

I 1472

**DE ENZYMOLOGIE EN REGULERING
VAN HET METABOLISME VAN ATROPINE
IN PSEUDOMONAS PUTIDA**

STELLINGEN

Voor het tot stand komen van inductie van enzym-synthese in micro-organismen kan het noodzakelijk zijn dat de inducerende verbinding endogeen wordt gevormd, zodat inductie niet optreedt wanneer dezelfde verbinding in het medium wordt aangeboden.

B. Müller - Hill, H.V. Rickenberg en K. Wallenfels, J. Mol. Biol., 10 (1964) 303.

Uit de specifieke radio-activiteit van basen in RNA^{2/} dat tijdens een leerproces in in hersencellen is gesynthetiseerd, kan men niet zonder meer gevolgtrekkingen maken omtrent de samenstelling van het RNA.

V.E. Shashoua, Nature, 217 (1968) 238.

Bij het gebruik van aminozuur- en nucleotide-analoga voor de bestudering van de regulering van eiwitsynthese dient men er op bedacht te zijn, dat het effect van een analogon voor de individuele eiwitten verschillend kan zijn.

S. Schlesinger, J. Biol. Chem, 243 (1968) 3877. J. Horowitz en V. Kohlmeier, Biochim. Biophys. Acta, 142 (1967) 208.

De argumenten van Commoner, dat biochemische specificiteit bij overerving mede wordt bepaald door cytoplasmatische factoren, doen geen afbreuk aan de theorie dat nucleïnezuuren de enige dragers zijn van de erfelijke eigenschappen.

B. Commoner, Nature, 220 (1968) 334.

Bij het localiseren van het leucine-bindende eiwit in Escherichia coli hebben Nakane en medewerkers ten onrechte geen aandacht besteed aan de mogelijke impermeabiliteit van de bacterie-membraan voor het gebruikte anti-serum.

P.K. Nakane, G.E. Nichoalds en D.L. Oxender, Science, 161 (1968) 182.

Bij de bestudering van de kinetiek van de enzymatische hydrogenering van dihydroxy-fumaarzuur wordt door Kohn en Jacoby onvoldoende rekening gehouden met de keto-enol tautomerie van deze verbinding.

L.D. Kohn en W.B. Jacoby,
J. Biol. Chem., 243 (1968) 2472.

Een sigmoïde vorm van de curve, die de afhankelijkheid weergeeft van de enzym-activiteit van de substraat-concentratie, kan ook door een ander dan door een coöperatief effect worden veroorzaakt.

Regulation of enzyme activity and allosteric interactions. Proc. 4th meeting of the Fed. of European Biochem. Societies Oslo 1967, Ed. E. Kvamme e.a., Londen, Acad. Press 1968.

Het is gewenst dat in de Koninklijke Besluiten krachtens de Warenwet de eis: „schadelijke stoffen mogen niet aanwezig zijn” nader wordt gepreciseerd.

Warenwet 1935, Stb. 793; editie Schuurmans en Jordens, no 99.

Bij het ontvouwen van verwachtingen omtrent de toekomstige ontwikkelingen van de wetenschap dient men zich — speciaal voor een niet-deskundig publiek — te hoeden voor een vermenging van science-fiction en futurologie.

A.H.J. Thiadens, Chem. Weekbl. 30-5-'69.

18 juni 1969

W.F. Stevens.

DE ENZYMOLOGIE EN REGULERING VAN HET METABOLISME VAN ATROPINE IN PSEUDOMONAS PUTIDA

PROEFSCHRIFT

**TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN DOCTOR IN DE
WISKUNDE EN NATUURWETENSCHAPPEN AAN DE RIJKS-
UNIVERSITEIT TE LEIDEN, OP GEZAG VAN DE RECTOR
MAGNIFICUS DR L. KUKENHEIM Ezn, HOOGLERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN, TEN OVERSTAAN VAN EEN
COMMISSIE UIT DE SENAAT TE VERDEDIGEN OP WOENSDAG
18 JUNI 1969 TE KLOKKE 16.15 uur**

DOOR

WILLEM FRANS STEVENS

GEBOREN TE 'S HERTOGENBOSCH IN 1941

PROMOTOR: PROF. DR A. RÖRSCH

Aan mijn ouders
Aan Yvonne

*Atropos, gij waart godin van het noodlot en vrees'lijke rampspoed
Gij waart bij machte ten gronde te richten, gij hād een onzalige invloed
Door tot de vader van goden en mensen het onheil te fluist'ren,
Hiermee de sterv'ling voorgoed aan zijn blinde bestemming te kluist'ren
En als extract van bell'donna verwijdend het oog der beminde,
Zodat gij aanstaande man alswel vrouw in hun keuze verblindde*

*Welk lot brengt Ú een bacil, die uit Hades rijk vrij is gegeven,
Die in haar hānden de schaar heeft, die knipt aan de draad van uw leven.*

INLEIDING

De afbraak van een chemische verbinding in een organisme komt tot stand door een opeenvolging van enzymatisch gekatalyseerde reacties, waardoor de verbinding volgens een vast patroon, de stofwisselingsketen, wordt afgebroken. Het organisme is veelal in staat de synthese en activiteit van de hierbij betrokken enzymen te reguleren, waardoor de cel over het vermogen beschikt de metabolische capaciteit van een dergelijke stofwisseling aan de behoefte aan te passen.

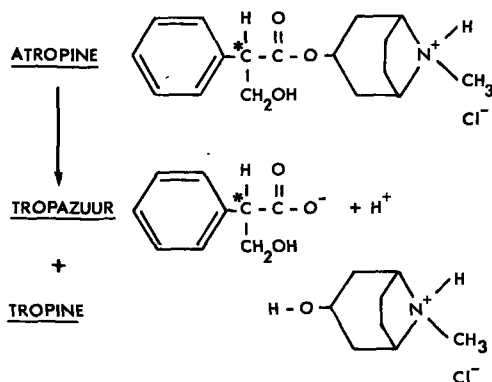
In dit proefschrift wordt een onderzoek beschreven naar het metabolisme van het alkaloïde atropine in een *Pseudomonas putida*; hierbij is onderzocht via welke stofwisselingsketen atropine in de bacterie wordt afgebroken en welke enzymen hierbij betrokken zijn. Bovendien is nagegaan op welke wijze de regulering van deze metabolische activiteit in de cel tot stand komt.

Atropine is een alkaloïde, dat in de natuur voorkomt o.a. in de vruchten van *Atropa belladonna* L. en van andere leden van de familie van de Solanaceae. De giftigheid van extracten van deze vruchten is sinds mensenheugenis bekend (Hippocrates 400 a. Chr.); men associeerde het werkzame bestanddeel hierin met de noodlots-godin Atropos, die het leven verlamde door de levensdraad door te knippen.

De werking van atropine berust op een verstoring van de overdracht van de zenuwprikkels in het parasympatische zenuwstelsel. Op grond van deze werking heeft de verbinding belangrijke farmacologische toepassingen gekregen, ondermeer als antidotum bij vergiftigingen met organische fosforverbindingen waartoe vele insecticiden (o.a. parathion) en chemische strijdmiddelen behoren.

Vanwege deze toepassing is op het Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO (M.B.L.) een onderzoek geëntameerd naar de fysiologische werking van atropine. Hierbij ging de belangstelling o.a. uit naar de interactie van atropine met de atropine-gevoelige receptor, d.i. de structuur door interactie waarmee in vivo de verstoring van de prikkeloverdracht door atropine tot stand komt. Biochemisch onderzoek van deze structuur is tot op heden niet mogelijk doordat de receptor uitsluitend in situ kan worden herkend. Om deze reden is gezocht naar een beter toegankelijke biologische structuur, die een specifieke interactie met atropine vertoont en die wellicht als een beperkt model-systeem voor de atropine-gevoelige receptor zou kunnen dienen.

Uit de literatuur was bekend, dat in konijneserum een enzym voorkomt, dat de ester atropine splitst in de zuur-component tropazuur en de alcohol-component tropine.



Dit enzym is echter een tamelijk α -specifiek esterase dat bovendien nauwelijks voor enzymologisch onderzoek toegankelijk bleek te zijn vanwege de geringe atropine-esterase-activiteit in nederlandse konijnen.

Een beter studie-object kwam ter beschikking toen Rörsch en Berends in 1965 er in slaagden uit een grondmonster, dat genomen was tussen de wortels van de *Atropa belladonna*, een bacterie te isoleren, die in staat was te groeien in een synthetisch medium met atropine als enige koolstofbron. Deze bacterie, aangeduid met PMBL-1, werd door Bartlema en Wensinck geïdentificeerd als een *Pseudomonas putida* biotype A. Rörsch en Berends toonden aan dat *Pseudomonas* PMBL-1, gekweekt met atropine als koolstofbron, een atropine-esterase bevat. Voorts toonden zij aan dat dit bacteriële enzym specifiek is voor atropine en zeer geschikt zou zijn voor enzymologisch onderzoek.

Het atropine-esterase bleek te worden geremd door verschillende organische fosfor-verbindingen zoals diisopropyl fosforofluoridaat (DFP). Dit deed vermoeden dat het esterase behoort tot een groep enzymen, de z.g. serine-esterasen, die door organofosfaten worden geremd en waarvoor is aangetoond, dat deze remming berust op een reactie van het organofosfaat met een bijzonder reactief serine-residu, dat deel uitmaakt van het katalytisch centrum van het enzym.

Aan deze „serine-esterasen” is ondermeer in het M.B.L. gedurende de laatste 20 jaar intensief onderzoek verricht (J.A. Cohen, R.A. Oosterbaan, H.S. Jansz, F. Berends, 1959). Omdat de reactie van het organofosfaat met het serine-residu kan worden gebruikt om het werkings-mechanisme van deze esterassen te bestuderen, heeft dit onderzoek belangrijk bijgedragen aan de huidige kennis van de enzymatische hydrolyse.

Het atropine—esterase uit *Pseudomonas* PMBL—1 bood, vanwege de specificiteit van dit enzym voor atropine en gezien de remming door organofosfaten goede vooruitzichten als model voor de atropine—gevoelige receptor en als nieuwe vertegenwoordiger van de serine—esterasen. Hierbij zou de bacteriële oorsprong van het enzym het voordeel kunnen bieden, dat wellicht mutanten van de bacterie kunnen worden geïsoleerd, die een atropine—esterase produceren met kleine veranderingen in het eiwit—molecule. Door bestudering van het effect van deze veranderingen op de interactie van atropine met het atropine—esterase en op de werkings—mechanisme van het enzym zou belangrijke informatie over deze processen kunnen worden verkregen.

Het onderzoek naar de stofwisselingsketen van atropine is in eerste instantie ter hand genomen ten behoeve van de isolering van mutanten met een gemodificeerd atropine—esterase. Hiervoor was het gewenst de stofwisselingsketen van atropine in *Pseudomonas* te kennen, om bij mutanten, die gestoord zijn in de stofwisseling van atropine, een onderscheid te kunnen maken tussen een verstoring door mutatie in de genetische informatie voor het atropine—esterase en een blokkade verder in de stofwisselingsketen.

Spoedig werd echter duidelijk dat het onderzoek naar het metabolisme van atropine nog geheel andere perspectieven bood. Uit het onderzoek van Rörsch en Berends was gebleken dat de synthese van het atropine—esterase onderworpen is aan regulering: het atropine—esterase kon niet worden aangetoond in *Pseudomonas*, die gekweekt was met een koolstofbron als glucose of barnsteen zuur. Blijkbaar is het atropine—esterase een z.g. induceerbaar enzym, waarvan de synthese afhankelijk is van de aanwezigheid van een bepaalde verbinding in het kweekmedium.

Bij het onderzoek naar de geschiktheid van de hydrolyse—producten tropazuur en tropine als koolstofbron bleek dat beide stoffen door *Pseudomonas* worden gemetaboliseerd en dat tropazuur — in tegenstelling tot tropine — hierbij aanleiding geeft tot de synthese van het atropine—esterase. Gezien de relatie van tropazuur (het product van de enzymatische hydrolyse) tot het enzym is dit een merkwaardig verschijnsel. Dit vestigde de aandacht op het regulerings—mechanisme waaraan de synthese van het atropine—esterase is onderworpen. In dit verband leek het interessant speciaal de afbraak van tropazuur te onderzoeken en de enzymen te identificeren, die bij deze afbraak betrokken zijn, aangezien deze enzymen wellicht tesamen met het atropine—esterase worden geïnduceerd. Door bestudering van de inductie van deze enzymen zou de regulering van eiwit— en enzym—synthese in PMBL—1 kunnen worden onderzocht.

De bestudering van de verdere afbraak van tropazuur zou bovendien van belang zijn als bijdrage tot de kennis van het metabolisme in micro—organismen van aromatische zuren met een vertakte zijketen. Over het metabolisme van deze categorie is vrijwel niets bekend.

Deze overwegingen zijn aanleiding geweest tot het in dit proefschrift beschreven onderzoek naar de stofwisselingsketen van atropine en de regulering van de synthese van de daarbij betrokken enzymen.

Dit onderzoek zal nader worden ingeleid in hoofdstuk 1 waarin een samenvatting wordt gegeven van de literatuur over het metabolisme van atropine in hogere organismen, planten en bacteriën. Vervolgens worden in hoofdstuk 2 de gebruikte technieken beschreven en in hoofdstuk 3 de chemische synthese, de identificatie en de keto-enol tautomerie van 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde, dat één van de intermediëren in het metabolisme van atropine blijkt te zijn.

In hoofdstuk 4 worden enkele experimenten besproken, waarmee de eerste aanwijzingen zijn verkregen voor de wijze waarop atropine en tropazuur in *Pseudomonas* worden gemetaboliseerd. Uit het onderzoek van de adaptatie van PMBL-1 aan tropazuur en enkele andere aromatische carbonzuren kon worden afgeleid, dat *Pseudomonas* gekweekt in een medium met atropine of tropazuur geadapteerd is aan fenylazijnzuur. De rol van fenylazijnzuur in het metabolisme van atropine en tropazuur is bevestigd door het isoleren van fenylazijnzuur uit het kweekmedium van enkele mutanten, die in de afbraak van tropazuur waren gestoord.

Met deze gegevens werd de werkhypothese opgesteld, dat de omzetting van atropine in fenylazijnzuur tot stand komt door een splitsing in tropazuur en tropine, gevolgd door twee dehydrogeneringen en een decarboxylering (zie bijlage I). Het in de hoofdstukken 5 t/m 8 beschreven onderzoek heeft geleid tot de bevestiging van deze veronderstelling en tot de identificatie van de enzymen, die bij de omzetting van atropine in fenylazijnzuur in PMBL-1 zijn betrokken.

De afbraak van atropine verloopt via tropazuur, 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde en fenylaceetaldehyde o.i.v. de enzymen: atropine-esterase (AtrE), tropazuur-dehydrogenase (TDH), 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC) en fenylaceetaldehyde-dehydrogenase (PDH). Deze vier enzymen worden gezamenlijk de "tropazuur-enzymen" genoemd. Van deze enzymen worden de identificatie, de kwantitatieve bepaling, de gedeeltelijke zuivering en enkele eigenschappen beschreven. Het zijn enzymologisch goed hanteerbare eiwitten met een grote specificiteit voor het bijbehorende substraat.

Voor het atropine-esterase (hoofdstuk 5) is een zuiverings-procedure uitgewerkt, waarmee een verrijking op eiwitbasis van 600 x werd verkregen t.o.v. het extract. Hierdoor is een voldoende zuiver preparaat ter beschikking gekomen voor het onderzoek van het katalytisch centrum van dit enzym.

In hoofdstuk 6 wordt het tropazuur-dehydrogenase (TDH) beschreven. Dit enzym katalyseert de dehydrogenering van tropazuur tot 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (pma), waarbij de waterstof wordt overgedragen op de cofactor NAD^+ . Uit de bestudering van de kinetiek van de dehydrogenering o.i.v. het gezuiverde enzym blijkt dat dit proces reversibel is:



De instelling van het evenwicht is zowel door dehydrogenering van tropazuur als door hydrogenering van pma aangetoond. De langzame NADH-productie, die na de instelling van het evenwicht wordt waargenomen, kan worden toegeschreven aan een verschuiving van het evenwicht door spontane ontleding van pma.

De invloed van de keto-enol tautomerie van pma op de kinetiek van de hydrogenering van pma en op de ligging van het evenwicht is nader bestudeerd. Het verloop van de hydrogenering kan kwantitatief worden verklaard met de specificiteit van het tropazuur-dehydrogenase voor de keto-vorm van pma en de snelheid van de tautomere omlegging $\text{enol-pma} \longrightarrow \text{keto-pma}$ in waterig milieu. Hoewel niet direct is aangetoond dat keto-pma het intermediair is dat uit tropazuur wordt gevormd, is uit de beschreven experimenten geen andere conclusie mogelijk.

Ondanks de instabiliteit van keto-pma, die resulteert in een spontane decarboxylering, blijkt PMBL-1 te beschikken over een pma-decarboxylase. In hoofdstuk 7 wordt beschreven hoe voor de aanwezigheid van dit enzym aanwijzingen zijn verkregen uit de werking van een eiwit-fractie, die de enzymatische dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu vele malen versnelt. De identificatie als het 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase berust op het directe effect van dit eiwit op de stabiliteit van pma en op de vorming van fenylaceetaldehyde en CO_2 .

