}P gehalte) van het hydrolysaat, werd steeds daarnaast op het papier gebracht. Bij twee-dimensionale chromatografie werd, nadat het hydrolysaat op het chromatogram was gebracht, met 3 μl van een 30% oplossing van H_2O_2 waarin 0,1% NH_4 -molybdaat was opgelost, geoxydeerd (Pernis en Wunderly (35). Eventueel aanwezig cystine werd daardoor geoxydeerd tot cysteinezuur en methionine tot methioninesulfon. Als solventia werden gebruikt: pyridine- H_2O 8 : 2 (waarbij de chromatografie gedurende 16 uur in een dalende opstelling plaats vond), BAW en Fenol- NH_3 .

Na chromatografie werd het papier besproeid met een ninhydrineoplossing (0,2% ninhydrine in met H_2O verzadigde butanol die 4% azijnzuur bevatte) en 10 minuten bij 90° C in de stoof verhit,

waardoor aminozuren zichtbaar gemaakt werden. Op proline werd afzonderlijk gereageerd met het isatine reagens (0,3% isatine in butanol met 4% azijnzuur) volgens Acher, Fromageot en Jutisz (36). De identiteit van aminozuren werd vastgesteld door de R_f in een twee- of drietal solventia te vergelijken met de R_f -waarden van de mede-gechromatografeerde test-aminozuren.

c. Kwantitatieve analyse

Er werd steeds Whatman No. 1 papier gebruikt. Een hoeveelheid hydrolysaat van het peptide corresponderend met $0,04 \mu\text{mol P}$ werd in een geschikt solvens gechromatografeerd. Een testmengsel waarin de te bepalen aminozuren aanwezig waren in hoeveelheden van $0,04 \mu\text{mol}$ of te verwachten veelvouden hiervan werd mede gechromatografeerd. De bewerking werd in duplo uitgevoerd. Vervolgens werd de bepaling volgens de methode van Boissonnas (27) uitgevoerd. De methode is in de dissertatie van Oosterbaan (14) beschreven.

d. Identificatie van fosforverbindingen

Aan de te identificeren radioactieve fosforverbindingen (H_3PO_4 , O-serinefosfaat en diisopropylfosfaat) werd op het chromatogram een hoeveelheid overeenkomend met $1 \mu\text{g P}$ van de nietradioactieve fosforverbindingen toegevoegd.

Voor chromatografie werden BAW, Fenol- NH_3 en Isoboterzuur- NH_3 (0,5 N) 10 : 6 als solventia gebruikt. Het laatste in een stijgende opstelling gedurende 16 uur. De toegevoegde fosforverbindingen werden volgens de methode van Hanes en Isherwood (37) gekleurd. Daartoe werd het chromatogram met een oplossing besproeid, die 5 ml 60% perchloorzuur, 10 ml 1 N HCl en 25 ml 4% NH_4 -molybdaat aangevuld met water tot 100 ml bevatte, waarna het chromatogram op 90°C gedurende 7 minuten in de stoof werd verhit. De plaats van de radioactieve verbinding werd met behulp van een autoradiogram bepaald.

Indien de blauwe kleur van een fosforverbinding en de zwarting op het autoradiogram na chromatografie in een twee- of drietal solventia volledig samenvielen werd de identiteit bewezen geacht.

e. DNP-derivaten

Voor de zuivering van DNP-peptiden werd gewassen Whatman No. 1 papier gebruikt dat met buffer geïmpregneerd was.

De chromatografie vond plaats in een dalende opstelling bij 25°C in tertiaire amyloalcohol bij 25°C verzadigd met 0,1 M fosfaatbuffer pH 6,7 gedurende 40 uur volgens Blackburn en Löwther (38). Voor de identificatie van DNP-aminozuren werd gebruik gemaakt van 2043 b Schleichel en Schüll papier. Twee solventia werden gebruikt: Biserte-Osteux (39) gedurende 16 - 20 uur dalend en fosfaatbuffer 1,5 M pH 6 (Levy (40)) gedurende 6 uur dalend. DNP-derivaten van aminozuren werden steeds mede-gechromatografeerd op hetzelfde chromatogram. De R_f van het te identifice-

ren produkt werd vergeleken met die van de mede-gechromatografeerde DNP-aminozuren.

f. PTH-derivaten

De volgende solventia werden gebruikt: pyridine-heptaan 7 : 3, stijgend gedurende 6 uur en heptaan-mie-renzuur-butanol (HMB) 4 : 2 : 4 dalend gedurende 6 uur (29). Gewoonlijk werd Whatman No. 1 papier gebruikt. De in de literatuur (29) beschreven impregnering van het papier met stijf sel kon worden weggelaten daar de PTH-aminozuren op het chromatogram werden gelokaliseerd door contactfotografie in ultraviolet licht (Chromatolite als U.V. bron en Gevaert Document Contact als fotografisch materiaal).