Het fenylaceetaldehyde-dehydrogenase (hoofdstuk 8) is het tweede dehydrogenase dat een rol speelt in het metabolisme van atropine en tropazuur; het gebruikt evenals het tropazuur-dehydrogenase NAD^+ als cofactor. Het enzym is veel minder stabiel dan de andere tropazuur-enzymen, maar wordt gestabiliseerd in een buffer-oplossing met een speciale samenstelling. Door gebruik te maken van deze buffer is het mogelijk het enzym gedeeltelijk te zuiveren en verschillende eigenschappen van het enzym te onderzoeken.

In hoofdstuk 9 wordt de functionele volgorde van de tropazuur-enzymen besproken en de vermoedelijke afwezigheid van een „actief” opname-systeem voor tropazuur (permease). Verder wordt het metabolisme van tropazuur in PMBL-1 vergeleken met dat van amandelzuur in *Pseudomonas* ATCC 12633.

In hoofdstuk 10 wordt de regulering van de synthese van de tropazuur-enzymen behandeld. De vier enzymen blijken in PMBL-1 te worden geïnduceerd wanneer atropine of tropazuur in het kweekmedium aanwezig is. Bovendien zijn nog enkele andere verbindingen in staat de tropazuur-enzymen te induceren. Uit een nader onderzoek van de inductie in mutanten van *Pseudomonas* PMBL-1 zijn aanwijzingen verkregen, dat slechts fenylaceetaldehyde en benzaldehyde induceren en dat atropine en tropazuur alleen aanleiding geven tot inductie, indien deze verbindingen kunnen worden omgezet in fenylaceetaldehyde. In de discussie komen de voordelen van inductie door fenylaceetaldehyde boven inductie door atropine aan de orde.

In de nabeschouwing wordt het belang van deze resultaten voor het onderzoek naar het receptor—model en het werkings—mechanisme van het atropine—esterase besproken. Voorts worden argumenten aangevoerd voor de veronderstelling dat de tropazuur—enzymen uitsluitend bij de afbraak van atropine zijn betrokken en niet tevens een meer centrale functie in *Pseudomonas* vervullen en dat de enzymen o.a. hierdoor zeer geschikt zijn voor de bestudering van de regulering van de eiwit—synthese in het algemeen.

HOOFDSTUK I

LITERATUUR

De afbraak van atropine in zoogdieren, planten en bacteriën is vrij uitvoerig bestudeerd voor zover het de hydrolyse in tropazuur en tropine betreft. Verschillende organismen blijken een atropine-esterase te bevatten, dat bij deze hydrolyse is betrokken. Bij het onderzoek naar de afbraak in hogere dieren zijn bovendien nog enkele andere afbraak-producten van atropine aangetoond. Omdat de literatuurgegevens weinig aanknopingspunten hebben geboden voor het onderzoek volgt hier slechts een overzicht van de meest relevante waarnemingen.

I.1 DE AFBRAAK VAN ATROPINE IN ZOOGDIEREN

De eerste aanwijzingen voor het metabolisme van atropine stammen uit 1852, toen de Weense arts Schroff constateerde, dat konijnen zich met de bladeren van de belladonnaplant konden voeden zonder hiervan nadelige gevolgen te ondervinden. Bij konijnen elders in Europa werd destijds deze relatieve ongevoeligheid niet waargenomen. [Deze regionale verschillen worden heden ten dage niet meer gevonden, doordat tijdens de Eerste Wereldoorlog een vermenging van de Europese konijnesoorten is opgetreden (Quinton, 1966)].

Fleischmann (1910) en Metzner (1912) waren de eersten die verband legden tussen de waargenomen resistentie tegen atropine en het vermogen van konijneserum atropine te inactiveren. Door Bernheim (1938, 1948), Glick (1940) en Ammon (1949) werd bewezen, dat deze inactivering wordt veroorzaakt door enzymatische hydrolyse van atropine in de farmacologisch weinig actieve hydrolyse-producten tropazuur en tropine. Het hiervoor verantwoordelijke enzym werd atropine-esterase genoemd.

De resistentie tegen atropine is genetisch bepaald en wordt sub-dominant overgedragen (Sawin en Glick, 1943). Recent heeft Werner (1967) nagegaan, welke zoogdieren de beschikking hebben over dit enzym. Hierbij bleek, dat behalve sommige konijnen ook sommige cavia's atropine-resistent zijn en in het bezit zijn van een atropine-esterase. Bij andere zoogdieren en bij de mens is het enzym niet aangetoond.

Margolis en Feigelson (1963, 1964) hebben het atropine-esterase uit konijneserum uitvoerig onderzocht. Door deze onderzoekers werd het enzym 70 maal gezuiverd ten opzichte van het uitgangspreparaat, waardoor het mogelijk werd een antiserum tegen dit atropine-esterase te bereiden en immunotitraties uit te voeren met serum van atropine-resistente en niet-resistente konijnen. Zij kwamen hierbij

tot de conclusie dat het ontbreken van de atropine—esterase—activiteit wordt veroorzaakt door het ontbreken van het enzym of een daaraan immunologisch verwant eiwit en niet door de aanwezigheid van een remmer of door de afwezigheid van een activator van het esterase.

Behalve de hydrolyse van tropine—esters wordt o.a. ook de hydrolyse van esters van choline en van glycerol versneld. Dit atropine—esterase is dus een niet—specifiek esterase. In tegenstelling tot deze a—specificiteit vertoont het enzym een opmerkelijke voorkeur voor de (–) - enantiomeer van atropine en scopolamine[☆]; (–) - atropine wordt 100 maal sneller gehydrolyseerd dan (+) - atropine (Werner, 1967). De hydrolyse van homatropine geschiedt echter zonder voorkeur voor één der optische isomeren.

Met betrekking tot atropine—achtige verbindingen kan nog worden opgemerkt dat slechts de verbindingen, waarin de 3' - substituent van tropine trans staat t.o.v. de N—methylgroep, geschikt zijn als substraat voor dit atropine—esterase. Door Werner (1967) is daarom als de officiële naam van het enzym voorgesteld: trans (–) - hyoscyamine—acylhydrolase. De cis—isoomeer van atropine wordt gehydrolyseerd o.i.v. het serum van alle onderzochte species, o.a. door het serum van de mens.

Het enzym wordt geremd door de organofosfaten diethyl p—nitrofenylfosfaat (Margolis en Feigelson, 1964) en diisopropyl fosforofluoridaat (Berends, 1965 en Otorii, 1965).

Naast de rol van het atropine—esterase in het detoxificatie—mechanisme in atropine—resistente dieren is het metabolisme en de uitscheiding van atropine in atropine—esterase—deficiënte zoogdieren bestudeerd.

Kalser en medewerkers (1957), Gabourel en Gosselin (1958) hebben hiervoor gebruik gemaakt van radioactief atropine. Na intraveneuze toediening werd de radioactiviteit grotendeels in de urine teruggevonden, deels als atropine, deels als conjugaat hiervan met glucuronzuur.

Hiermee bevestigden zij vroegere waarnemingen (Bernheim, 1948), dat atropine gedeeltelijk onveranderd door de nier wordt uitgescheiden. Een gedeelte van de radioactiviteit in de urine reageerde positief met reagentia op de fenolische hydroxylgroep; dit wijst op hydroxylering van het tropazuur—residu in atropine. Slechts 0,3% van de radioactiviteit werd als tropazuur uitgescheiden. Met papierchromatografie zijn nog een aantal niet nader geïdentificeerde producten gevonden. Werner (1968) heeft de hydroxylering van atropine bevestigd en aanwijzingen verkregen voor een oxydatieve demethylering van de N—methylgroep van atropine.

De omzetting van atropine in rattelever is bestudeerd door Matsuda (1966). Hij vergeleek het farmacologisch werkingsspectrum van intraveneus toegediend atropi-

☆ Voor structuurformules wordt verwezen naar tabel 5.6 en bijlage I.

ne met dat van intraveneus toegediend atropanal (de tropine—ester van 2—fenylmalonzuur—semi—aldehyde). Atropanal bleek o.a. 7 maal meer toxisch maar had minder parasymphaticolytische activiteit. Wanneer atropine langzaam in de poortader werd ingebracht, werd het farmacologisch werkingsspectrum van intraveneus geapliceerd atropanal waargenomen. Hieruit werd door Matsuda geconcludeerd dat in rattelever atropine wordt geoxydeerd tot atropanal.

1.2 DE AFBRAAK VAN ATROPINE IN PLANTEN

De vertegenwoordigers van de familie der Solanaceae zijn de natuurlijke producenten van de tropa—alkaloiden, waartoe behalve atropine o.a. scopolamine, homatropine en cocaine behoren. In deze planten wordt atropine zowel gesynthetiseerd als afgebroken (Neumann en Tschöpe, 1966). Volgens Kaczkowski (1964) heeft *Datura stramonium* voor de afbraak van atropine de beschikking over een atropine—esterase; de auteur verkreeg ook aanwijzingen voor de aanwezigheid van een enzym dat de synthese van atropine uit tropazuur en tropine verzorgt. Met kolom—chromatografie was het mogelijk het esterase van het synthetase te scheiden; bij de synthese en afbraak van atropine zijn derhalve verschillende enzymen betrokken.

Het plantaardige atropine—esterase is in vitro bestudeerd door Jindra en Čihák (1963). Het enzym werkt optimaal bij pH 5,3 en 30°; het wordt geremd door overmaat substraat en is niet specifiek voor één van de optische isomeren van atropine.

De afbraak van tropazuur in planten is niet bekend (Neumann en Tschöpe, 1966); wel bevatten preparaten van tropa—alkaloiden, verkregen door extractie van plantenmateriaal, verschillende meerbasische onverzadigde vetzuren, die mogelijk door afbraak van tropazuur zijn gevormd (Flück, 1965).

[Bij de synthese van tropazuur in vivo blijken fenylalanine en fenylpyrodruivenzuur directe voorstadia te zijn. Uitgaande van 1,3 — ¹⁴C — fenylpyrodruivenzuur (C₆H₅ — *CH₂ — CO — *COOH) ontstaat volgens Gibson en Youngken (1967) in vivo 1,2 — ¹⁴C — tropazuur (C₆H₅ — *CH(CH₂ OH) — *COOH). Deze omlegging is intrigerend omdat hierbij geen CO₂ vrijkomt en de reactie dus verloopt via een intramoleculaire hergroepering.]

1.3 HET METABOLISME VAN ATROPINE IN MICRO—ORGANISMEN

In de literatuur zijn verschillende micro—organismen beschreven, die in staat zijn atropine te metaboliseren. Toen Kedzia e.a. (1961) de houdbaarheid van "belladonna" oogdruppels onderzochten, bleken vele druppelflesjes bacteriën te bevatten, die in staat waren atropine af te breken. Ook in de lucht van het ziekenhuis te Danzig en in grond daar ter plaatse werden dergelijke micro—organismen aangetroffen. In totaal werden 53 stammen geïsoleerd; hiervan bleken er 38 tot het geslacht *Pseudomonas* te behoren.

De bacteriële afbraak van atropine is door Kaczkowski (1959) bestudeerd in een

bacterie, geïsoleerd uit grond onder de *Datura stramonium* plant. De bacterie is volgens de auteur waarschijnlijk een *Arthrobacter*. In een extract van de bacterie, die gekweekt was met atropine als koolstofbron, kon een atropine-esterase worden aangetoond; de hydrolyse-producten tropazuur en tropine werden geïdentificeerd. Verder werden aanwijzingen verkregen voor een omzetting van tropazuur in atropazuur (2-fenylacrylzuur) en voor een demethylering van tropine.

Nierner en Bucherer (1959 en 1961) hebben een *Corynebacterium "belladonnae"* geïsoleerd, die atropine als koolstofbron kan benutten. Zij toonden aan dat deze bacterie de beschikking heeft over een atropine-esterase en over een dehydrogenase, dat betrokken is bij de omzetting van tropine in het overeenkomstige keton. Uit het kweekmedium van de bacterie werd een kleine hoeveelheid fenylazijnzuur geïsoleerd, dat door decarboxylering en dehydrogenering uit tropazuur zou kunnen zijn ontstaan.

Ook Jindra en Čihák (1963) hebben bericht een *Corynebacterium "belladonnae"* uit grond te hebben geïsoleerd, die met atropine in de koolstof- en stikstofbehoefte kon voorzien. Voorzover kon worden nagegaan, zijn hierover geen verdere bijzonderheden gepubliceerd.

Uit dit overzicht blijkt, dat de literatuur over het atropine-metabolisme beperkt is tot de beschrijving van de hydrolyse in tropine en tropazuur; het hiervoor verantwoordelijke atropine-esterase is in verschillende organismen aangetoond. De literatuurgegevens bieden weinig houvast met betrekking tot het metabolisme van tropazuur en er zijn geen gegevens over de enzymen, die bij dit metabolisme betrokken zijn.

HOOFDSTUK 2

MATERIALEN EN METHODEN

2.1 NOMENCLATUUR

Aangezien atropine een ester is van tropazuur, dat een optisch actief koolstof-atoom bevat, komt het voor in twee optische isomeren. De aanduiding atropine wordt gebruikt voor racemisch atropine; de optische isomeren worden aangeduid met (+) - atropine en (–) - atropine, de natuurlijk voorkomende isomeer. De naam hyoscyamine, die ook aan de afzonderlijke stereo-isomeren van atropine wordt gegeven, zal hier niet worden gebruikt.

De naam tropazuur wordt gebruikt voor het racemaat; de optische isomeren worden met (+) - en (–) - tropazuur aangeduid. (–) - tropazuur is de zuurcomponent van (–) - atropine en bezit de (S) - configuratie.

Voorzover niet de systematische naam van een verbinding is gebruikt, wordt voor structuurformules naar de substraat-specificiteitstabel in hoofdstuk 5 en naar bijlage I verwezen. Voor de aanduiding van organische zuren wordt de naam van het zuur gebruikt, ongeacht de dissociatietoestand onder de gebruikte proefomstandigheden.

De enzymen atropine-esterase (AtrE), tropazuur-dehydrogenase (TDH), 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC) en fenyl-aceetaldehyde-dehydrogenase (PDH) worden gezamenlijk aangeduid met de tropazuur-enzymen.

De afkortingen van enzymen, verbindingen, etc. zijn afgeleid van de Engelse benamingen. De afkortingen voor atropine, tropazuur, etc. worden uitsluitend gebruikt bij het beschrijven van het fenotype van de mutanten.

2.2 MATERIALEN

De (+) - isomeer van atropine, (+) - en (–) - tropazuur en het 3-chinuclidinyl-benzilfaat werd beschikbaar gesteld door Drs. H.L. Boter (Chemisch Laboratorium RVO-TNO); (–) - atropine werd betrokken van de Nutritional Biochemicals Corporation (U.S.A.). Het N-methyljodide van het (–) - en (±) - atropine werd beschikbaar gesteld door Dr. F. Berends; Soman door Dr. P. Christen. Technisch tropazuur is betrokken van Mac-Farlan Smith Ltd, (Schotland); dit werd tweemaal uit water omgekristalliseerd.

De synthese en de identificatie van 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (pma) is beschreven in hoofdstuk 3.

Fenylmalonzuur werd geïsoleerd uit de diethyl ester door alkalische hydrolyse en

omgekristalliseerd uit dichloorethaan. Elementair analyse: gevonden 59,83% C en 4,47% H, theoretisch 60,00% C en 4,48% H.

Bij de bereiding van de methyl ester van tropazuur is de synthese van de methyl ester van benzoëzuur als leidraad gebruikt (Vogel, 1959). Kpnt. 149–152°/12 mm, n_D^{20} 1,5218; lit. Kpnt. 159–162°/19 mm (Beilstein, E I 10, pag. 115). Fenylaceetaldehyde, geleverd door Aldrich Chem. Co., (Milkauwee, U.S.A.), werd als zodanig gebruikt als koolstofbron; voor de enzymologische experimenten werd het voor gebruik gedestilleerd bij verminderde druk in een stikstofatmosfeer. Kpnt. 79–80°/12 mm, n_D^{23} 1,5240; lit. Kpnt. 85–90°/18 mm, $n_D^{19,6}$ 1,5255 (Beilstein E II 7, pag. 226).

Streptomycine, chlooramfenicol, NAD^+ en NADH werden betrokken van de Ned. Gist- en Spiritusfabriek (Delft); $NADP^+$ en LDH (uit konijnespier) van Boehringer (Mannheim); hexokinase (type II uit gist) van Sigma (St. Louis, U.S.A.); pyridoxaalfosfaat en 3-fenylmelkzuur van Mann Research Lab. Inc., (New York); p-Cl-mercuri-benzoëzuur van Bios Lab. (New York); dithiotreitol van Calbiochem (Californië); ($\pm$) - atropine van N.V. Brocades-Stheeman (Amsterdam); scopolamine van apotheek Kipp (Delft); homatropine hydrobromide en atropine methylnitrat van de Amsterdamse Chinine Fabriek (Amsterdam); atropazuur en pseudotropine van K & K Laboratories (Californië); benzaldehyde stabilisé van U.C.B. (Brussel); o-Cl-benzaldehyde en 2-fenylpropionzuur van Schuchardt (München); vanilline en iso-vanilline van EGA-Chemie (W.-Duitsland); fenylazijnzuur, saponine (white) en o-nitro-benzaldehyde van The British Drughouses (Londen); kiezelgel G (volgens Stahl) en epoxystyrol van E. Merck (Darmstadt); Rhodamine van E. Gurr Ltd. (Londen); de overige minder gangbare chemicaliën werden betrokken van Aldrich Chem. Co. (Milwaukee, U.S.A.) of van Fluka AG Buch SG. (Zwitserland).

De gebruikte dialyse-huls was Visking tube 24/32"; het DEAE-cellulose werd geleverd door Serva (Heidelberg); Sephadex G-100 door Pharmacia (Uppsala); Munckell's Cellulose poeder door Grycksbo-Pappersbruk AB (Zweden).

2.3 HET ISOLEREN VAN PSEUDOMONAS PMBL-1

De *Pseudomonas* bacterie, die in staat is te groeien met atropine als enige koolstofbron, is door Rörsch en Berends geïsoleerd uit een grondmonster, dat was genomen rond de wortels van *Atropa belladonna* L. in de botanische tuin van de Technische Hogeschool te Delft.

Het grondmonster werd in synthetisch medium (2.4) met atropine als enige koolstofbron bij 30° en 37° weggezet. Na drie dagen werd groei waargenomen in de cultuur bij 30°. Uit het vlies aan de oppervlakte werd een bacterie geïsoleerd, die in staat was te groeien met atropine als enige koolstofbron. De bacterie werd door Bartlema geïdentificeerd als *Pseudomonas*. Het is een Gram-negatief staafje, dat beweeglijk is dankzij één of meer polaire flagellen en dat een groen-fluorescerend pigment vormt in glycerine-bouillon. De stam groeit optimaal bij 28–29°, is niet

chemo-autotroof en vertoont een uitsluitend oxydatieve afbraak van toegediende koolhydraten.

Na een uitvoerige determinatie volgens de methode van Stanier (1966) is deze stam door Wensinck (1969) geclassificeerd als *Pseudomonas putida* biotype A. De stam is opgenomen in de stammenverzameling van het M.B.L. onder code-nummer PMBL-1.

In een later stadium van het onderzoek zijn door Rörsch nog acht *Pseudomonas* species uit de tuingrond van het M.B.L. en uit de Hortus Botanicus te Leiden geïsoleerd, die in staat zijn atropine af te breken. De eigenschappen van deze stammen — voor zover bekend en betrekking hebbend op het atropine-metabolisme — worden besproken in hoofdstuk 9.

In dit verband is het interessant, dat géén van de *Pseudomonas* species, die reeds aanwezig waren in de bacterie-verzamelingen van het M.B.L. en van de Technische Hogeschool te Delft, in staat is atropine te metaboliseren.

2.4 HET KWEKEN VAN DE BACTERIËN

Het synthetisch medium, dat voor het kweken van *Pseudomonas* werd gebruikt, bevatte per liter gedestilleerd water: 1 g NH_4Cl , 6 g Na_2HPO_4 , 0,5 g NaCl , 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ aq}$, 11 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 4 \text{ aq}$, 1,5 mg MnSO_4 , 5 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ aq}$, 0,4 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ aq}$, 0,25 mg $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{ aq}$, 0,2 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{ aq}$, 0,2 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ aq}$ en 2,5 mg EDTA (Cohen-Bazire e.a. 1957).

Direct voor gebruik werd de gewenste koolstofbron toegevoegd. De uiteindelijke pH was 7,0 — 7,1. Dit synthetisch medium werd ook als vaste voedingsbodem met 1,5% agar gebruikt. De verbindingen, die als koolstofbron of als inductor werden getest, werden zo mogelijk in water opgelost, geneutraliseerd tot pH 7,0 en gesteriliseerd door Seitz filtratie. Stoffen, die zeer slecht in water oplossen, werden als zodanig aan het medium toegevoegd.

Kleine hoeveelheden bacteriën werden in vloeibaar synthetisch medium in kolven gekweekt bij 29°. De kolf werd maximaal voor 15% met medium gevuld en krachtig geschud (± 80 slagen per minuut). Steriele lucht (100–200 ml/min) werd op de cultuur geleid wanneer werd verwacht dat de absorptie bij 700 nm (A_{700}) van de cultuur tijdens de kweek tot boven 0,8 zou stijgen. De A_{700} werd in de routine-bepaling gebruikt als een maat voor de bacterie-concentratie van de culturen. Deze werd gemeten op een Zeiss-spectrofotometer of met een Vitatron Colorimeter (703 nm filter). Voor nauwkeurige bepalingen werd de telkamer gebruikt. Wanneer het medium troebel was geworden als gevolg van de onoplosbaarheid van een verbinding, werd gebruik gemaakt van telplaten. Na de kweek werd de cultuur gekoeld tot 4°; de bacteriën werden verzameld door centrifugeren gedurende 10 min bij 7000 x g en geëxtraheerd zoals in 2.10 is beschreven.

Grottere hoeveelheden *Pseudomonas* PMBL-1 werden gekweekt in een 25 L cultivator in synthetisch medium met 0,2% tropazuur als koolstofbron. Hiermee kon

in één kweek 80 – 100 g *Pseudomonas* worden verkregen. De bacteriën werden door centrifugeren verzameld en geëxtraheerd (2.10) of bij -20° bewaard.

2.5 HET ISOLEREN VAN PSEUDOMONAS-MUTANTEN

Bij de mutagene behandeling van PMBL-1 werd de bacterie geënt in een vloeibaar synthetisch medium met 0,1% glucose en de volgende morgen 1 : 10 overgeënt op hetzelfde medium. Bij een $A_{700} = 0,9$ werd 5 ml van de cultuur gemengd met 1 ml N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-oplossing (1 mg/ml in HMP) en 4 ml synthetisch medium. Gedurende 45 min werd langzaam geschud bij 30° . De fractie overlevende bacteriën na deze behandeling was ongeveer 10^{-3} . De bacteriën werden door centrifugeren verzameld, opgenomen in 0,1% glucose in synthetisch medium en verdeeld in 40–80 subculturen, die gedurende een nacht werden gekweekt met goede aeratie. Hierna werden de subculturen uitgestreken op vast medium met glucose als koolstofbron, in een zodanige verdunning dat ongeveer 100 vrijliggende kolonies per plaat opkwamen. Vervolgens werd van elke plaat, de zgn. moederplaat, m.b.v. de replica-methode (Lederberg en Lederberg, 1952), een aantal afdrucken gemaakt op de zgn. dochterplaten. Door een geschikte keuze van de koolstofbron in deze dochterplaten was het mogelijk met deze techniek grote aantallen bacteriën tegelijk te onderzoeken op eventuele afwijkingen in het groeipatroon. Kolonies met een afwijkend patroon werden door uitstrijken gezuiverd en verschillende malen getest op de geconstateerde afwijking. Indien bij herhaling dezelfde groei-afwijkingen werden waargenomen, werd de mutant opgenomen in de mutant-collectie van het M.B.L. en voorzien van een isolatie-nummer voorafgegaan door de codering PMBL. Van iedere subcultuur werd slechts één mutant met een bepaald fenotype aangehouden; het is uitgesloten dat mutanten met een verschillende isolatie-nummer een identieke verandering hebben ondergaan.

De mutanten, die in dit onderzoek zijn gebruikt, zijn alle afgeleid van PMBL-1. De mutanten met een storing in de afbraak van fenylalijnzuur zijn vermeld in tabel 3.1. Hiervan zijn PMBL-107, PMBL-112 en PMBL-114 met het fenotype $\text{Tro}^{-} \text{Pac}^{-} \text{Php}^{+}$, gebruikt voor de experimenten, weergegeven in fig. 4.4 en 4.7. De overige mutanten zijn opgenomen in tabel 10.7.

Bij de mutagene behandeling dient men uit te gaan van een cultuur, afgeleid van één enkele en gecontroleerde kolonie. In het begin van het onderzoek werd deze voorzorg niet genomen en werd voor de mutagene behandeling een cultuur gebruikt, die op vast medium gedurende enkele maanden verschillende malen was overgeënt en bij 4° was bewaard. Bij de mutagene behandeling werd hiermee een bijzonder hoge mutatiefrequentie naar het fenotype $\text{Atr}^{-} \text{Tro}^{-} \text{Tpn}^{-}$ waargenomen (meer dan 5%). Uit een nader onderzoek bleek, dat het grootste gedeelte van deze mutanten reeds vóór de mutagene behandeling in de cultuur aanwezig was en blijkbaar spontaan uit het wilde type was ontstaan. Uitgaande van één gecontroleerde kolonie werd na de mutagene behandeling $\pm 0,1\%$ Atr^{-} mutanten gevonden.

De spontane mutatie naar $Atr^-Tro^-Tpn^-$ zou verband kunnen houden met een extra-chromosomale locatie van deze kenmerken; hiervoor zijn experimenteel echter geen aanwijzingen gevonden. Het atropine-kenmerk bleek niet gevoelig voor ethidium-bromide of acridine-oranje, de mutatie Atr^- gaat niet gepaard met verlies van resistentie tegen antibiotica en m.b.v. evenwichtscentrifugering^{☆)} kon een satelliet DNA niet worden aangetoond.

2.6 BEPALING VAN DE ZUURSTOFOPNAME EN CO_2 - PRODUCTIE

De door *Pseudomonas*-culturen opgenomen hoeveelheid zuurstof werd bepaald met de manometrische techniek volgens Warburg (Umbreit e.a., 1951). De bacteriën werden gekweekt in synthetisch medium met 0,2% koolstofbron. De culturen werden geoogst in de logaritmische groeifase en gedurende vier uur zonder koolstofbron in synthetisch medium geïncubeerd; hierdoor werden endogene reserves verbruikt, waardoor de spontane zuurstofopname werd verlaagd.

In de hoofdruimte van het warburgvatje werd 2,7 ml bacteriesuspensie gepipetted (2–3 mg drooggewicht), in het zijvat 0,2 ml 2,5% koolstofbron en in het middenvat een filtreerpapiertje, waarop 0,1 ml 10 N KOH was gebracht. Nadat gedurende 15 min zuivere zuurstof was doorgeleid, werden de vaatjes gesloten en in een thermostaatbad van 30° geschud met een frequentie van 120 slagen per minuut. Gedurende 20 min werd de drukverandering gevolgd, die veroorzaakt werd door de spontane zuurstofopname. Vervolgens werden de bacteriën en de koolstofbron samengebracht en de drukverandering als functie van de tijd bepaald.

De hoeveelheden opgenomen zuurstof werden berekend uit de gemeten drukveranderingen en de vatconstante (voor O_2) van de manometer; bij de berekening werd gecorrigeerd voor de zuurstofopname in afwezigheid van de koolstofbron. In controle-experimenten werd vastgesteld dat de gebruikte hoeveelheid koolstofbron in overmaat aanwezig was t.o.v. de gebruikte hoeveelheid bacteriën. Van elke bacteriecultuur werd de zuurstofopname in duplo bepaald. In de grafieken van hoofdstuk 4 zijn de gemiddelden van deze duplo-bepalingen uitgezet, die in het algemeen onderling slechts geringe verschillen vertoonden.

Van dezelfde techniek is gebruik gemaakt voor de bepaling van de CO_2 -productie t.g.v. de dehydrogenering en decarboxylering van tropazuur o.i.v. de enzymen TDH en PDC. Het incubatie-mengsel werd in het hoofdvat gebracht; het zijvat bevatte 0,2 ml 4N H_2SO_4 . Nadat gedurende 5 min stikstof was doorgeleid, werden de vaatjes gesloten en gedurende 60 min geschud bij 30°. De incubatie werd uitgevoerd bij pH 8,5; hierdoor bleef het CO_2 , dat werd geproduceerd, als bicarbonaat in de oplossing.

☆) Dit experiment werd uitgevoerd door Drs C. Knijnenburg.

Door toevoegen van het zwavelzuur werd het koolzuur uit het incubatiemengsel vrijgemaakt. Uit de drukverandering, die hiervan het gevolg was en de vatconstante (voor CO_2) werd de hoeveelheid CO_2 berekend.

2.7 DUNNELAAGCHROMATOGRAFIE

Deze techniek is gebruikt voor de identificatie van atropine—metaboliëten, geëxtraheerd uit een kweekmedium of verkregen door een enzymatische omzetting *in vitro*.

Bij de extractie werd het medium aangezuurd met geconcentreerd HCl tot pH 2 en vervolgens driemaal geëxtraheerd met een geschikt volume ether. Nadat het etherisch extract was gedroogd met watervrij Na_2SO_4 werd het in vacuüm geconcentreerd.

Bij de dunnelaagchromatografie (Stahl 1957) werd kiezelgel G als stationaire fase gebruikt; 30 g kiezelgel werd met 60 ml gedestilleerd water gedurende 1 min grondig gemengd in de Waring Blendor en daarna m.b.v. een uitstrijkapparaat uitgestreken tot een laag met een dikte van 0,25 mm op glasplaten van 20 x 20 cm. Voor het gebruik werden de platen gedurende 60 min verwarmd bij 110°

De preparaten werden bij voorkeur opgebracht in een oplosmiddel met sterkere elutieve eigenschappen dan het loopmiddel, opdat zo weinig mogelijk materiaal op de startvlek zou achterblijven. Als loopmiddelen werden gebruikt:

EMX: Ether : Xyleen : Mierezuur : Water — 50 : 30 : 10 : 3 (v/v/v/v)

BEM: Benzeen : Ethylformiaat : Mierezuur — 75 : 24 : 1 (v/v/v)

Voorafgaande aan de chromatografie werden de platen gedurende één uur in de chromatografiebak in contact gebracht met de dampfase, waarna gestart werd door toevoegen van meer loopmiddel.

De loopmiddelen EMX en BEM hebben een groot scheidend vermogen voor aromatische zuren. De R_f —waarden voor enkele verbindingen bedragen in EMX resp. BEM: 3,4—dihydroxyfenylazijnzuur 0,47 resp. 0,10; tropazuur 0,50 resp. 0,21; fenylglyoxylzuur 0,64 resp. 0,33; fenylazijnzuur 0,70 resp. 0,55; fenylaceetaldehyde 0,83 resp. 0,85.

Bij de chromatografie van fenylaceetaldehyde werden de platen tevoren ontwikkeld met één van beide loopmiddelen en daarna gedroogd bij 110° . Deze voorbehandeling is nodig omdat vers gedestilleerd fenylaceetaldehyde anders met beide loopmiddelen 3—4 vlekken geeft. Blijkbaar is de stof gevoelig voor een verontreiniging in het kiezelgel.

De loopmiddelen CD en BAW werden gebruikt voor chromatografie van atropine en tropine.

CD: Chloroform : Diethylamine — 90 : 10 (v/v)

BAW: (bovenlaag) n—Butanol : Azijnzuur : Water — 4 : 1 : 5 (v/v/v)

Voor de detectie werden de platen besproeid met één van de volgende reagentia:

1. Broomkresolgroen, opgelost in zwak alkalische ethanol; zuren verschijnen als gele vlekken op een blauwe achtergrond.
2. 2,4-dinitrofenylhydrazine, opgelost in 10% H_2SO_4 in ethanol en daarna 1 : 3 verdund met gedestilleerd water; aldehyden en ketonen kleuren oranje-geel.
3. Fluoresceïne of Rhodamine opgelost in ethanol. De platen werden bekeken onder een UV-lamp (254 nm); vele stoffen verschijnen als een donkere vlek tegen een oplichtende achtergrond.
4. Gelijke delen geconcentreerd H_2SO_4 en HNO_3 , hierna werd gedurende 20–30 min. verhit op 170° . Deze variant op de bekende H_2SO_4 -destructie is ontwikkeld voor de detectie van tropazuur, dat op de normale manier pas verkooft als de gehele plaat begint bruin te worden. Dit middel is zeer veel gebruikt voor de detectie van atropine, tropazuur en fenylazijnzuur. Benzoëzuur, benzaldehyde en fenylaceetaldehyde kunnen op deze manier niet worden gedetecteerd wegens hun vluchtigheid. Wanneer vooraf met weinig 2,4 dinitro-fenylhydrazine wordt gespoten, kunnen deze aldehyden wel met dit detectiemiddel worden aangetoond.

Preparatieve dunnelaagchromatografie werd uitgevoerd door het materiaal in een streep op te brengen en na chromatografie slechts smalle verticale stroken te detecteren. Hierna werd de betreffende zone van de plaat gekrabd en geëxtraheerd.

2.8 HET ISOLEREN VAN ^3H -TROPАЗUUR; OPNAME VAN ^3H -TROPАЗUUR IN PSEUDOMONAS

Van het beschikbare ^3H -atropine (niet specifiek gemerkt; 172 mCi/mMol; 0,6 mCi/mg; Radiochemical Centre, Amersham, Engeland), werd 0,1 mg m.b.v. AtrE volledig gehydrolyseerd. Na toevoegen van 10 mg tropazuur en 10 mg tropine als dragers werden de hydrolyse-producten gescheiden m.b.v. een Dowex-50 kolom (2 ml), die in evenwicht was met 0,1 M ammoniumformiaat (pH 7,0). Tropazuur werd met de ammoniumformiaat-oplossing geëluëerd terwijl tropine hierbij aan de ionenwisselaar gebonden bleef. De radioactiviteit van het eluaat bestond voor meer dan 99% uit tropazuur; dit werd aangetoond met dunnelaagchromatografie (2.7), gevolgd door bepaling van de radioactiviteit (zie verder) in de kiezelgel-zones. Het eluaat werd als zodanig gebruikt voor de experimenten met ^3H -tropazuur.

Voor de bepaling van de ^3H -opname werd uitgegaan van een bacterie-cultuur in de logaritmische groeifase. Deze cultuur werd gewassen met en opgenomen in synthetisch medium en verdund tot $A_{700} = 1,5$. Aan 1 ml van deze suspensie werd $0,2 \mu\text{mol } ^3\text{H}$ -tropazuur ($\pm 1,6 \times 10^5$ dpm) toegevoegd. Vervolgens werd gedurende 60 min bij 30° geïncubeerd. De incubatie werd beëindigd door te koelen tot 4° , waarna $10 \mu\text{mol}$ niet-gemerkt tropazuur en een tienvoudige hoeveelheid drager-bacteriën werden toegevoegd.