4. Kolomchromatografie

De hars Amberlite IRC-50 werd betrokken van British Drug Houses. Het grofkorrelige materiaal werd gemalen in een automatische mortier en gezeefd door een 120 mesh zeef. Daarna werd het poeder in water gesuspendeerd. Het materiaal dat in 30 minuten bezonk werd verzameld. Het suspenderen werd zolang herhaald totdat een heldere bovenstaande vloeistof in 30 minuten werd verkregen.

Voor het gebruik werd de hars enige malen achtereenvolgens gewassen met 2 N NaOH, H₂O, 2 N HCl en H₂O.

De in verdund azijnzuur opgeroerde hars werd in de kolom gebracht en met het elutiemiddel gewassen tot de pH van de opgebrachte en uitstromende vloeistof gelijk was.

Dowex 50 x 8 (200 - 400 mesh, 8% „cross linking”) werd verkregen van The Dow Chemical Company. Voor het gebruik werd gewassen met 2 N NaOH, H₂O, 2 N HCl en H₂O.

5. Papierelektroforese

Deze werd onder tolueen (als koelmedium) volgens Ryle, Sanger, Smith en Kitai (41) uitgevoerd. De opstelling bestond uit een glazen bak (30 x 30, lengte 50 cm) die gevuld was met tegen buffer geëquilibreerde tolueen. In deze bak waren twee glazen bakjes (10 x 10, lengte 20 cm) geplaatst die gevuld werden met buffer en door middel van hevels met de electrodenvaten, die in verband met brandgevaar (vonken) buiten de glazen bak waren opgesteld, in verbinding stonden.

Het materiaal werd op het midden van een strook papier (15 x 44 cm) gebracht, waarna het papier in een glazen standaard werd geklemd zodat de beide uiteinden vrij konden hangen.

Nadat het papier (door opzuigen) met buffer doordrenkt was werd de standaard onder de tolueen gedompeld zodat beide vrije uiteinden van het papier in de met buffer gevulde bakjes hingen. De aangelegde spanning bedroeg 2500 V, het potentiaalverval over het papier was ongeveer 50V/cm. Bij gebruik van pyridine-azijn-

zuur-buffer pH 6,5 (100 ml pyridine, 4 ml azijnzuur en H₂O tot 1000 ml) bedroeg de stroomsterkte 20 mA en bij gebruik van een buffer van pH 3,6 (100 ml azijnzuur, 10 ml pyridine en H₂O tot 1000 ml) bedroeg deze 30 mA.

6. *Reactie met DNFB*

Het peptide (0,01 - 0,03 μ mol) werd in een klein vaatje gelyofiliseerd en daarna opgelost in 0,2 ml van een oplossing die 9 mg DNFB en 7 mg NaHCO₃ in 66% ethanol per ml bevatte. De oplossing werd gedurende 2 uur bij 37° C in het donker geschud. Het volume werd daarna aangevuld tot 1 ml waarna werd geëxtraheerd met ether (3 x 1 ml), na aanzuren met HCl nogmaals met ether (2 x 1 ml) en tenslotte met methylacetaat (3 x 1 ml). De etherextracten bevatten het merendeel van het overtollige DNFB en dinitrofenol. Meestal was vrijwel al het DNP-peptide in het methylacetaat aanwezig.

7. *Volledige hydrolyse van peptiden*

Het peptide werd opgelost in 0,1 - 0,2 ml 6 N HCl en in een gesloten pyrexampul gedurende 16 - 18 uur bij 105° C verhit. Na afloop van de hydrolyse werd de zoutzure oplossing boven KOH in vacuo gedroogd.

8. *De „Edman reactie”*

Het DP-peptide (0,1 - 1 μ mol) werd opgenomen in 3 ml 50% (v/v) dioxaanoplossing waaraan 0,1 ml fenylisothiocyanaat werd toegevoegd. De pH van de oplossing werd vervolgens op 9,0 gebracht met NaOH. De koppeling werd gedurende 2 uur bij 40° C en pH 8,7 - 9,0 uitgevoerd, het inhomogene mengsel werd geroerd door langzaam doorstromen van stikstof. Na afloop van de reactie werd het mengsel tweemaal uitgeschud met eenzelfde volume cyclohexaan en vervolgens zes maal met eenzelfde volume benzeen, waardoor dioxaan en fenylisothiocyanaat werden verwijderd. De waterige oplossing werd in bevroren toestand in vacuo boven KOH gedroogd waardoor sporen benzeen werden verwijderd.