Na wassen met 5 mM tropazuur in synthetisch medium en centrifugeren, werden de bacteriën tot lyseren gebracht door eerst gedurende 15 min bij 37° te incuberen met 0,02 ml lysozym (2 mg/ml) en vervolgens 0,07 ml SDS 20% toe te voegen. Het lysaat werd met water tot ($\pm$) 0,4 ml aangevuld en overgebracht in telflesjes met 11 ml scintillatie-vloeistof (2,1 ml Triton X-100, 8,9 ml toluen met 0,5% 2,5-difenyloxazol en 0,005% 1,4-bis-2-(5-fenyloxazolyl)-benzeen. De radioactiviteit werd gemeten m.b.v. een Mark I scintillatie teller (Nuclear Chicago).

2.9 ENZYM-ACTIVITEITSBEPALINGEN

2.9.1 Algemeen

De eenheid van enzym-activiteit is, in overeenstemming met het advies van de Commission of Enzymes (1961), gedefinieerd als de hoeveelheid enzym, die in staat is bij 25° de omzetting van één μ mol substraat per minuut te katalyseren onder gedefinieerde omstandigheden. Deze omstandigheden zijn gedefinieerd voor het AtrE in 2.9.2, voor de enzymen TDH, PDC en PDH in 2.9.3.

De enzymactiviteit van een preparaat wordt uitgedrukt in het aantal eenheden (U) per ml. De totale enzym-activiteit (TA) is het totaal van de in een preparaat aanwezige eenheden. De specifieke activiteit (SA) is het aantal eenheden per mg eiwit. Uit de totale activiteit vóór en na een zuiveringsprocedure kan het rendement worden berekend; de specifieke activiteit is een maat voor de zuiverheid van het preparaat.

Het eiwitgehalte in extracten van bacteriën werd bepaald met de biureet-methode (Layne, 1957), bij lage eiwitconcentraties volgens Lowry (1951). De methode van Lowry werd ook gebruikt voor gezuiverde enzympreparaten (2.11), terwijl voor een ruwe schatting van de eiwitconcentratie in de afzonderlijke fracties na chromatografie of elektroforese de relatie: $A_{280} \equiv$ eiwitconcentratie in mg/ml werd gebruikt.

2.9.2 Kwantitatieve bepaling van de AtrE-activiteit

De bepaling van de activiteit van het AtrE werd verricht d.m.v. acidimetrische titratie bij constante pH van het vrijgekomen tropazuur. Hierbij werd gebruik gemaakt van een pH-staat (Radiometer Autotitrator TTT-1b en Titrigraph SBR-2c), die automatisch de hoeveelheid loog, die per tijdseenheid nodig is om de pH constant te houden, toevoegt en registreert.

De normale activiteits-bepaling werd uitgevoerd bij pH 7,0 en 25° in 10–25 ml 0,4 mM (–) - atropine, 0,1 M KCl en 0,02% saponine. Nadat 50–100 μ l enzympreparaat was toegevoegd, werd de zuurproductie gedurende 5–10 min gevolgd. De hoeveelheid enzym, die onder deze omstandigheden per min de hydrolyse van één μ mol (–) - atropine tweebrengt, is gedefinieerd als de eenheid van activiteit.

De activiteit van het AtrE is bij deze routinebepaling over een groot gebied recht evenredig met de hoeveelheid enzym (zie fig. 2.2).

De spontane hydrolyse van atropine in dit milieu is zeer gering en kan gewoonlijk worden verwaarloosd. Bij het enzymologisch onderzoek werd bij bepalingen bij hoge pH, met andere substraten of bij zeer lage enzymactiviteit gecorrigeerd voor het spontane loogverbruik en werd stikstof op het incubatiemengsel geleid om verstoring van de titratie door koolzuur te voorkomen.

2.9.3 Kwantitatieve bepaling van de TDH-, PDC- en PDH-activiteit

De bepaling van de activiteit van het TDH, PDC en PDH is gebaseerd op de omzetting van NAD^+ in NADH; deze verbinding bezit een specifieke absorptie bij 340 nm, zodat de reactie spectrofotometrisch kan worden gevolgd.

De samenstelling van de incubatiemengsels, die bij de bepalingen werden gebruikt, is vermeld in tabel 2.1. Per bepaling werd 2 ml hiervan gebruikt; na toevoegen van 10–100 μl enzym werd het volume tot 3 ml aangevuld met gedestilleerd water. De absorptie-toename werd gemeten in een kwarts-cuvet met een lichtweg van 10 mm m.b.v. een Zeiss-spectrofotometer (PMQ II), waarin een uitgangsweerstand was weggenomen, zodat een logaritmische Vitatron-recorder (Vitatron UR – 100) direct op de recorder-uitgang kon worden aangesloten. Beneden absorptie 0,8 was het verschil van de spectrofotometer- en de recorder-aanwijzing minder dan 0,005 absorptie-eenheden.

Tabel 2.1

Incubatiemengsels voor de bepaling van de TDH-, PDC- en PDH-activiteit

TDH	PDC	PDH
50 mM K-carbonaat pH 9,5	50 mM K-fosfaat pH 8,5	50 mM K-carbonaat pH 9,0
15 mM Tropazuur (K-zout)	15 mM Tropazuur (K-zout)	—
1,2 mM NAD^+	1,2 mM NAD^+	1,2 mM NAD^+
375 mM Hydrazine-HCl pH 9,5	—	—

De absorptie—stijging werd gemeten bij $25 \pm 1^\circ$; het incubatiemengsel werd vóór de meting op 25° gebracht in een thermostaatbad, dat ook het cuvettenhuis en de cuvettenhouder van de spectrofotometer op constante temperatuur hield.

De molaire absorptie—coëfficiënt van NADH bij 340 nm is $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Bij de vorming van 1 μmol NADH in een volume van 3 ml zal derhalve de A_{340} met 2,07 toenemen, zodat uit de waargenomen toename van de absorptie per tijdseenheid de NADH—productie in $\mu\text{mol}/\text{min}$ kan worden berekend. Het incubatiemengsel heeft een A_{340} van $\pm 0,05$; waar nodig werd hiervoor gecorrigeerd.

Voor de standaardbepaling van de *TDH—activiteit* werd het enzym op de boven beschreven wijze geïncubeerd met de substraatoplossing. Gedurende minstens 4 min werd de A_{340} geregistreerd. Bij het onderzoek naar de enzymologische eigenschappen van het TDH (6 en 7) werd hydrazine uit het medium weggelaten, tenzij anders is vermeld. In alle experimenten werd voor de toename van de A_{340} in afwezigheid van het substraat gecorrigeerd.

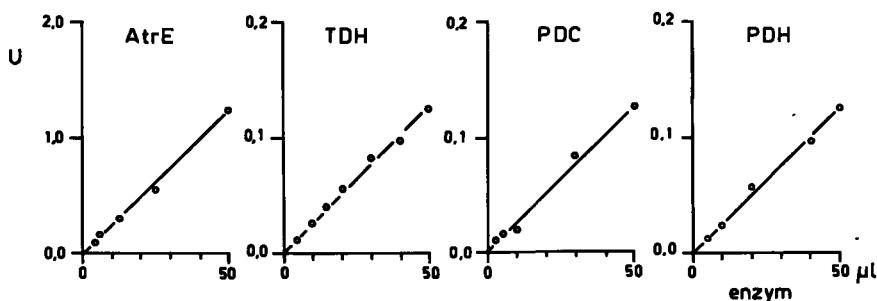
Voor de bepaling van de *PDH—activiteit* werd in de cuvet aan de NAD^+ —oplossing 20 μl 20 mM fenylacetaldehyde (in aceton) toegevoegd en vervolgens water en enzym tot een eindvolume van 3 ml. De A_{340} werd gedurende minstens 4 min geregistreerd. Aceton heeft in de gebruikte hoeveelheid geen effect op de PDH—bepaling. Voor de toename van de A_{340} in afwezigheid van het substraat werd gecorrigeerd, behalve in die gevallen, waarin fenylacetaldehyde ter stabilisering aan het enzympreparaat was toegevoegd.

Bij de bepaling van de *PDC—activiteit* werd aan 2 ml incubatiemengsel 0,8 U TDH toegevoegd. Dit werd aangevuld met gedestilleerd water tot 3 ml. De oplossing werd geïncubeerd in de spectrofotometer bij 25° en de A_{340} werd geregistreerd. Nadat deze een waarde van ongeveer 0,25 had bereikt, werd 10–50 μl van het PDC—preparaat toegevoegd en de absorptie—toename gedurende 5 min gevolgd. In een controle—experiment werd de absorptie—toename in afwezigheid van het PDC bepaald. Uit het verschil in de absorptie—toename in beide bepalingen werd de PDC—activiteit berekend. De eenheid PDC is die hoeveelheid enzym, die onder deze omstandigheden een extra stijging van de A_{340} bewerkstelligt van 2,07/min. Indien het PDC—preparaat ook PDH bevatte, werd het preparaat voorafgaande aan de bepaling gedurende 15 min bij 55° verwarmd, waardoor het PDH werd geïnactiveerd. Indien nodig werd gedenatureerd eiwit door centrifugeren verwijderd. Voor de berekening van de SA werd de oorspronkelijke eiwitconcentratie gebruikt.

Het verband tussen de gemeten enzym—activiteit en de hoeveelheid enzym is voor de enzymen AtrE, TDH, PDC en PDH recht evenredig over een groot gebied en is weergegeven in fig. 2.2.

Fig. 2.2

Verband tussen de toegevoegde hoeveelheid enzym en de gemeten activiteit



2.10 BEPALING VAN DE SPECIFIEKE ENZYM-ACTIVITEIT IN EXTRACTEN VAN PMBL-1 EN VAN MUTANTEN

Bij de bepaling van de specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen werden de bacteriën gekweekt in synthetisch medium volgens 2.4 met 0,08% fenylglyoxylzuur als koolstofbron en inductor.

De bacteriën werden gedurende de nacht gekweekt met 0,1% barnsteenzuur en 0,025% fenylglyoxylzuur. De volgende morgen werd overgeënt op 0,08% fenylglyoxylzuur en de delingstijd bepaald; 's avonds werd de eigenlijke cultuur ingezet. Hierbij werd geënt met een zodanige hoeveelheid bacteriën, dat de volgende morgen het einde van de logaritmische groeifase werd bereikt (bij $A_{700} \pm 0,9$). De culturen werden 30–90 min na het ingaan van de stationaire groeifase gekoeld met ijs tot $0-4^{\circ}$ en gecentrifugeerd gedurende 10 min bij $7000 \times g$. Vervolgens werden de bacteriën opgenomen in 1 mM EDTA 1 mM ME 0,05 mM SDS in 5–20 ml 50 mM K-fosfaat pH 7,0.

De enzymen werden geëxtraheerd d.m.v. een ultrasonische behandeling gedurende 5 min met de MSE 100 Watt Ultrasonic (no. 7100), die was voorzien van een dubbelwandig reactievat waardoor de temperatuur op $0-4^{\circ}$ kon worden gehouden. Tijdens deze procedure daalde de A_{700} tot minder dan 5% van de beginwaarde.

De invloed van de duur van de ultrasonische behandeling op het rendement van de extractie, alsmede de inactivering van de enzymen t.g.v. deze behandeling, is onderzocht. Hierbij bleek, dat voor de enzymen AtrE, TDH, PDC en PDH 3 min voldoende was voor een vrijwel volledige extractie en dat de enzymen bestand waren tegen een ultrasonische behandeling gedurende 5–10 min.

Het extract werd gecentrifugeerd bij $105.000 \times g$ gedurende 60 min. In de bovenlaag, die uit de centrifugebuis werd gepipetteerd, werden de enzym-activiteiten en de eiwitconcentratie bepaald; hieruit werd de specifieke activiteit van de enzy-

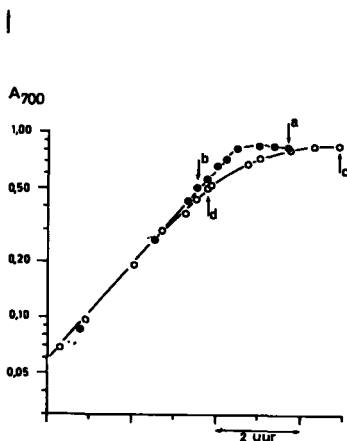
men berekend. De activiteitsbepaling werd zo snel mogelijk na de extractie uitgevoerd.

Het niet-gecentrifugeerde extract bevat een NADH-oxydase, dat storend werkt op de spectrofotometrische bepaling van TDH, PDC en PDH. Hegeman (1966) heeft beschreven dat het NADH-oxydase in *Pseudomonas* ATCC 12633 aan een deeltjes-fractie is gebonden. Dit is ook gevonden voor PMBL-1; na centrifugeren mag de NADH-oxydase-activiteit in het enzympreparaat worden verwaarloosd.

De bereiding van het extract en de bepalingen van de enzym-activiteiten en de eiwitconcentratie zijn betrouwbaar en geven geen grotere variatie dan 5% bij de bepaling van de specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen. De omstandigheden tijdens de kweek en de groeifase waarin wordt geoogst, hebben wel een groot effect op de specifieke activiteit. Dit blijkt uit het experiment, weergegeven in fig. 2.3 en tabel 2.4, waarin de specifieke activiteit in de stationaire groeifase met die in de logaritmische groeifase werd vergeleken en het effect van een minder gunstige aeratie is bestudeerd.

Fig. 2.3 en Tabel 2.4

Effect van de groeifase en de aeratie op de specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen



cultuur	AtrE	TDH	PDC	PDH
a	1,09	0,365	0,530	0,190
	* 1,06	0,350	0,540	0,205
b	0,66	0,285	0,440	0,125
	* 0,53	0,250	0,345	0,100
c	1,67	0,450	0,700	0,250
	* 1,51	0,435	0,600	0,240
d	0,99	0,380	0,570	0,155
	* 0,93	0,365	0,505	0,160

Groei van PMBL-1 in synthetisch medium met 0,2% fenylglyoxylzuur

- - ● met overleiden van lucht
- o - o zonder overleiden van lucht

* specifieke activiteit van de enzymen in de duplo-cultuur

De specifieke activiteit van de culturen, geoogst bij a en c (stationaire fase) en bij b en d (logaritmische fase) is weergegeven in de tabel 2.4

De specifieke activiteit is het grootst, wanneer onder minder gunstige aeratie condities wordt geoogst in de stationaire groeifase.

De specifieke activiteit in onafhankelijk gekweekte duplo-cultures van PMBL-1 geeft een indruk van de reproduceerbaarheid van deze bepalingen. Uit soortgelijke experimenten is gebleken dat de specifieke activiteit in de stationaire groeifase gedurende 60–120 min vrijwel constant blijft en daarna langzaam begint af te nemen. Daarom is bij de bepaling van de specifieke activiteit van de tropazuurenzymen geoogst 30–90 min na het ingaan van de stationaire groeifase; lucht is overgeleid, omdat dit in de praktijk beter reproduceerbaar is dan kweken onder sub-optimale aeratie-condities.

2.11 ZUIVERING VAN DE TROPAZUUR-ENZYMEN

De bewerkingen werden uitgevoerd bij 0–4°. Bij de zuivering werd uitgegaan van ongeveer 100 g (natgewicht) *Pseudomonas*-bacteriën (2.4).

2.11.1 Zuivering van het *AtrE*

Bereiding van het extract

De bacteriën werden ontdooid en onder krachtig roeren gesuspenseerd in 900 ml 0,01 M K-fosfaat pH 7,0 (HMP). Deze suspensie werd in porties van 50 ml gedurende 5 min onderworpen aan een ultrasonische behandeling in de 10 kcs Raytheon Oscillator (Waltham, U.S.A.). Het extract werd tweemaal gecentrifugeerd bij 10.000 $\times$ g gedurende 10 min en vervolgens bij 80.000 $\times$ g gedurende 60 min in de rotor 30 van Spinco L-2 preparatieve ultra-centrifuge. In de bovenstaande vloeistof werd de enzym-activiteit en het eiwitgehalte gemeten (2.9).

Precipitatie met streptomycine-sulfaat

Nucleïnezuur-materiaal werd door precipitatie met streptomycine verwijderd. Het streptomycine werd als geconcentreerde oplossing druppelsgewijs en onder krachtig roeren toegevoegd tot een eindconcentratie van 2%. Het neerslag werd verwijderd door 10 min centrifugeren bij 14.000 $\times$ g.

Gefractioneerde precipitatie met ammonium-sulfaat

Na verhoging van de fosfaat-concentratie tot 50 mM werd een gefractioneerde precipitatie met ammonium-sulfaat uitgevoerd. Hierbij werd het extract achtereenvolgens voor 40, resp. 55 en 85% verzadigd met ammoniumsulfaat door toevoegen van 24,3, resp. 9,7 en 22,9 g gepoederd ammoniumsulfaat per 100 ml.

Na iedere toevoeging werd de pH op 7,0 gebracht. Na 30 min roeren werd gecentrifugeerd gedurende 20 min bij 14.000 $\times$ g. Het *AtrE* precipiteerde hoofdzakelijk bij verhoging van de verzadiging van 55 tot 85%. Het 85%-precipitaat werd

verzameld en voor een refractionering gedurende 30 min gesuspenseerd in een voor 50% verzadigde ammoniumsulfaatoplossing. Hierbij ging het AtrE grotendeels in oplossing terwijl minder dan de helft van het eiwit oploste.

Na centrifugeren werd het AtrE neergeslagen met ammonium-sulfaat, opgenomen in een minimale hoeveelheid buffer en gedurende 48 uur gedialyseerd tegen 15 liter 15 mM tris-HCl pH 8,1. Na 24 uur werd de dialyse-buffer verversd. Tijdens de dialyse bleef de huls aan de bovenzijde open.

Kolom-zone-electroforese

Na dialyse werd het volume van het preparaat door vriesdrogen tot de helft teruggebracht. Na toevoegen van 0,005% saponine was het preparaat geschikt voor preparatieve kolom-zone-electroforese volgens Flodin (1956), zoals deze is uitgewerkt door Dr. F. Berends.

De elektroforese werd uitgevoerd in een 2,9 x 100 cm glazen kolom (660 ml), die aan de onderkant voorzien was van een filter van gesinterd glas. De kolom werd onder 3 m waterdruk gevuld met cellulosepoeder, dat in vacuum was gemengd met de elektroforese-buffer: 30 mM tris 15 mM HCl 0,005% saponine pH 8,1.

De cellulose heeft slechts een stabiliserende functie en is door de fabrikant voorbehandeld, zodat de adsorptie van eiwit minimaal is.

Deze kolom werd geplaatst in een 8 x 100 cm kolom, die gevuld was met buffer en verbonden was met het anode-compartiment. Het boveninde van de binnenste kolom stond in verbinding met de kathode-ruimte. Verschillen in zoutconcentratie en pH, die tijdens langdurige elektroforese kunnen ontstaan, werden voorkomen door de buffer in de kathode- en anode-ruimte continu te mengen. Nadat het preparaat op de cellulose-kolom gebracht was, werd het verplaatst tot halverwege de kolom met ± 250 ml elektroforese-buffer. Vervolgens werd een spanning van 1500 V aangelegd (± 11 V/cm cellulosebed) gedurende 40–48 uur. Hierna werd de de kolom met elektroforese-buffer geëluëerd (30–40 ml/uur); het eluaat werd opgevangen in fracties van 5 ml en de activiteit en het eiwitgehalte hierin bepaald. De fracties met een relatief hoge specifieke activiteit werden verzameld en zonder verdere bewerking gebruikt voor de hieropvolgende chromatografie.

DEAE-cellulose chromatografie

De anionenwisselaar DEAE-cellulose werd gewassen, in evenwicht gebracht met HMP en tot een kolom van 3 x 8 cm gegoten. Nadat het preparaat was opgebracht, werd het niet-gebonden materiaal door elutie met HMP verwijderd. Hierna werd de kolom geëluëerd met 600 ml HMP met een lineaire zoutgradiënt van 0,03 M KCl naar 0,1 M KCl. De elutiesnelheid werd geregeld met een slangenpomp op 30–40 ml/uur. Het AtrE werd geëluëerd bij $\pm 0,06$ M KCl. Het eluaat werd opgevangen in fracties van 5 ml en de fracties met hoge specifieke activiteit werden verzameld,

gedialyseerd tegen HMP en op een DEAE—cellulose—kolom van kleine afmetingen (2 x 2,5 cm) gebracht. Dit kolommetje werd geëluëerd met 0,4 M KCl, waardoor een geconcentreerd preparaat (15–20 ml) werd verkregen.

Gelfiltratie met Sephadex G-100

Een glazen kolom (diameter 6 cm) werd volgens de instructies van Pharmacia gevuld met Sephadex G-100 tot een hoogte van ± 30 cm (kolomvolume ± 1050 ml). De kolom werd geëquilibreerd met de elutiebuffer 0,1 M KCl in HMP. Door de hoge zoutconcentratie worden eiwit—eiwit en eiwit—Sephadex interacties voorkomen, die aanleiding geven tot een minder goede scheiding en aanzienlijke verliezen.

Het geconcentreerde preparaat werd opgebracht, geëluëerd (40 ml/uur) en opgevangen in fracties van 4,8 ml. Het gezuiverd enzympreparaat werd uit de fracties met een specifieke activiteit hoger dan 500 samengesteld.

2.11.2 Zuivering van TDH, PDC en PDH

Bij de zuivering van de enzymen TDH en PDC verloopt de bereiding van het extract en de precipitatie met streptomycine—sulfaat identiek aan de zuivering van het AtrE.

Het TDH werd geprecipiteerd door verhoging van de ammonium—sulfaat—verzaadiging van 45 tot 55%. Hierna werd het TDH gezuiverd met gelfiltratie over Sephadex G-100 en chromatografie over DEAE—cellulose. Hierbij werden dezelfde kolommen en elutiemiddelen gebruikt als voor het AtrE. Het TDH werd hierbij slechts gedeeltelijk gescheiden van het nog aanwezig AtrE.

Het PDC werd neergeslagen door verhoging van de ammonium—sulfaat—verzadiging van 50 tot 60%; het werd van DEAE—cellulose geëluëerd met een lineaire zoutgradiënt van 0,1–0,4 M KCl in HMP en hierbij vrijwel volledig van het nog aanwezige TDH gescheiden (7.2).

Het PDH werd gezuiverd in aanwezigheid van 50 mM K—fosfaat pH 7,0 1mM EDTA 1 mM ME 0,05 mM SDS en 1 mM fenylacetaldehyde.

Na de precipitatie van nucleïnezuur—materiaal met streptomycine—sulfaat werd het PDH neergeslagen door verhoging van de ammoniumsulfaat—verzadiging van 40–50%. Bij de chromatografie over DEAE—cellulose werd het enzym geëluëerd met een gradiënt van 0–0,25 M KCl in de beschreven buffer.

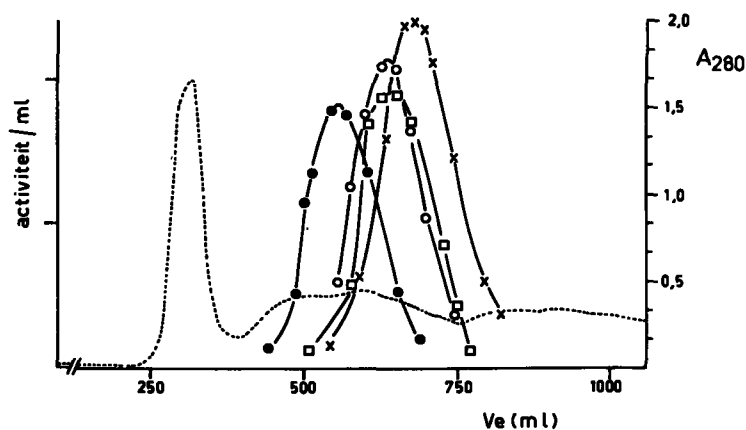
2.11.3 Schatting van het molecuulgewicht van de tropazuur—enzymen

Het volume, waarmee een eiwit tijdens gelfiltratie wordt geëluëerd, is binnen bepaalde grenzen rechtevenredig met de negatieve logaritme van het moleculair gewicht (MW); dit geldt voor globulaire eiwitten, die niet door de kolom worden geab-

sorbeerd, noch om een andere reden dan vanwege de grootte door het Sephadex-materiaal worden geëxcludeerd (Janson, 1967). Met deze methode is een schatting gemaakt van het MW van de enzymen AtrE, TDH, PDC en PDH. De gelfiltratie werd uitgevoerd zoals die voor het AtrE is beschreven (2.11.1) met een preparaat dat na fractionering met ammoniumsulfaat de vier enzymen bevatte. De scheiding is weergegeven in fig. 2.5.

Fig. 2.5

Scheiding van de tropazuur-enzymen door gelfiltratie



Het enzympreparaat (10 ml ammoniumsulfaat-fractie 40-80% verzadiging) werd op een Sephadex G-100 kolom gebracht en geëluëerd met 0,1 M KCl in HMP. Enzymactiviteit bepaald volgens 2.9.

V_e = elutievolume (ml).

x - x AtrE (V_e = 675)

o - o TDH (V_e = 635)

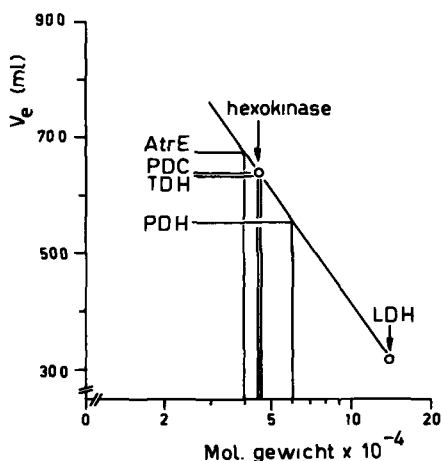
□ - □ PDC (V_e = 640)

● - ● PDH (V_e = 560)

Melkzuur-dehydrogenase (MW 140.000) en hexokinase (MW 45.000) (Schachman, 1963) werden als referentie-eiwitten toegevoegd. Het LDH werd na gelfiltratie aangetoond d.m.v. de NADH-afhankelijke hydrogenering van pyrodruivenzuur; het hexokinase werd titrimetrisch bepaald in aanwezigheid van ATP en Mg^{2+} volgens Moore e.a. (1968). Uit het elutie-volume (gemiddeld uit drie experimenten) is het MW van de enzymen AtrE, TDH, PDC en PDH geschat op 39.000, resp. 46.000, 45.000 en 60.000 (zie fig. 2.6).

Fig. 2.6

Schatting van het moleculair gewicht uit het elutie-volume bij gelfiltratie



Het elutievolume van de referentie-eiwitten (hexokinase en LDH) is uitgezet tegen de logaritme van het moleculair gewicht. Uit de gevonden elutie-volumina (Fig. 2.5) van de tropazuur-enzymen is het moleculair gewicht geschat.

2.12 SPECTROSCOPISCHE EN CHEMISCHE ANALYSES

Bij de spectroscopische en chemische analyses werd van de zijde van het Chemisch Laboratorium RVO-TNO veel medewerking verkregen.

De infrarood spectroscopie voor de structuuropheldering van het pma werd uitgevoerd door Drs. F.H. Meppelder en H.C. Beck. Voor een interpretatie van het gehele spectrum (3.3), evenals voor het kernspinresonantie-spectrum wordt verwezen naar Stevens en Meppelder (1969).

De gaschromatografische bepaling van fenylaceetaldehyde werd uitgevoerd door A. Verweij m.b.v. Becker gaschromatograaf no. 2558. Als stationaire fase werd gebruikt een $0,4 \times 180$ cm kolom met 20% OV-17 op Chromosorb W-AW 60-80 mesh; de mobiele fase was N_2 (voordruk $0,8 \text{ kg/cm}^2$) en H_2 (voordruk $0,2 \text{ kg/cm}^2$); de temperatuur bij injectie was 210° , de kolomtemperatuur was 130° ; vlam-ionisatie-detectie. Onder deze omstandigheden hebben benzaldehyde, fenylacet-aldehyde en 2-fenylpropanal een retentietijd van 5,8 resp. 8,8 en 11,8 min.

De elementair-analyses werden verricht door N. Kramer. F.A.A. Mitzka stelde vers gedestilleerde oplosmiddelen beschikbaar.

UV-spectra werden opgenomen m.b.v. een Beckman DK-2 spectrofotometer. Smeltpunten werden bepaald m.b.v. een Büchi smeltpunt-microscop; opwarm-snelheid max. $0,5^\circ$ per min.

2.13 BEPALING VAN HET ENOL-GEHALTE VAN 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE

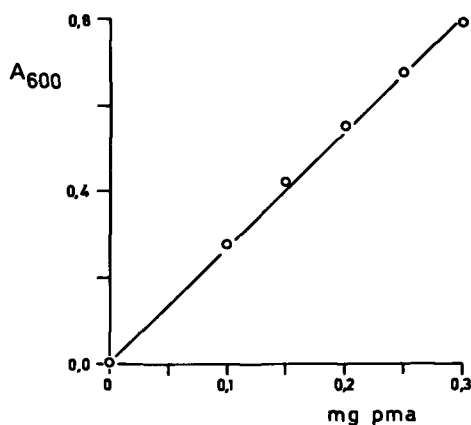
De bepaling is gebaseerd op de methode van Kaufmann en Richter (1925), waarbij het complex van het enol met FeCl_3 colorimetrisch wordt bepaald.

In de cuvet (10 mm lichtweg) werd 2,55 ml ferrichloride-reagens (1% FeCl_3 in methanol) gemengd met 50–400 μl pma en aangevuld met gedestilleerd water tot 3 ml. Het ferrichloride-complex van het enol-pma bleek optimaal gemeten te kunnen worden bij 600 nm. De absorptie was echter niet constant; gewoonlijk werd een afname van 1 – 2 % per min waargenomen. Derhalve werd de absorptie gedurende 5 min geregistreerd, waarna de absorptie direct na menging van enol-pma met het reagens door extrapolatie werd verkregen.

Voor het bepalen van het verband tussen de A_{600} en de hoeveelheid enol-pma werd uitgegaan van een oplossing van pma in watervrije ether. Hierin is het pma volledig in de enol-vorm aanwezig, zoals gebleken door vergelijking met pma in tetrachloorkoolstof, waarvan uit de spectroscopische analyse is afgeleid, dat het volledig de enol-structuur bezit. Ether werd gebruikt als oplosmiddel, omdat tetrachloorkoolstof in de enzymologische experimenten niet kon worden gebruikt.

Uit fig. 2.7 blijkt, dat de gemeten absorptie recht evenredig is met de hoeveelheid toegevoegd pma. De bepaling werd niet gestoord door 400 μl water of door 400 μl 0,5 M tris-HCl buffer pH 7,5; fosfaatbuffer gaf een neerslag met FeCl_3 en kon daarom niet worden gebruikt. De bepaling werd uitgevoerd bij 25°; het reagens werd vooraf op deze temperatuur gebracht.

Fig. 2.7
Bepaling van het enol-gehalte van een pma-oplossing



Verschillende hoeveelheden pma opgelost in 0,40 ml ether, werden gemengd met 2,55 ml ferrichloride-reagens. De absorptie bij 600 nm werd gedurende 5 min geregistreerd. De absorptie, verkregen door extrapolatie naar tijd $t \approx 0$, is uitgezet als functie van de toegevoegde hoeveelheid enol-pma.

HOOFDSTUK 3

SYNTHESE EN EIGENSCHAPPEN VAN 2-FENYLMALONZUUR—SEMI—ALDEHYDE

3.1 INLEIDING

Tijdens de bestudering van de afbraak van atropine werden aanwijzingen verkregen dat 2-fenylmalonzuur—semi—aldehyde (pma) (zie fig. 3.1 V) een tussenproduct zou kunnen zijn in deze afbraak en bleek het nodig over de verbinding te kunnen beschikken. In de handboeken zal men echter vergeefs zoeken naar verwijzingen voor de synthese of eigenschappen van deze verbinding ondanks de eenvoudige structuur van het pma. De methyl en ethyl ester van pma zijn wel gesynthetiseerd, maar het zuur zou in vrije vorm niet stabiel en daarom niet bekend zijn (Rodd, 1956).

Een poging het pma te synthetiseren door oxydatie van tropazuur met alkalisch kaliumpermanganaat leidde tot een produkt, dat in staat bleek de tropazuur—enzymen te induceren. Nadere analyse bracht echter aan het licht, dat niet het pma, doch fenylglyoxylzuur was verkregen. Bij toeval werd hierdoor een gratuite inductie van de tropazuur—enzymen ontdekt, die in hoofdstuk 10 nader zal worden behandeld.

In een later stadium van het onderzoek werd één literatuurreferentie gevonden, waarin de synthese van het pma was beschreven (Strukov, 1952). Hierin worden van het pma, behalve het smeltpunt en het feit dat het in water spontaan ontleedt tot fenylaceetaldehyde en koolzuur, weinig concrete gegevens vermeld.

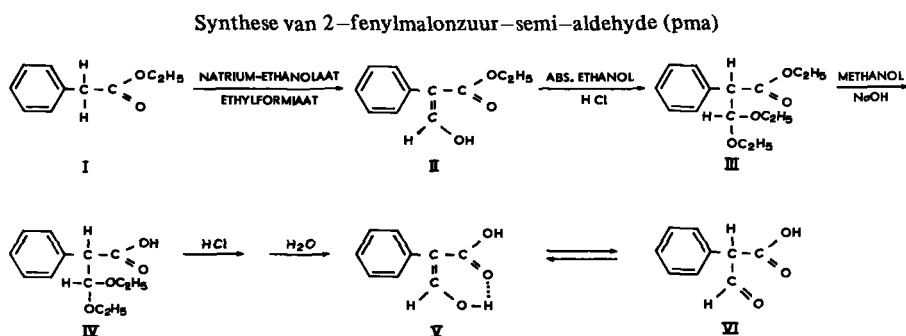
De synthese van pma is volgens dit voorschrift uitgevoerd. Het reactieproduct kon worden geïdentificeerd als pma in de enol—vorm (enol—pma).

Bij de bestudering van het effect van deze stof op de enzymatische dehydrogenering van tropazuur (6.6) bleek een sterke invloed van de keto—enol tautomerie. Daarom zijn de tautomere eigenschappen van het pma nader onderzocht en werd een kwantitatieve colorimetrische bepaling van enol—pma uitgewerkt. Hiermee kon worden aangetoond, dat in alcohol bij 0° enol—pma verdwijnt, terwijl uit infrarood—analyse aanwijzingen werden verkregen voor een gelijktijdige vorming van de keto vorm van pma (keto—pma). Ook werd de tautomere omlegging in waterig milieu bestudeerd. De resultaten hiervan zijn van groot belang gebleken voor de interpretatie van de kinetiek van de enzymen TDH en PDC.