9. *Gebruikte chemicaliën*

Pepsine, 2 maal gekristalliseerd produkt (Nutritional Biochemicals Corporation).

2,4-dinitrofluorobenzeen (Hoffmann-La Roche).

Ether, peroxyde vrij. Ether uitgeschud met vochtig FeSO₄ en na destilleren boven droog FeSO₄ bewaard.

Dioxaan, peroxyde vrij. Refluxen gedurende 10 uur met Na, na destilleren bij -20° C bewaard.

PTH-aminozuren en DNP-aminozuren bereid volgens Fraenkel-Conrat, Harris en Levy (29). De bereide producten hadden de in de literatuur opgegeven smeltpunten. Ook N-DNP-O-fosforylserine werd volgens deze methode bereid uit O-serinefosfaat:

Carboxypeptidase suspensie, een drie maal gekristalliseerd pro-

dukt (Worthington Biochemicals Sales Co.) werd nogmaals omgekristalliseerd en als suspensie in water met 1‰ DFP bewaard. Isonitrosoaceton werd volgens Fréon (42) bereid en door sublimatie gezuiverd (smpt. 67° C).

Oplosmiddelen werden voor het gebruik gedestilleerd.

Aminozuren (Hoffmann-La Roche).

Fenylisothiocyanaat (British Drug Houses).

O-serinefosfaat werd bereid volgens Plimmer (43) en ook volgens Plapinger en Wagner Jauregg (30).

Diisopropylfosfaat werd uit diisopropylfosforochloridaat (McCombie Saunders en Stacey (44)) door hydrolyse met Ba(OH)₂ verkregen.

Het Ba werd met H₂SO₄ neergeslagen, waarna uit de aangezuurde oplossing diisopropylfosfaat met ether werd geëxtraheerd en gekristalliseerd. Smpt. 25 - 26° C. P gevonden 16,9% (theoretisch 17,03%).

Butylpyruvaat werd bereid door azeotropisch veresteren volgens Vogel (45) (kpt. 68° C/13 mm).

Cotazymoplossing. 3 tabletten cotazym (Organon, Oss) werden gesuspendeerd in 10 ml H₂O. Vervolgens werd de oplossing gedurende 2 x 24 uur bij 4° C gedialyseerd en gecentrifugeerd. De bovenstaande vloeistof werd in bevroren toestand bewaard.

ALGEMENE BESPREKING VAN DE RESULTATEN

Het onderzoek over de remming van ali-esterase door DFP vormt een onderdeel van het werk dat in het Medisch Biologisch Laboratorium verricht wordt over de reactie van DFP met esterasen. In deze discussie zullen ook de gegevens, die uit dit werk reeds voortvloeiden, betrokken worden. Aldus wordt het mogelijk onze resultaten bevredigend te interpreteren en te bepalen in hoeverre deze hebben bijgedragen tot een vermeerdering van de kennis op het onderhavige gebied.

De remming van ali-esterase door DFP berust op eenzelfde mechanisme als de remming van andere esterasen door DFP; de enzymactiviteit verdwijnt t. g. v. de invoering van één of mogelijk meer DP-groepen in het enzym. Bij onze zuiverste ali-esterasepreparaten werd steeds op een hoeveelheid eiwit van ongeveer 10^5 gram een hoeveelheid fosfor van slechts 1 gram atoom gebonden; hieruit volgt, dat de reactie met DFP zeer specifiek is. Het aantal DP-groepen dat per molecuul ali-esterase gebonden was kon echter niet berekend worden omdat onafhankelijke gegevens over het moleculaire gewicht van het enzym niet verkregen werden. Echter werd voor ali-esterasepreparaten met een verschillende specifieke enzymactiviteit eenzelfde turnover-getal gevonden. Tevens is gebleken dat bij de afbraak van DP-ali-esterase met pepsine hoofdzakelijk één DP-peptide (80-90% opbrengst) ontstond. Hieruit volgt dat één bepaalde structuur met DFP gereageerd heeft.

Zoals reeds in de Inleiding werd uiteengezet zijn er redenen om te veronderstellen, dat de groepen in esterasen die zich met DFP binden van belang zijn voor de enzymwerking. De beschermende werking van een substraat van ali-esterase (butylpyruvaat) tegen de binding met DFP en de resultaten verkregen bij reactivering van het DP-ali-esterase, waarbij gevonden werd dat het herstel van de enzymactiviteit parallel verloopt met het verwijderen van de DP-groepen, zijn sterke aanwijzingen dat er een nauw verband bestaat tussen de groep die met DFP reageert en het actieve centrum.