3.2 DE SYNTHESE VAN HET 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE

Het pma (V) is gesynthetiseerd uit fenylazijnzuur volgens het reactieschema in fig. 3.1. Tabel 3.2 vermeldt enkele eigenschappen van de intermediaire verbindingen en van het product.

Fig. 3.1



Tabel 3.2

Eigenschappen van de producten verkregen bij de synthese van pma

verbinding	gevonden waarde	literatuur resp. berekende waarde
II Ethyl ester van pma	Kpnt. 124–126 ⁰ . 12 mm. n_D^{23} 1,5312	Kpnt. 139–140 ⁰ . 16 mm. (Beilstein) n_D 1,5322
III Diethylacetaal van ethyl ester van pma	Kpnt. 142–144 ⁰ . 6 mm. n_D^{24} 1,5318	Kpnt. 166–168 ⁰ . 20 mm. (Strukov, 1952)
IV Diethylacetaal van pma	Smeltp. 127.5–128 ⁰ C–H–O–analyse 65,50%C 7,58%H 27,21%O	Smeltp. 121–123 ⁰ (Strukov, 1952) C–H–O–analyse 65,53%C 7,61%H 26,86%O
V pma	Smeltp. 85–94 ⁰ (ontleding) C–H–analyse 66,02%C 5,02%H	Smeltp. 101–103 ⁰ (ontleding) (Strukov, 1952) C–H–analyse 65,85%C 4,91%H

Fenylazijnzuur werd omgezet in de ethyl ester (I); hieruit werd door condensatie met ethyl formiaat in natrium ethanolaat de ethyl ester van pma (II) bereid, waarbij de methode van Friedman en Gladych (1956) als leidraad werd gebruikt. Het product werd gezuiverd door extractie en destillatie.

Met een oplossing van ferrichloride in methanol gaf II een violette kleur, die na toevoegen van broomwater weer verdween. Dit wees er op, dat II geheel of gedeeltelijk in de enol-vorm aanwezig was.

De verdere synthese werd uitgevoerd volgens Strukov (1952). Hierbij werd II, opgelost in droge ethanol en onder doorleiden van droog zoutzuurgas omgezet in het diethylacetaal van de ethyl ester van pma (III). Na neutraliseren met alcoholische loog werd III geïsoleerd door destillatie onder verminderde druk. Vervolgens werd de esterbinding gehydrolyseerd met 2 N NaOH in 80% methanol. Het diethylacetaal van pma (IV) werd door aanzuren neergeslagen, omgekristalliseerd uit toluen en geïdentificeerd op grond van het smeltpunt en de elementair-analyse.

Het pma (V) werd hieruit bereid door roeren in geconcentreerd zoutzuur bij 0°, gevolgd door toevoegen van een gelijk volume gedestilleerd water. Het produkt werd op een filter verzameld, grondig gewassen met ijswater, nagewassen met petroleum-ether (kpnt. 40–60°) en gedroogd in vacuum.

3.3 IDENTIFICATIE VAN HET 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE

De elementair-analyse van de gesynthetiseerde verbinding (tabel 3.2) laat een goede overeenstemming zien met de theoretisch verwachte waarden. De stof reageert met FeCl_3 in alcohol tot een violet complex, hetgeen er op wijst, dat de verbinding geheel of gedeeltelijk in de enol-vorm aanwezig is. In water treedt ontleding op, waarbij de karakteristieke geur van fenylaceetaldehyde wordt waargenomen.

De definitieve identificatie van het pma berust op de analyse van het infrarood- en kernspinresonantie-spectrum, op de gaschromatografische analyse van het ontledingsproduct fenylaceetaldehyde en op biochemische aanwijzingen. De bepaling van het smeltpunt of het ontledingstraject, de enige door Strukov beschreven eigenschap, bleek niet geschikt voor karakterisering.

3.3.1 Het ontledingstraject

Volgens Strukov ontleedt het ruwe reactieproduct bij het smeltpunt (101–103°) in fenylaceetaldehyde en koolzuur; de gesynthetiseerde verbinding bleek echter bij 85–94° te ontleden. Zelfs na drie maal omkristalliseren uit tetrachloorkoolstof, waarbij fraaie naaldevormige kristallen werden verkregen, was het ontledingstraject 10–15° beneden de literatuurwaarde. Het viel hierbij op, dat kleine kristallen aanzienlijk eerder ontleedden dan grote. Blijkbaar heeft de kristal grootte een aanzienlijk effect op het ontledingstraject. Dit werd bevestigd door een gedeelte van een groot

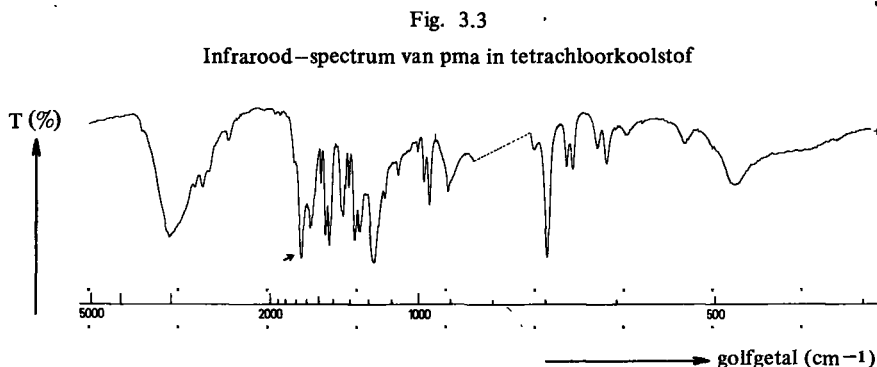
kristal tot poeder te wrijven en van kristal en poeder de ontledingstrajecten te bepalen; deze bedroegen resp. $92-93^{\circ}$ en $58-67^{\circ}$.

Het is duidelijk dat het smelt- of ontledingstraject als parameter voor de karakterisering van het pma ongeschikt is; de discrepantie tussen de gevonden en de literatuurwaarde sluit niet uit dat het preparaat van Strukov identiek is aan het hier gesynthetiseerde product. Strukov's kristallen moeten echter wel respectabele afmetingen hebben bezeten.

3.3.2 Infrarood- en kernspinresonantie-spectroscopie

Uit de resultaten van de infrarood- en kernspinresonantie-spectroscopie is door Meppelder afgeleid, dat de gesynthetiseerde verbinding inderdaad 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde is. Een volledige behandeling van deze materie valt buiten het kader van dit proefschrift; deze zal afzonderlijk worden gepubliceerd (Stevens en Meppelder, 1969). Hier zullen uitsluitend de gegevens besproken worden, die hebben geleid tot de toekenning van de enol-structuur aan het gesynthetiseerde product.

Het infrarood-spectrum van het omgekristalliseerde reactie-product, opgelost in tetrachloorkoolstof, is weergegeven in fig. 3.3. Het spectrum van de vaste stof is hieraan identiek.



Indien pma in de keto-vorm aanwezig is, verwacht men de karakteristieke absorptie van de rektrilling van de aldehyde $C=O$ bij $1740-1720\text{ cm}^{-1}$ en die voor de $C=O$ van de carboxyl-groep bij $1725-1700\text{ cm}^{-1}$. Beide absorpties zijn in het spectrum echter volledig afwezig.

Voor pma in de enol-structuur verwacht men voor de rektrilling van de carboxyl $C=O$ een absorptie bij ongeveer 1648 cm^{-1} , die gevonden is door Friedman en Gladych (1956) voor de carboxyl $C=O$ van de tropine ester van pma. Het spectrum van pma vertoont een sterke band bij 1653 cm^{-1} , die hiermee in fraaie overeenstemming is. Deze frequentie is abnormaal laag, want de normale waarde

voor een $\alpha - \beta$ onverzadigd zuur ligt bij $\pm 1700 \text{ cm}^{-1}$ (in het structureel verwante atropazuur $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}(=\text{CH}_2)\text{COOH}$ werd 1694 cm^{-1} gevonden). De bathochrome verschuiving zou kunnen worden veroorzaakt door de vorming van een intramoleculaire waterstofbrug (zie fig. 3.1 V), waarvoor de hydroxylgroep van de enol-vorm beschikbaar is.

De $\text{C}=\text{C}$ in de zijketen van atropazuur absorbeert bij 1620 cm^{-1} ; bij een enol-structuur van pma, waarin de hydroxyl-groep in een waterstofbrug betrokken is, mag men voor de absorptie van de $\text{C}=\text{C}$ ook een lagere waarde verwachten, zodat de absorptie bij 1574 cm^{-1} hieraan kan worden toegeschreven. Het infraroodspectrum is dus niet in overeenstemming met de keto-vorm van pma, maar kan wel worden verklaard indien de stof in de enol-vorm aanwezig is.

Ook in het kernspinresonantie-spectrum is de karakteristieke absorptie van de aldehyde-groep afwezig en worden absorpties waargenomen, die duiden op de aanwezigheid van een ethyleen- en een hydroxylproton. Door vergelijking van dit spectrum met dat van atropazuur en door bestudering van het effect van trifluorazijnzuur op het spectrum kon een volledige bevestiging van de enol-structuur worden verkregen.

3.3.3. Gaschromatografie

Een verder bewijs voor de identiteit van pma wordt geleverd door de waarneming, dat bij de thermische ontleding fenylacetaldehyde wordt gevormd. Dit is onderzocht m.b.v. gaschromatografie. Een etherische oplossing van pma werd in de gaschromatograaf geïnjecteerd waarvan het injectieblok een temperatuur had van 200° . Onder omstandigheden zoals beschreven in 2.12 werd één product gevonden; dit had een retentietijd van 8,8 min, die identiek was aan die van de referentie fenylacetaldehyde.

3.3.4 Biochemische aanwijzingen

Zoals in hoofdstuk 6 zal worden beschreven, is het enzym tropazuur-dehydrogenase zowel in staat de dehydrogenering van tropazuur als de hydrogenering van pma te versnellen. Bij de enzymatische hydrogenering van pma is tropazuur als reactie-product aangetoond m.b.v. dunnelaagchromatografie.

3.4 TAUTOMERE OMLEGGING VAN HET 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE

3.4.1 Kwantitatieve bepaling van de enol-vorm

Vanwege het belang van de tautomerie van pma bij de interpretatie van de kinetiek van het TDH is een kwantitatieve bepaling voor enol-pma ontwikkeld. Deze is

gebaseerd op de kwantitatieve enol-bepaling, beschreven door Kaufman en Richter (1925), waarbij gebruik wordt gemaakt van de kleurreactie van de enol-verbinding met FeCl_3 in methanol. De experimentele omstandigheden moeten hierbij zeer goed worden gestandaardiseerd, wil de methode kwantitatief bruikbaar zijn. Zo moet worden voorkomen, dat de bepaling wordt verstoord door verschuiving van het keto-enol evenwicht door acetaalvorming of door oxydatie van de enol door FeCl_3 . Zoals onder 2.13 is beschreven kan hiervoor worden gecorrigeerd door de absorptie van het FeCl_3 -enol-complex bij 600 nm gedurende enige tijd te registreren en vervolgens te extrapoleren naar tijd $t=0$.

3.4.2 *Verschuiving van het keto-enol evenwicht in ethanol bij 0°*

Met behulp van de enol-bepaling met FeCl_3 is de stabiliteit van enol-pma in verschillende oplosmiddelen onderzocht. Gebruikt men droge ether als oplosmiddel voor enol-pma dan blijft de enol-concentratie gedurende minstens enkele uren constant. In ethanol blijkt de enol-concentratie echter met de tijd af te nemen. De afname verloopt bij 0° volgens een eerste orde reactie met een snelheidsconstante van 0,2 – 0,3 uur⁻¹; d.w.z. de helft van enol-pma wordt omgezet in ongeveer drie uur. De meest waarschijnlijke verklaring voor deze afname is een verschuiving van het keto-enol evenwicht van pma ten gunste van de keto-vorm. Het zou echter ook mogelijk zijn, dat enol-pma of keto-pma ontleedt tot fenylacetaldehyde. Verder zou de afname ook kunnen worden veroorzaakt door de vorming van het diethylacetaal van pma, waardoor keto-pma aan het keto-enol evenwicht wordt onttrokken.

In hoofdstuk 6 wordt een kwantitatieve enzymatische bepaling beschreven, waarmee de totale hoeveelheid pma (dus enol+keto) kan worden bepaald; deze bepaling reageert niet op het diethylacetaal of op fenylacetaldehyde. Hiermee werd gevonden dat de totale hoeveelheid pma in ethanol bij 0° gedurende drie uur met niet meer dan 5% afnam, zodat het verdwijnen van enol-pma gepaard moet zijn gegaan met de vorming van keto-pma.

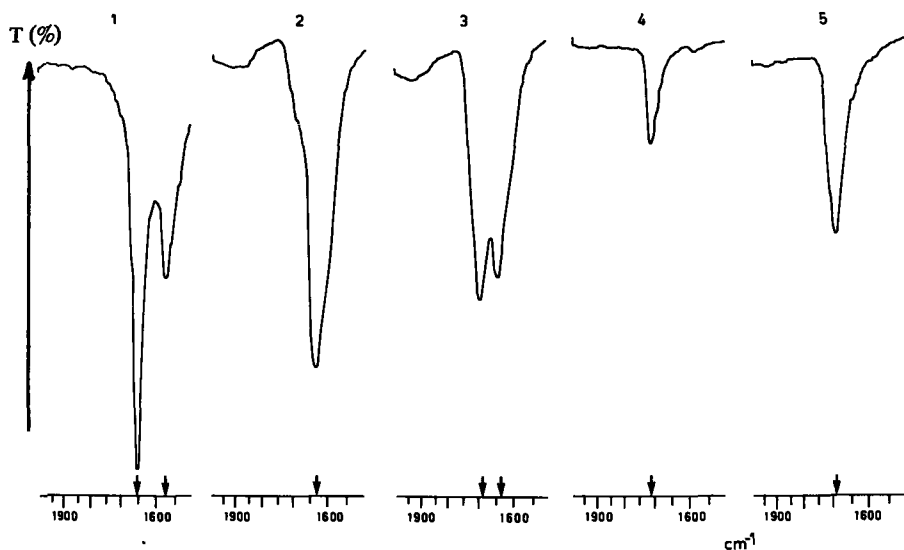
Directe aanwijzingen voor het ontstaan van keto-pma zijn verkregen met infrarood-spectroscopie. Hiertoe werden spectra van pma opgenomen van 2000–1500 cm⁻¹ met tetrachloorkoolstof of ethanol als oplosmiddel in een gekoelde infrarood-cel. In het algemeen veroorzaken de rektrillingen van de carbonylgroepen in de geïsoleerde aldehyde- en carboxylgroep absorpties bij 1740–1700 cm⁻¹. De enol-vorm van pma absorbeert niet bij deze frequenties (zie 3.3.2), maar voor de keto-vorm worden in dit gebied absorptie-maxima verwacht.

Fig. 3.4.1 toont het deelspectrum van enol-pma opgelost in tetrachloorkoolstof met absorptie-maxima bij 1653 en 1574 cm⁻¹. Fig. 3.4.2 geeft het spectrum van pma, opgelost in ethanol bij 0° en direct gemeten. Dit spectrum vertoont de bekende verbreding van de absorptiepieken en een verschuiving naar een lager golfgetal door interactie met het oplosmiddel. Het absorptiemaximum wordt bij 1635 cm⁻¹

gevonden. Fig. 3.4. 3 geeft het spectrum van pma opgelost in ethanol en gedurende vier uur bij 0^0 bewaard; er verschijnt een aanzienlijke piek bij 1690 cm^{-1} ; de absorptie bij 1635 cm^{-1} is afgenomen. In fig. 3.4 4 en 5 zijn de spectra weergegeven van fenylacetaldehyde resp. van het diethylacetaal van pma in hoeveelheden die bij volledige omzetting maximaal uit pma kunnen ontstaan. De plaats en de grootte van de absorptie-maxima in het spectrum in fig. 3.4 3 wijzen niet op een aanzienlijke omzetting in één van deze twee verbindingen. Bovendien werd met genoemde enzymatische bepalingsmethode aangetoond, dat de totale hoeveelheid pma in de cuvet nauwelijks was afgenomen. Uit deze gegevens blijkt, dat de afname van de concentratie van enol-pma, zoals die is waargenomen met de FeCl_3 -bepaling, gepaard gaat met de vorming van een stof met een absorptie bij 1690 cm^{-1} . Aangezien een absorptie in dat gebied verwacht wordt voor de carbonylgroepen van keto-pma in ethanol is hiermee een directe aanwijzing verkregen voor het verschuiven van het keto-enol evenwicht in een pma-oplossing in ethanol bij 0^0 ten gunste van de keto-vorm.

Fig. 3.4

Spectrale aanwijzingen voor de vorming van keto-pma



Het infrarood-spectrum is voor de volgende oplossingen (concentratie 0,2 M) opgenomen van $2000-1500\text{ cm}^{-1}$ ($5,0 - 6,6\text{ }\mu$).

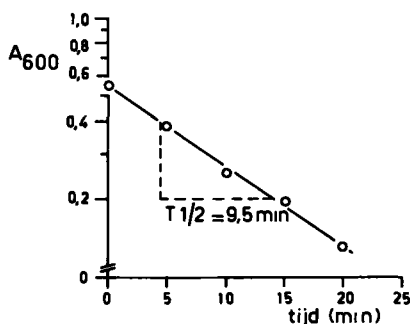
1. pma in ether
2. pma in ethanol bij 0^0 (direct gemeten)
3. idem (na 4 uur bij 0^0)
4. fenylacetaldehyde in ethanol
5. diethylacetaal van pma in ethanol

3.4.3 Snelheid van de tautomere omlegging in waterig milieu

Met de kwantitatieve enol-bepaling kon ook de snelheid van omzetting van enol-pma in keto-pma worden bepaald in waterig milieu onder de omstandigheden waaronder de TDH- en PDC-activiteit wordt gemeten. Als buffer werd tris-HCl gekozen, omdat fosfaat de bepaling met ferrichloride stoort. Buisjes met 0,40 ml 0,2 M tris-HCl buffer (pH 7,5), waaraan 20 μ l van een oplossing van enol-pma in ether (10 mg/ml) was toegevoegd, werden gedurende bepaalde tijden geïncubeerd bij 25°; daarna werd 2,55 ml ferrichloride-reagens (2.13) toegevoegd en de hoeveelheid enol-pma bepaald uit de absorptie bij 600 nm. In fig. 3.5 is de enol-concentratie semi-logaritmisch uitgezet tegen de tijd; hieruit blijkt dat enol-pma wordt omgezet volgens een eerste orde reactie met een reactieconstante $k = 0,073 \text{ min}^{-1}$ (halveringstijd $T_{1/2} = 9,5 \text{ min}$). In hoofdstuk 6 zal worden aangetoond dat ook in dit milieu het verdwijnen van de enol-vorm gepaard gaat met vorming van een gelijke hoeveelheid keto-pma, zodat de gemeten reactieconstante betrekking heeft op de snelheid van de tautomere omlegging.

Fig. 3.5

Effect van incubatie in buffer op het enol-gehalte van pma



Enol-pma werd geïncubeerd in 0,4 ml (0,2 M) tris-HCl pH 7,5 gedurende verschillende tijden; daarna werd 2,55 ml FeCl_3 -reagens toegevoegd en het enol-gehalte bepaald volgens 2.13.

HOOFDSTUK 4

DE AFBRAAK VAN ATROPINE EN TROPAZUUR IN PSEUDOMONAS PMBL-1

4.1 INLEIDING

Het geslacht *Pseudomonas* blijkt te beschikken over de opvallende capaciteit vele aromatische verbindingen te metaboliseren en als energiebron te gebruiken. Een groot aantal van deze verbindingen kan door hogere organismen en door andere micro-organismen niet worden afgebroken of is hiervoor zelfs toxisch (Overzichts-artikelen: van der Linden en Thijse, 1965; Gibson 1968). Typische voorbeelden hiervan zijn benzoëzuur en 6-chloorxylenol, die op grote schaal worden gebruikt als conserveringsmiddel resp. als desinfectans.

De afbraak van aromatische verbindingen in *Pseudomonas* species begint soms met een hydroxylering van de aromatische ring, terwijl in andere gevallen eerst de eventuele zijketen geheel of gedeeltelijk wordt geëlimineerd.

De afbraak van de aromatische ring verloopt door hydroxylering (fig. 4.1) tot het di-fenol dat vervolgens door insertie van een zuurstofmolecuul wordt omgezet in een onverzadigd meer-basisch vetzuur. Hieruit ontstaan tenslotte fragmenten met

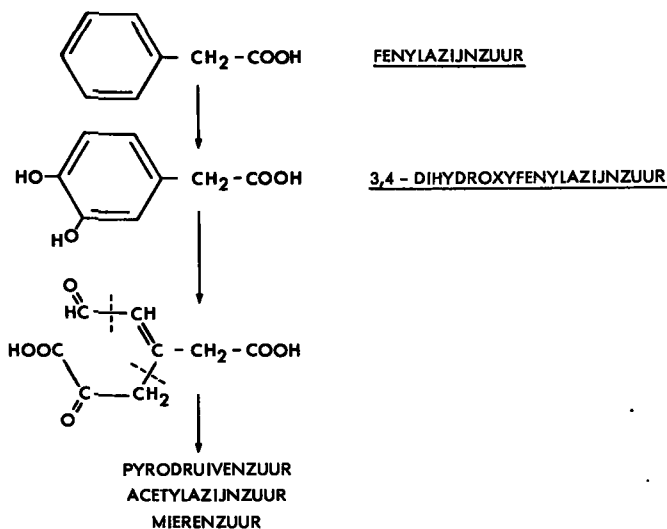


Fig. 4.1

Een van de mogelijkheden voor de afbraak van fenylazijnzuur in *Pseudomonas* (Dagley 1964).

2-4 koolstofatomen, die door de bacterie kunnen worden gebruikt als bouwstenen voor de synthese van de essentiële celcomponenten. De plaatsen waar de hydroxylgroepen en het zuurstofmolecuul worden ingevoerd, blijken verschillend te zijn voor de verschillende *Pseudomonas*-soorten; fig. 4.1 toont slechts één van de mogelijkheden. Een dergelijke afbraak is aangetoond voor o.a. de aromatische verbindingen benzoëzuur, fenylazijnzuur, 3-fenylpropionzuur en thymol (2-hydroxy-3-isopropyltolueen) (Chamberlain en Dagley 1968).

Wanneer de afbraak bij de zijketen begint, wordt de zijketen gewoonlijk door oxydatie en decarboxylering afgebroken. Zo wordt b.v. amandelzuur (2-hydroxy-fenylazijnzuur) in een *Pseudomonas putida* omgezet in benzoëzuur (Gunsalus e.a. 1953 a en b; Stanier e.a. 1953) en wordt n-butylbenzeen geoxydeerd tot fenylazijnzuur.

Bij de afbraak van p-cresol (p-hydroxytolueen) komen beide patronen voor (Chapman en Hopper 1968); in sommige *Pseudomonas* species wordt de verbinding geoxydeerd tot p-hydroxybenzoëzuur (afbraak van de zijketen), terwijl in andere *Pseudomonaceae* p-cresol door hydroxylering van de fenyl-kern in 2,3-dihydroxytolueen wordt omgezet.

Omdat er geen verband kan worden gelegd tussen de manier van afbraak en de structuur van de verbinding of de betreffende bacterie-soort, was het bij de aanvang van het onderzoek niet mogelijk de meest waarschijnlijke afbraak van tropazuur in de door Rörsch en Berends geïsoleerde *Pseudomonas* PMBL-1 te voorspellen.

In het onderzoek dat in dit hoofdstuk wordt beschreven, is de adaptatie van PMBL-1 aan enkele aromatische carbonzuren bestudeerd om na te gaan of deze verbindingen wellicht betrokken zijn bij het metabolisme van tropazuur. Verder is getracht uit het kweekmedium van het wilde type en van mutanten van PMBL-1 afbraakproducten van tropazuur te isoleren. Uit de hierbij verkregen resultaten zal worden afgeleid dat bij het metabolisme van tropazuur in eerste instantie de alifatische zijketen wordt afgebroken.

4.2 KOOLSTOFBRONNEN VOOR PMBL-1

Teneinde een indruk te verkrijgen van het vermogen van *Pseudomonas* PMBL-1 aromatische en atropine-achtige stoffen te metaboliseren, is voor een aantal verbindingen nagegaan welke hiervan door *Pseudomonas* als koolstofbron kunnen worden gebruikt. Hierbij werd *Pseudomonas* PMBL-1, gekweekt in synthetisch medium met 0,1% glucose of barnsteenzuur en 0,025% van de betreffende verbinding, overgeënt in synthetisch medium met 0,025% van de verbinding en 0,005% barnsteenzuur. Deze cultuur werd gedurende 18 uur bij 30° gekweekt, waarna de bacterie-concentratie werd bepaald volgens 2.4.

De volgende stoffen bleken te voldoen als koolstofbron:

atropine	fenylazijnzuur	fenylglyoxylzuur
homatropine	p-hydroxy-fenylazijnzuur	fenylaceetaldehyde
tropine	m-hydroxy-fenylazijnzuur	benzaldehyde
tropazuur	fenylpyrodruivenzuur	

Deze verbindingen konden ook in hogere concentraties als koolstofbron worden gebruikt, behalve fenylaceetaldehyde en benzaldehyde die in een concentratie hoger dan 0,025% toxisch waren.

Geen of zeer geringe groei werd waargenomen in aanwezigheid van de volgende verbindingen:

2-fenylacrylzuur	3-fenylacrylzuur	2-fenylpropanol
2-fenyl-2-hydroxypropionzuur	2-hydroxy-fenylazijnzuur	3-fenylpropenol
2-hydroxy-3-fenylpropionzuur	2-fenylpropanal	2-fenylethanol
2-fenylpropionzuur	3-fenylpropenol	benzylalcohol

Voor een meer uitvoerige lijst van metaboliseerbare en niet-metaboliseerbare verbindingen wordt verwezen naar tabel 10.3.

4.3 DE ADAPTATIE VAN PMBL-1 AAN AROMATISCHE ZUREN

De adaptatie van *Pseudomonas* PMBL-1 aan tropazuur en enkele andere aromatische zuren is bestudeerd, waarbij o.a. werd nagegaan in hoeverre adaptatie aan tropazuur, adaptatie aan andere verbindingen met zich mee bracht. Hierdoor zouden misschien betrekkingen tussen het metabolisme van deze aromatische zuren kunnen worden aangetoond zonder bekend te zijn met de manier, waarop deze verbindingen door de bacterie worden afgebroken.

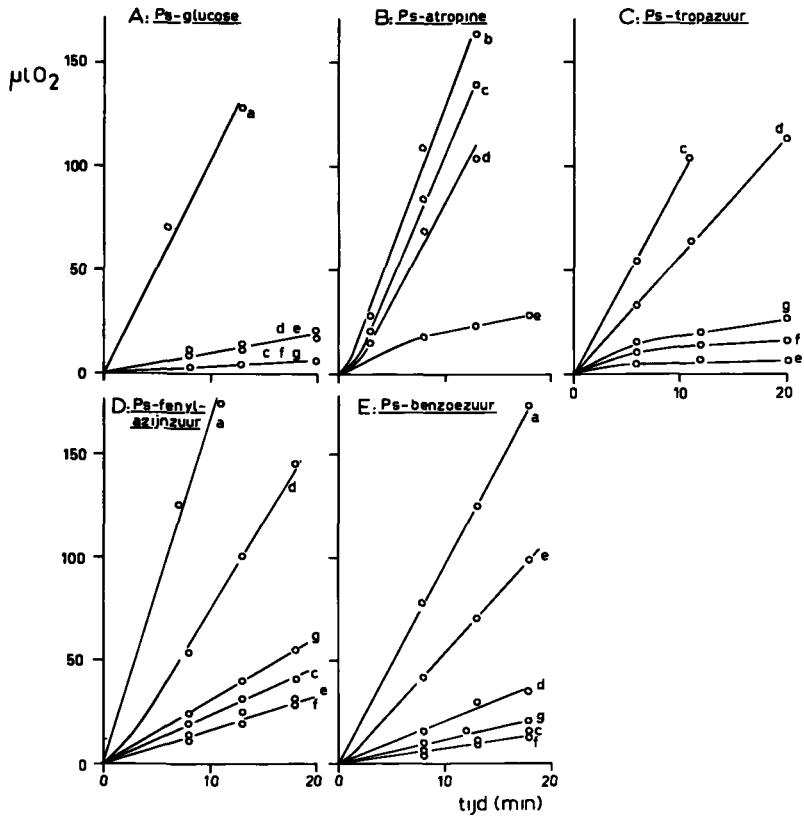
Bij een dergelijke studie kan men gebruik maken van de eigenschap dat bacteriën die geadapteerd zijn aan een bepaalde koolstofbron onmiddellijk na toevoegen van deze stof tot metabolische activiteit in staat zijn, terwijl niet-geadapteerde bacteriën eerst een adaptatie-periode doormaken, voordat het metabolisme in deze bacteriën op gang komt. Een nauwkeurig onderscheid tussen metaboliserende en niet-metaboliserende cellen kan voor een obligaat aeroob organisme worden gemaakt door de opname van zuurstof als functie van de tijd te bepalen (Stanier 1950).

Deze methode is gebruikt bij de bestudering van de adaptatie van *Pseudomonas* PMBL-1 (obligaat aeroob; zie 2.3) aan de volgende koolstofbronnen: atropine, tropazuur, fenylazijnzuur, benzoëzuur, p-hydroxy-fenylazijnzuur, m-hydroxy-fenylazijnzuur en glucose. De zuurstofopname is bepaald met de manometrische techniek volgens Warburg (2.6).

De resultaten zijn weergegeven in fig. 4.2.A t/m 4.2.E, waarin de zuurstofconsumptie die optreedt na toevoegen van de betreffende koolstofbron (op tijd $t=0$), tegen de tijd is uitgezet. Uit fig. 4.2.A blijkt dat *Pseudomonas* gekweekt met glucose als koolstofbron (Ps-glucose) alleen glucose onmiddellijk kan metaboliseren.

Fig. 4.2 A t/m E

Zuurstof-opname door PMBL-1



Zuurstof-opname
door
PMBL-1
gekweekt met:

- A. glucose
- B. atropine
- C. tropazuur
- D. fenylazijnzuur
- E. benzoëzuur

waaraan
op $t = 0$
werd
toegevoegd:
a. glucose
b. atropine
c. tropazuur
d. fenylazijnzuur
e. benzoëzuur
f. p-hydroxy-fenylazijnzuur
g. m-hydroxy-fenylazijnzuur

Voor spontane zuurstof-opname ($0,5-1,5 \mu\text{l/min}$) is gecorrigeerd; experimentele details zijn beschreven in 2.6.

Pseudomonas PMBL-1, gekweekt met atropine als koolstofbron (Ps-atropine) begint direct zuurstof op te nemen na toevoegen van atropine, tropazuur en fenylazijnzuur, maar niet na toevoegen van benzoëzuur (fig. 4.2.B). Overeenkomstig de verwachting is Ps-atropine geadapteerd aan tropazuur, maar bovendien blijkt Ps-atropine geadapteerd te zijn aan fenylazijnzuur; dit suggereert dat fenylazijnzuur en atropine door dezelfde enzymen worden afgebroken of dat fenylazijnzuur een intermediair is in de afbraak van atropine.

De zuurstofopname door Ps-tropazuur (fig. 4.2.C) bevestigt het experiment met Ps-atropine. Ook deze bacteriën blijken, behalve aan tropazuur, tevens geadapteerd te zijn aan fenylazijnzuur. De bacteriën vertonen geen of weinig metabolische activiteit direct na toevoegen van benzoëzuur, m-hydroxy- en p-hydroxy-fenylazijnzuur.

In fig. 4.2.D is de zuurstofopname door Ps-fenylazijnzuur weergegeven; de bacteriën zijn geadapteerd aan fenylazijnzuur en ook aan glucose, maar incubatie met tropazuur, m-hydroxy- en p-hydroxy-fenylazijnzuur leidt niet tot directe zuurstof-consumptie. Uit de resultaten weergegeven in fig. 4.2.E blijkt dat na groei met benzoëzuur als koolstofbron slechts deze stof en glucose onmiddellijk worden omgezet. De opname van zuurstof na toevoegen van glucose in deze en in de vorige cultuur suggereert, dat de hierbij betrokken enzymen in de cel aanwezig zijn ongeacht de aan- of afwezigheid van glucose in het medium waarin de bacteriën zijn gekweekt.

Uit deze adaptatie-studie blijkt dat het systeem, dat atropine resp. tropazuur afbreekt, slechts in Ps-atropine en in Ps-tropazuur aanwezig is. Ps-atropine en Ps-tropazuur zijn volledig aan fenylazijnzuur geadapteerd, maar tropazuur wordt niet onmiddellijk door Ps-fenylazijnzuur gemetaboliseerd. Dit suggereert dat de adaptatie van Ps-tropazuur aan fenylazijnzuur niet wordt veroorzaakt doordat tropazuur en fenylazijnzuur door dezelfde enzymen worden afgebroken, maar doordat fenylazijnzuur een intermediair is in de afbraak van atropine en tropazuur.

4.4 ONDERZOEK VAN MUTANTEN, GESTOORD IN DE AFBRAAK VAN TROPAZUUR

Naast de studie van de adaptatie van PMBL-1 is het metabolisme van tropazuur in PMBL-1 en in mutanten bestudeerd door het medium, waarin de bacteriën waren gekweekt met tropazuur als enige koolstofbron, te onderzoeken op de aanwezigheid van afbraakproducten van tropazuur.

Het medium werd hiertoe geëxtraheerd en met dunnelaagchromatografie onderzocht. Een experiment met het wilde type PMBL-1 leverde geen resultaat op; met dunnelaagchromatografie kon slechts worden aangetoond, dat tropazuur door de bacteriën werd verbruikt. Daarom werden mutanten van PMBL-1 geïsoleerd, die niet meer in staat waren tropazuur af te breken. Er werden enige tientallen mutanten

van PMBL-1 verkregen, die niet meer met atropine of tropazuur, maar nog wel met tropine, fenylazijnzuur of glucose als enige koolstofbron konden groeien. Fenotype: $\text{Atr}^- \text{Tro}^- \text{Tpn}^+ \text{Pac}^+ \text{Glu}^+$.