Bij het onderzoek over de DFP-bindende groep van ali-esterase werd evenals bij andere esterasen analytisch chemisch te werk gegaan met het doel gegevens over de structuur van deze groep te verkrijgen. De methode berust op een afbraak van de DP-esterasen met behulp van proteolytische enzymen waarbij DP-peptiden ontstaan, die nader werden geanalyseerd. Uiteraard wordt bij deze wijze van onderzoek verondersteld dat de onderzochte DP-peptiden overeenkomen met dat gedeelte van de polypeptideketen

van het DP-esterase waaraan de DP-groep gebonden is. Het is a priori immers niet uitgesloten dat er in de wijze van binding van de DP-groep of in de omringende aminozuurstructuur veranderingen zullen optreden, direct na de reactie met DFP, tijdens de proteolytische afbraak van het DP-esterase (transpeptidering of transfosforylering) of bij de isolatie van het DP-peptide. Uit verschillende DP-esterasen worden echter (vaak door gebruik te maken van verschillende proteolytische enzymen) DP-peptiden verkregen die een nauw verwante aminozuursamenstelling hebben zoals blijkt uit de gegevens van Tabel XII. Deze overeenkomst suggereert dat de DP-peptiden een in al deze esterases voorkomende nauw verwante chemische structuur vertegenwoordigen, die van belang is voor de twee karakteristieke eigenschappen die deze enzymen gemeen hebben n.l. het binden van DFP en het splitsen van esters.

Tabel XII

Aminozuursamenstelling van DP-peptiden uit DP-esterasen

esterase	proteolytisch agens	Gly.	Ala.	Glu.	Asp.	Ser.	Leu.	Val.	Pro.	Phe.
chymotrypsine	cotazym	3			1	1	1			1
trypsin	cotazym	2-3			1	1		1		1
ali-esterase	cotazym	2-3	1	2		1-2	1			1
ali-esterase	pepsine	3	1	2		2				
pseudo-cholin-esterase *	pepsine	1	3-4	1		1				?

* De getallen geven het aantal aminozuur residuën per gebonden P. Het peptide van pseudo-cholinesterase bevat waarschijnlijk een monoisopropylfosforyl- i.p.v. een diisopropylfosforylgroep.

De peptidestructuur in de omgeving van de DP-groep van DP-ali-esterase kon worden bepaald aan de hand van een uit DP-ali-esterase met pepsine verkregen DP-peptide. Bij een vergelijking van deze structuur met de overeenkomstige structuur van DP-chymotrypsine (14) blijkt dat de aminozuur volgorde:

-glycyl-tweebasisch aminozuur-O. DP. seryl-glycyl (of alanyl)-glycyl in beide DP-esterasen voorkomt.

Enige moeilijkheden werden ondervonden bij de bepaling van de positie van de DP-groep. Hoewel uit de DP-peptiden van ali-esterase en chymotrypsine (14) na partiële hydrolyse met zoutzuur O-serinefosfaat verkregen werd, bewijst dit nog niet dat de DP-groep aan het hydroxyl-O-atoom van serine gebonden is. Zoals in Hoofdstuk IV werd uiteengezet zou O-serinefosfaat eveneens uit de DP-peptiden kunnen ontstaan indien hierin een esterbinding voorkomt en de DP-groep aan de NH₂-groep van serine gebonden is (zie structuur II blz. 43).

Uit het DP-peptide van ali-esterase werd echter na „Edman degradatie” een DP-serylpeptide verkregen (een peptide met een eindstandige serine), waarvan de NH_2 -groep vrij en dus niet gefosforyleerd was. De isolatie van N-dinitrofenyl-O-fosforyl-serine uit een hydrolysaat van het met dinitrofluorobenzeen gekoppelde DP-seryl-peptide wijst weer op een DP-O-binding. Dergelijke experimenten uitgevoerd met het DP-peptide van chymotrypsine hadden hetzelfde resultaat (48). Ook de destructie die het gefosforyleerde serineresidu van de DP-peptiden van ali-esterase en chymotrypsine (14) ondergaat bij opeenvolgende verhitting met alkali en zuur, is een sterke aanwijzing dat de OH-groep van serine gefosforyleerd is. Uit recente experimenten met het DP-peptide van chymotrypsine (48) is gebleken dat na afsplitsen van de DP-groep met alkali het serineresidu overgaat in een dehydro-alanineresidu. Een dergelijke dehydratatie van O-gefosforyleerde serinederivaten is uit de literatuur (31) wel bekend.

Er is dus alle reden om aan te nemen dat in DP-ali-esterase, DP-chymotrypsine en misschien ook in andere DP-esterasen (zie Tabel XII) eenzelfde chemische structuur voorkomt die een O-gefosforyleerd serineresidu bevat.

De bijzondere reactiviteit van deze structuur t. o. v. het fosforylerende reagens DFP kan niet op eenvoudige wijze uit de verkregen resultaten worden verklaard. Serine of andere in het peptide voorkomende aminozuren reageren in waterige oplossing niet met DFP. Het is ook niet waarschijnlijk dat de structuur -glycyl-glutamyl-seryl- op zichzelf met DFP zou kunnen reageren daar deze structuur tweemaal in het ali-esterase DP-peptide voorkomt, terwijl slechts één serineresidu reageert.

Uit de literatuur (23, 24) blijkt dat behalve serine ook de imidazolring van histidine een belangrijke functie heeft bij de reactie van esterassen met DFP. De afwezigheid van histidine in de DP-peptiden (Tabel XII) lijkt hiermee in strijd te zijn. Het is echter zeer wel mogelijk dat ook groepen, die door een lange aminozuurketen van het serine gescheiden zijn, door de schroefvormige structuur van het actieve enzym toch in de nabijheid van serine liggen. De sterke reactiviteit van serine zou behalve door naburige groepen in de polypeptideketen mede door deze groepen veroorzaakt kunnen worden.

Wij achten het echter onwaarschijnlijk dat histidine als primaire plaats van binding van de DP-groep van belang is zoals door Jandorf et al. (23) gepostuleerd is o. a. op grond van de verschijnselen die werden waargenomen bij reactivering van DP-esterasen. Zoals bekend kunnen met DFP geremde esterassen worden gereactiveerd wanneer zij korte tijd na de reactie met DFP met bepaalde reagentia worden behandeld. Na langere tijd is een stabilisatie van de enzym-DP-binding opgetreden waardoor reactivatie onmogelijk wordt. Jandorf et al. nemen aan dat DFP met histidine reageert tot diisopropylfosforylimidazol waarna door een geleidelijke verplaatsing van de DP-groep naar de serine hydroxylgroep stabilisatie zou optreden. Bij bewaren van DP-ali-esterase treedt een stabilisatie van de enzym-DP-binding niet

op. Wel kan deze binding door denaturatie gestabiliseerd worden. Er is geen reden te veronderstellen dat de vervorming van het esterase-molecuul een verplaatsing van de DP-groep tengevolge heeft. Waarschijnlijker is dat de stabiliteit van de enzym-DP-binding afhangt van de structuur van de omgeving van de DP-groep. Het is niet onmogelijk dat ook bij andere DP-esterasen de stabilisatie van de enzym-DP-binding toegeschreven moet worden aan denaturatie van het eiwitmolecuul.

Over het verband tussen de DFP-bindende en ester-splitsende werking van esterases werd door Wilson (46) de volgende hypothese naar voren gebracht. De estersplitsing zou in twee opeenvolgende reacties verlopen. Aanvankelijk zou het enzym met de ester reageren tot een geacyleerd enzym, waarbij een alcohol vrijkomt. Het geacyleerde enzym zou met water reageren, waarbij een zuur gevormd wordt en het enzym vrijkomt. Bij de binding van het enzym met DFP zou een gefosforyleerd enzym ontstaan dat in tegenstelling tot een geacyleerd enzym, in water stabiel is. Reagentia die sterker nucleofiel zijn dan water zouden echter wel met het gefosforyleerde enzym reageren, hetgeen de oorzaak zou zijn van de reactivering.

De experimenten van Balls en Woods (47) verleenden sterke steun aan deze hypothese. Deze onderzoekers toonden aan dat de splitsing van het substraat p-nitrofenylacetaat door het esterase chymotrypsine in twee opeenvolgende reacties verloopt. Zij konden het geacetyleerde enzym isoleren door de reactie bij pH 5 uit te voeren (per enzym-molecuul werd één acetylgroep gebonden). Het geacetyleerde chymotrypsine reageerde bij pH 7,5 snel met water onder vorming van azijnzuur en oorspronkelijk enzym.

Het voorgaande kan voorlopig als volgt worden geïnterpreteerd. In verschillende esterases komt eenzelfde reactieve chemische structuur voor, waarin de hydroxylgroep van serine een essentiële functie heeft. Op grond van de grote reactiviteit van de hydroxylgroep t. o. v. het fosforylerende reagens DFP zou men kunnen veronderstellen dat deze groep tevens als acceptor van de acylgroep van het substraat dient tijdens de door het enzym gekatalyseerde estersplitsing. De sterke reactiviteit van de serine-hydroxylgroep is natuurlijk op zichzelf niet voldoende om de gehele enzymwerking te verklaren. Het ligt voor de hand dat men bij het opstellen van hypothesen hieromtrent rekening houdt met het feit dat de aminogroep van het reactieve serineresidu altijd gekoppeld is aan een tweebasisch aminozuur, zodat er naast een OH-groep steeds een vrije COOH-groep aanwezig is. Deze gegevens passen in de aantrekkelijke hoewel vooralsnog speculatieve hypothese dat het actieve centrum van het esterase een reactieve esterstructuur bevat, waarin de serine-hydroxylgroep en de vrije carboxylgroep betrokken zijn. Deze esterstructuur zou met het substraat kunnen uitwisselen (transesterificatie) en aldus via een aantal stappen, o.a. een geacyleerd enzym, tot estersplitsing kunnen leiden. Alle esterases zouden krachtens deze hypothese een dergelijke interne esterstructuur bezitten. De substraat-specificiteit zou worden bepaald door de structuur van het actieve centrum in de buurt van de interne ester.

SUMMARY

According to present generally accepted views a close relationship exists between the active centres and DFP-binding sites of esterases. Consequently a study on the reaction of esterases with DFP could provide valuable information on the mechanism of action of esterases. The present thesis which is part of the investigations carried out on this subject in the Medical Biological Laboratory of the National Defence Research Council T. N. O. deals with the reaction of DFP and horse liver ali esterase.

The purification of ali esterase is described in chapter I. The results with zone electrophoresis on columns and ultracentrifugation indicate that the preparations obtained are homogeneous. There is however reason to believe that complete purification has not been achieved.

The analogy between the reaction of ali esterase with DFP and that of other esterases with DFP follows clearly from the results described in chapter II. During the reaction of ali esterase and DFP diisopropylphosphoryl groups (DP-groups) are bound to the enzyme resulting in the inhibition of the enzymatic activity. Only one gram atom of P was bound to about 10^5 gram of protein after complete inhibition of our purest enzyme preparation with DFP, suggesting a very specific reaction. Evidence was obtained that one definite structure in the ali esterase preparation reacts with DFP.

The results from chapter III provide strong support for the supposition that the DFP-binding site of ali esterase is an essential part of the active centre. Incubation of ali esterase with a substrate of high affinity (butylpyruvate) prevented the inhibition by DFP. Moreover it was shown that dephosphorylation of the DP-enzyme with isonitrosoacetone paralleled the recovery of the enzyme activity. It is well known that on prolonged incubation, DP-esterases can usually no longer be reactivated ("ageing").

With DP-ali esterase reactivation was evident even after 48 hours of incubation. It is suggested that the process of "ageing" is a result of a distortion of the active centre rather than a migration of the DP-group as assumed by others.

Structural analysis of the DFP-binding site of ali esterase is described in chapter IV. The method is based on proteolysis of the $D^{32}P$ -labelled ali esterase with proteolytic enzymes, assuming that the radioactive fragments in the peptide mixture resulting on proteolysis represent at least part of the DFP-binding site. Preliminary experiments showed that DP-ali esterase can be broken down with a mixture of pancreatic enzymes. From the mixture obtained a peptide carrying the DP-group (DP-peptide) could be isolated. The amino acid composition of the DP-peptide

(alanine, glycine, glutamic acid, serine, proline and leucine) is strikingly similar to the amino acid composition of DP-peptides obtained from DP-pseudo cholinesterase, DP-trypsin and DP-chymotrypsin. These facts suggest that different esterases have an identical or at least similar structure in common. It is tempting to correlate this structure with the ability of esterases to combine with DFP and to hydrolyse esters.

Proteolysis of DP-ali esterase with pepsin resulted in essentially one DP-peptide in a high yield (80-90%). This peptide was used for further structural analysis of the DFP-binding site of ali esterase. The DP-peptide was isolated by means of column chromatography on 'cation exchange' resins, paper chromatography and paper electrophoresis. The purity of the DP-peptide could be determined from quantitative amino acid analysis and from the observation that per bound P one free NH₂-group was present. The first and second amino acid from the NH₂ terminal amino acid end of the DP-peptide could be identified as glycine and glutamic acid, respectively using Edman's selective degradation procedure. The purity of the shortened peptide (DP-seryl peptide) obtained after two successive Edman degradations was determined from quantitative amino acid analysis. Sanger's procedure was used for the identification of the NH₂ terminal amino acid of the DP-seryl peptide which was an O-phosphorylated serine. This result is in accordance with the isolation of O-serinephosphate from a partial acid hydrolysate of the DP-peptide. It is however realised that the formation of O-serinephosphate does not provide full evidence for a DP-O bond (N-O migration could have occurred on acid treatment). The amino acids next to serine could be identified from fragments obtained on partial hydrolysis of the DP-peptide. One of these fragments was an O-phosphorylated seryl-alanine dipeptide; another fragment was an O-phosphorylated seryl-alanyl-glycyl-glycine. The position of a carboxyl terminal serine and a preceding glutamic acid was established from results obtained by degradation of the DP-peptide with carboxypeptidase. The complete structure of the peptide is

glycyl-glutamyl-O. DP. seryl-alanyl-glycyl-glycyl-glutamyl-serine.

The results obtained on alkaline treatment of the DP-peptide give strong support for the position of the DP-group as indicated. On alkaline treatment of the DP-peptide the phosphor containing group was split off and identified as diisopropyl phosphate. The phosphorylated serine residue was absent in an acid hydrolysate of the alkaline treated peptide. From other experiments in this laboratory evidence was obtained that on elimination of the DP-group with alkali the serine residue is converted into a dehydroalanine residue, a mechanism well known with O-phosphorylated serine derivatives.

A comparison of the structure in the vicinity of the DP-group of DP-ali esterase with a corresponding structure of DP-chymotrypsin shows that the amino acid sequence

glycyl-twobasic amino acid- seryl-alanyl-(or glycyl)-glycyl

is present in both enzymes.

It is suggested that this sequence is present in all esterases and forms part of the active centre. The presence of a free carboxyl group in the vicinity of a hydroxyl group led to the hypothesis that a reactive ester structure is present in these enzymes. Exchange of the substrate with the internal reactive ester (trans-esterification) could be one of the first steps in enzymatic ester splitting. According to the hypothesis all enzymes with an esterase action have this bond-breaking mechanism in common. The substrate specificity can be ascribed to the structure of the active centre in the sterical surroundings of the internal ester.

L I T E R A T U U R

1. R. R. Porter, *The proteins* Vol. 1B, Ed. H. Neurath en K. Bailey, Academic Press Inc., New York (1953).
2. H. S. Olcott en H. Fraenkel-Conrat, *Chem. Revs.* 41, 151 (1947).
3. F. W. Putnam, *The Proteins* Vol. 1B, Ed. H. Neurath en K. Bailey, Academic Press Inc., New York (1953).
4. S. M. Kalman, K. Linderstrøm-Lang, M. Ottesen en F. M. Richards, *Biochim. Biophys. Acta* 16, 297 (1955).
5. W. I. Rogers en G. Kalnitsky, *Biochim. Biophys. Acta* 23, 525 (1957).
6. A. K. Balls en E. F. Jansen, *Advances in Enzymology* Vol. XIII, Ed. F. Nord, Interscience Publ. Inc., New York (1952).
7. I. B. Wilson en S. Ginsburg, *Biochim. Biophys. Acta* 18, 168 (1955).
8. D. R. Davies en A. L. Green, *Biochem. J.* 63, 529 (1956).
9. J. A. Cohen en M. G. P. J. Warringa, *Biochim. Biophys. Acta* 11, 52 (1953).
10. J. A. Cohen, R. A. Oosterbaan, M. G. P. J. Warringa en H. S. Jansz, *Discussions Faraday Soc.* No. 20, 114 (1955).
11. N. K. Schaffer, S. C. May en W. H. Summerson, *J. Biol. Chem.* 202, 67 (1953).
12. J. A. Cohen, R. A. Oosterbaan en M. G. P. J. Warringa, *Biochim. Biophys. Acta* 18, 228 (1955).
13. R. A. Oosterbaan, H. S. Jansz en J. A. Cohen, *Biochim. Biophys. Acta* 20, 402 (1956).
14. R. A. Oosterbaan, *Dissertatie*, Leiden (1956).
15. N. K. Schaffer, L. Simet, S. Harshman, R. R. Engle en R. W. Drisko, *J. Biol. Chem.* 225, 197 (1957).
16. W. M. Connors, A. Pihl, A. L. Dounce en E. Stotz, *J. Biol. Chem.* 184, 29 (1950).
17. J. C. Bournsnel en E. C. Webb, *Nature* 164, 875 (1949).
18. J. Burch, *Biochem. J.* 58, 415 (1954).
19. J. Porath, *Biochim. Biophys. Acta* 22, 151 (1956).
20. O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr en R. J. Randall, *J. Biol. Chem.* 193, 265 (1951).
21. E. C. Webb, *Bioch. J.* 42, 96 (1948).
22. Onderzoek M. B. L., niet gepubliceerd.
23. B. J. Jandorf, H. O. Michel, N. K. Schaffer, R. Egan en W. H. Summerson, *Discussions Faraday Soc.* No. 20, 134 (1955).
24. T. Wagner-Jauregg, *Arzneimittel Forschung* 4, 527 (1954).
25. P. Edman, *Acta Chem. Scand.* 4, 277, 283 (1950).
26. N. K. Boardman en S. M. Partridge, *Biochem. J.* 59, 543 (1955).
27. R. A. Boissonnas, *Helv. Chim. Acta* 33, 1975 (1950).
28. F. Sanger, *Biochem. J.* 39, 507 (1945) en 45, 563 (1949).
29. H. Fraenkel-Conrat, J. I. Harris en A. L. Levy, *Methods of Biochemical Analysis* Vol. 2, Interscience Publ. Inc., New York (1955).
30. R. E. Plapinger en T. Wagner-Jauregg, *J. Am. Chem. Soc.* 75, 5757 (1953).
31. G. Riley, J. H. Turnbull en W. Wilson, *Chem. and Ind.* 1181 (1953).
- G. Riley, J. H. Furnbull en W. Wilson, *J. Chem. Soc.* 1373 (1957).

32. G.H. Beaven en E.R. Holiday, *Advances in Protein Chemistry* Vol. VII, Academic Press Inc., New York (1952).
33. J.A. Cohen, F. Kalsbeek en M.G.P.J. Warringa, *Proc. Koninkl. Nederl. Akad. Wetensch.* 51, 598 (1948).
34. R.A. Oosterbaan en J. van Rotterdam, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5641 (1956).
35. B. Pernis en C.H. Wunderly, *Biochim. Biophys. Acta* 11, 209 (1953).
36. R. Acher, C. Fromageot en M. Jutisz, *Biochim. Biophys. Acta* 5, 81 (1950).
37. C.S. Hanes en F.A. Isherwood, *Nature* 164, 1107 (1949).
38. S. Blackburn en A.G. Lowther, *Bioch. J.* 48, 126 (1951).
39. G. Biserte en R. Osteux, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33, 50 (1951).
40. A.L. Levy, *Nature* 174, 126 (1954).
41. A.P. Ryle, F. Sanger, L.P. Smith en R. Kitai, *Biochem. J.* 60, 541 (1955).
42. P. Fréon, *Ann. Chim.* 11, 453 (1939).
43. R.H.A. Plimmer, *Bioch. J.* 35, 461 (1941).
44. H. McCombie, B.C. Saunders en G.J. Stacey, *J. Chem. Soc.* 380 (1945).
45. A.I. Vogel, *Practical Organism Chemistry*, Longmans, Green en Co., London 1946, blz. 382.
46. I.B. Wilson, *A Symposium on the Mechanism of Enzym Action*, Ed. W.B. Elroy en B. Glass, The Johns Hopkins Press, Baltimore (1954).
47. A.K. Balls en H.N. Wood, *J. Biol. Chem.* 219, 245 (1956).
48. Te verschijnen publikatie van R.A. Oosterbaan, P. Kunst, J. van Rotterdam en J.A. Cohen in *Biochim. Biophys. Acta*.

NAWOORD

In overeenstemming met de wens van de Faculteit der Wis- en Natuurkunde volgt hier een kort overzicht van mijn universitaire studie.

Ik begon mijn studie aan de Vrije Universiteit te Amsterdam in september 1946, waar in december 1950 het kandidaatsexamen Wis- en Natuurkunde (f) en in december 1953 het doctoraalexamen Scheikunde werden afgelegd. Het hoofdvak was organische chemie met de uitbreiding analytische chemie. Het bijvak fysiologische chemie werd gekozen uit belangstelling voor de medisch-biologische grensgebieden van de chemie.

Vanaf oktober 1952 tot april 1954 werkte ik in het Laboratorium voor Massaspectrografie te Amsterdam mede aan onderzoekingen over het scheiden van stabiele isotopen.

Gedurende de militaire diensttijd werd ik geplaatst bij het Medisch Biologisch Laboratorium te Rijswijk alwaar onder de inspirerende leiding van de directeur van dit laboratorium Prof. Dr. J. A. Cohen werd aangevangen met het in het proefschrift beschreven onderzoek. Daarbij werd een dankbaar gebruik gemaakt van de vele methoden die vooral door Dr. R. A. Oosterbaan reeds voor soortgelijk eiwit-onderzoek waren opgezet.

Van de velen die tot de totstandkoming van dit proefschrift hebben bijgedragen moge met name worden genoemd Mej. P. Kunst, Mej. C. H. Posthumus, en de heer F. Kouwenberg.

Tenslotte dank ik het Bestuur van de Rijksverdedigings organisatie T. N. O. voor de toestemming tot publikatie van dit onderzoek.