Het leek niet onredelijk te veronderstellen dat zich hieronder mutanten zouden bevinden, die nog wel in staat waren een gedeelte van de tropazuur-afbraak uit te voeren. Wanneer deze mutanten zouden worden gekweekt met b.v. glucose als koolstofbron in aanwezigheid van tropazuur, zou wellicht een intermediair in het medium worden uitgescheiden.

De mutanten werden gekweekt in synthetisch medium met 0,2% glucose en 0,2% tropazuur. De culturen werden gedurende drie dagen geschud bij 30° ; hierna werd het medium met dunnelaagchromatografie onderzocht. Geen van de onderzochte mutanten bleek echter afbraak-producten van tropazuur in een zodanige hoeveelheid in het medium af te scheiden, dat zij op de hierboven beschreven manier konden worden aangetoond.

4.5 MUTANTEN, GESTOORD IN HET METABOLISME VAN FENYL-AZIJNZUUR EN p-HYDROXY-FENYLAZIJNZUUR

Nadat het onderzoek van de Tro^- mutanten geen verdere informatie had opgeleverd over de afbraak van tropazuur, werd getracht mutanten te isoleren die niet meer in staat waren fenylazijnzuur af te breken. Omdat de afbraak van deze stof gecorreleerd is met de afbraak van tropazuur, zoals uit de adaptatie-studie is afgeleid, zou bestudering van *Pseudomonas*, gestoord in het metabolisme van fenylazijnzuur (Pac^-) nadere informatie kunnen verschaffen over de afbraak van tropazuur.

Daartoe werd PMBL-1 behandeld met een mutageen agens (2.5), waarna geselecteerd werd voor Pac^- mutanten en bovendien voor mutanten met een storing in het metabolisme van p-hydroxy-fenylazijnzuur (Php^-).

Op de 10.000 onderzochte kolonies werden 52 mutanten gevonden, waarvan het fenotype in tabel 4.3 is weergegeven. Uit deze tabel blijkt dat alle Pac^- mutanten

Tabel 4.3

Pac^- en Php^- mutanten van PMBL-1

Fenotype	Aantal mutanten per 10^4 kolonies
$\text{Pac}^- \text{Tro}^+$	0
$\text{Pac}^- \text{Tro}^- \text{Php}^+$	25
$\text{Pac}^- \text{Tro}^- \text{Php}^-$	4
$\text{Pac}^+ \text{Tro}^+ \text{Php}^-$	23

het vermogen hebben verloren tropazuur te metaboliseren. Een mutant met het fenotype $\text{Tro}^+ \text{Pac}^-$ is ook bij het verdere onderzoek niet gevonden. Dit wijst op een rol van fenylazijnzuur in het tropazuur-metabolisme. Deze mutanten zijn verder bestudeerd zoals beschreven is in 4.6.

De stofwisseling van p-hydroxy-fenylazijnzuur staat in een veel minder nauwe relatie tot die van tropazuur. Vanwege het voorkomen van het fenotype $\text{Tro}^+ \text{Pac}^+ \text{Php}^-$ is het onwaarschijnlijk, dat tropazuur of fenylazijnzuur via p-hydroxy-fenylazijnzuur wordt afgebroken.

4.6 ONDERZOEK VAN MUTANTEN, GESTOORD IN HET METABOLISME VAN FENYLAZIJNZUUR

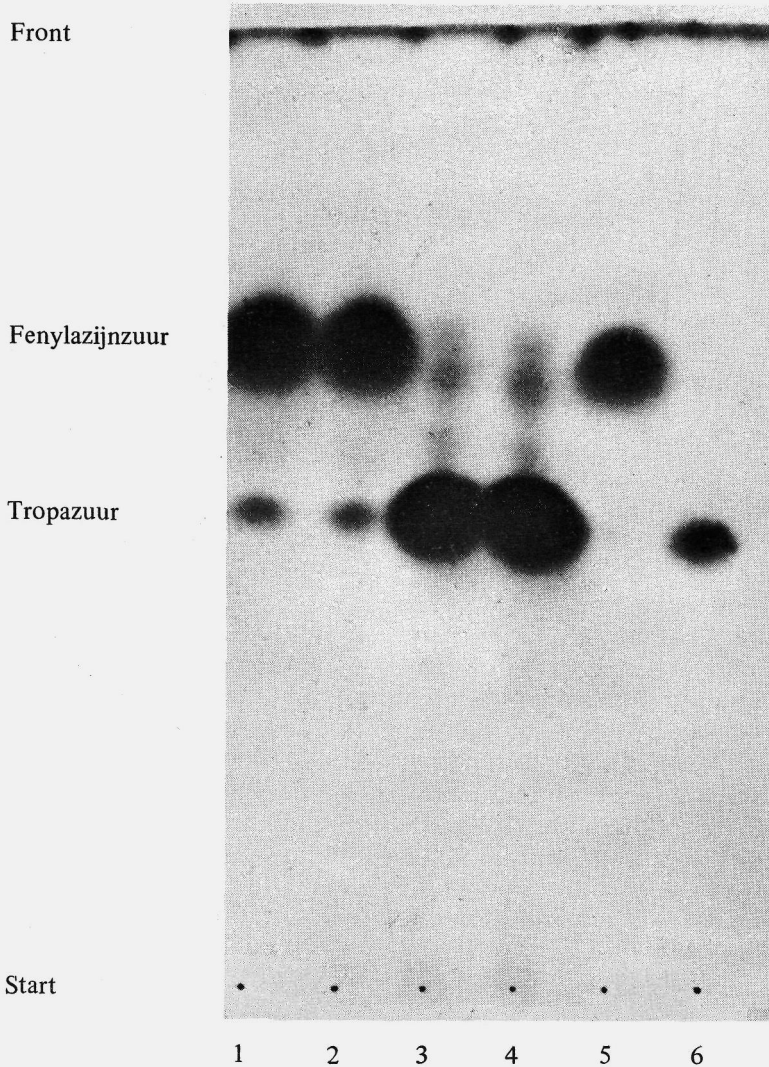
Uit het onderzoek van mutanten met een storing in het metabolisme van fenylazijnzuur is gebleken, dat elk van deze mutanten ook gestoord is in het tropazuur-metabolisme. Omdat de kans op een gedeeltelijk intacte tropazuur-stofwisseling in mutanten, geselecteerd op het fenotype Pac^- groter is dan bij mutanten geselecteerd op het fenotype Tro^- is het medium van deze Pac^- mutanten onderzocht op omzettingen producten van tropazuur.

De mutanten werden gekweekt in synthetisch medium met 0,2% tropazuur en met 0,2% glucose als koolstofbron en werden gedurende drie dagen bij 30° geschud. Hierna werden de bacteriën door centrifugeren verwijderd en de bovenstaande vloeistof aangezuurd, geëxtraheerd en gechromatografeerd (2.7). Het resultaat voor twee Pac^- mutanten (PMBL-114 en PMBL-107) is weergegeven in fig. 4.4. PMBL-114 blijkt tropazuur vrijwel volledig te hebben omgezet in een verbinding, die zich tijdens chromatografie gedraagt als fenylazijnzuur. PMBL-107 zet onder dezelfde omstandigheden slechts een klein gedeelte van het tropazuur om. De omzetting zoals in het medium van PMBL-114 is gevonden, is later in het onderzoek bij 18 andere Pac^- mutanten aangetoond.

Teneinde met zekerheid de identiteit van dit omzettingproduct vast te stellen is het experiment met PMBL-114 op grotere schaal herhaald. De mutant werd gekweekt in 6 l medium dat in totaal ongeveer 12 g tropazuur bevatte. Na de kweek werd het medium op boven vermelde wijze opgewerkt, waarbij 5 g van het omzettingproduct werd verkregen. Het product kristalliseerde uit petroleum-ether 40-60° als dunne blaadjes. De verbinding werd geïdentificeerd als fenylazijnzuur: het gedrag gedurende dunnelaagchromatografie met de loopmiddelen EMX en BEM komt overeen met dat van fenylazijnzuur, ultraviolet- en infrarood-spectrum (Davies 1951) zijn identiek aan dat van fenylazijnzuur. De elementaire analyse geeft 70,75 % koolstof en 6,01 % waterstof: in theorie verwacht men voor fenylazijnzuur resp. 70,57 % en 5,92 %. Het geïsoleerde product smelt bij 77,5°, fenylazijnzuur bij 77,0°; het mengsmeltpunt is 77,0°. Hiermee is bewezen dat tropazuur door *Pseudomonas* kan worden omgezet in fenylazijnzuur.

Fig. 4.4

Omzetting van tropazuur in fenylazijnzuur door *Pseudomonas*-mutanten



Dunnelaagchromatogram van het extract van het kweekmedium van PMBL-114 (1 en 2) en van PMBL-107 (3 en 4), gekweekt met 0,2% glucose en 0,2% tropazuur gedurende 3 dagen. Referenties fenylazijnzuur (5) en tropazuur (6). Het loopmiddel was EMX, de detectie werd uitgevoerd met $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{HNO}_3$ (1:1).

4.7 AFBRAAK VAN FENYLAZIJNZUUR

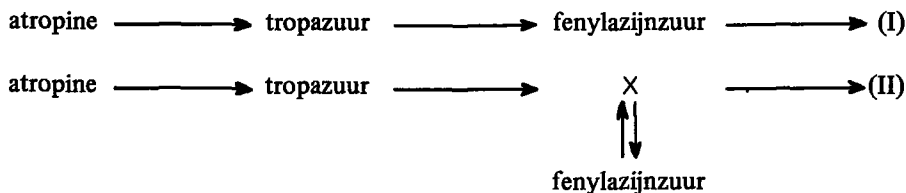
Fenylazijnzuur is een vrij algemene koolstofbron voor *Pseudomonas* (Stanier 1966); het wordt door hydroxylering en oxygenering afgebroken. Hoewel het metabolisme van fenylazijnzuur in PMBL-1 niet uitvoerig werd onderzocht, zijn wel enige aanwijzingen verkregen voor het verloop van de afbraak van deze verbinding. Bij de bestudering van de mutanten met het fenotype $\text{Tro}^- \text{Pac}^-$ bleek dat door één van deze mutanten (PMBL-112) uit tropazuur een stof werd gevormd, die na chromatografie met het loopmiddel BEM een vlek gaf met een iets grotere R_f -waarde dan tropazuur.

Met behulp van preparatieve dunnelaagchromatografie werd een zeer kleine hoeveelheid van deze stof in chromatografisch zuivere toestand verkregen. Het spectrum hiervan vertoonde de karakteristieke absorptie van o-hydroxy- of m-hydroxy-fenylazijnzuur: een maximum bij 271 nm en een schouder bij 277 nm. Op grond van het chromatografisch gedrag kon worden uitgesloten dat het de ortho-verbinding was, zodat het hoogst waarschijnlijk m-hydroxy-fenylazijnzuur betrof. Uit spectrale en chromatografische gegevens bleek dat het niet p-hydroxy-fenylazijnzuur kon zijn noch één van de andere verbindingen, die voorkomen in bijlage I.

De afbraak van fenylazijnzuur in PMBL-1 verloopt dus waarschijnlijk via hydroxylering tot m-hydroxy-fenylazijnzuur.

4.8 DISCUSSIE

Uit het feit dat *Pseudomonas* PMBL-1, gekweekt met tropazuur, geadapted is aan fenylazijnzuur en dat tropazuur door mutanten in fenylazijnzuur kan worden omgezet, blijkt een grote metabolische verwantschap tussen deze twee aromatische zuren. Toch mag uit deze gegevens niet zonder meer de conclusie worden getrokken dat fenylazijnzuur een intermediair is in de afbraak van atropine en tropazuur (schema I), omdat hiermee niet kan worden uitgesloten dat fenylazijnzuur via een reversibele reactie uit één van de eigenlijke intermediären ontstaat (schema II) (Adelberg 1953).



Bij een afbraak volgens schema II zou men ook mutanten met het fenotype $\text{Pac}^- \text{Tro}^+$ moeten kunnen vinden. Het is echter gebleken dat alle mutanten, die waren geselecteerd voor het fenotype Pac^- ook in de afbraak van tropazuur waren

gestoord. Bij de mutagene behandelingen, waarbij ongeveer 70 mutanten werden geïsoleerd met een specifieke mutatie in de stofwisseling van atropine, werden evenmin mutanten met het fenotype $\text{Pac}^- \text{Tro}^+$ gevonden. Hierom is schema II onwaarschijnlijk en is de conclusie gewettigd dat de afbraak van atropine en tropazuur verloopt via een omzetting in fenylazijnzuur.

Dit gegeven was van groot belang bij de opheldering van de stofwisselingsketen van atropine en tropazuur en bij de identificatie van de enzymen die bij deze afbraak in *Pseudomonas* zijn betrokken.

HOOFDSTUK 5

HET ATROPINE-ESTERASE

5.1 INLEIDING

De eerste aanwijzing dat in *Pseudomonas* PMBL-1 een atropine-esterase betrokken is bij de afbraak van atropine, werd door Rörsch en Berends verkregen met een extract van deze bacterie, gekweekt met atropine als koolstofbron. Het extract bleek een groot katalytisch effect te hebben op de snelheid van de hydrolyse van atropine; het katalytisch effect werd niet meer waargenomen nadat het extract was geïncubeerd met proteolytische enzymen of na een korte thermische behandeling bij 80°. Dit deed vermoeden dat de bacterie de beschikking heeft over een atropine-esterase dat in staat is de hydrolyse van de ester atropine te versnellen.

In dit hoofdstuk worden de eigenschappen van het atropine-esterase beschreven. Het enzym zal als een esterase worden gekarakteriseerd door de identificatie van tropazuur en tropine als de producten van de enzym-reactie. Uit het onderzoek van de substraat- en de stereo-specificiteit zal blijken, dat het enzym specifiek is voor (-) - atropine en enkele atropine-achtige verbindingen. Voorts wordt een methode beschreven voor de zuivering van het atropine-esterase, waarmee het enzym 500-600 maal t.o.v. het bacterie-extract kan worden gezuiverd. Het onderzoek naar de eigenschappen van het atropine-esterase is voor een groot gedeelte in samenwerking met Dr. F. Berends en Dr. R.A. Oosterbaan uitgevoerd.

5.2 DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE ACTIVITEIT VAN HET ATROPINE - ESTERASE

Bij de hydrolyse van atropine wordt tropazuur gevormd. Deze zuurproductie kan gebruikt worden als maat voor de enzym-activiteit. In de praktijk geschiedt dit door in een ongebufferd systeem de pH constant te houden door toevoegen van NaOH, waarbij men het gevormde tropazuur continu titreert in een zgn. pH-staat; met een recorder wordt het loogverbruik als functie van de tijd geregistreerd. De routine-bepaling wordt uitgevoerd bij 25° en bij pH 7,0 in een incubatiemengsel dat 0,4 mM (-) - atropine, 0,1 M KCl en 0,02% saponine bevat. Deze omstandigheden zijn optimaal voor de bepaling van de activiteit van het atropine-esterase. De keuze van de pH en van de substraat-concentratie wordt in 5.4 gemotiveerd.

Bij de activiteits-bepaling van gezuiverde AtrE-preparaten blijkt de zuurproductie vaak niet recht evenredig te zijn met de tijd, maar voortdurend af te nemen. Dit kan worden voorkomen door de bepaling uit te voeren in aanwezigheid van het natuurlijke detergens saponine. De oorzaak van het verschijnsel en van de invloed van

saponine is niet duidelijk; wellicht voorkomt saponine een hechting van het enzym aan de glaswand of de vorming van aggregaten.

5.3 DE ZUIVERING VAN HET ATROPINE-ESTERASE

Het resultaat van de procedure zoals die is beschreven in hoofdstuk 2.11, wordt weergegeven in tabel 5.1. Het enzym werd hierbij 610 maal gezuiverd ten opzichte van het extract met een rendement van 19%. Dit resultaat is representatief voor de enzymzuiveringen die op deze manier werden uitgevoerd.

Het extract werd bereid door ultrasonische behandeling van de bacteriën, gevolgd door centrifugeren. Daarna werd het grootste deel van het nucleïnezuur-materiaal met streptomycine neergeslagen in analogie met de protamine-precipitatie volgens Linn (1965). Deze precipitatie is noodzakelijk omdat anders de hierop volgende fractionering met ammoniumsulfaat wordt verstoord door nucleïnezuur.

De gefractioneerde precipitatie met ammoniumsulfaat leverde een preparaat met een specifieke activiteit (SA) van 6 U per mg eiwit; na een refractionering werd een SA van 15 bereikt.

Vervolgens werd het materiaal onderworpen aan kolom-zone-electroforese; hierbij zijn omstandigheden zoals de aard van de buffer, de pH en de veldsterkte zodanig gekozen, dat de migratie van het AtrE in de richting van de anode nagenoeg wordt gecompenseerd door de in tegengestelde richting werkende endosmose. Hierdoor blijft het enzym in een bepaalde zone van de kolom, terwijl het merendeel van de eiwitten deze zone tijdens de elektroforese verlaat. Als gevolg hiervan is het scheidend vermogen van deze zuiveringsstap groot, evenals het rendement ($\pm 90\%$). Een nadeel is de lange duur van de elektroforese.

Tabel 5.1

Zuivering van het atropine-esterase

	TA	Rendement	SA	Zuivering
Extract	27,0	100%	1,05	1 x
Na streptomycine-precipitatie	22,0	81%	—	—
Na ammoniumsulfaat-refractionering	11,0	41%	15,4	15 x
Na kolom-zone-electroforese	10,1	37%	136	130 x
Na DEAE-cellulose-chromatografie	6,7	25%	363	308 x
Na Sephadex G-100 gelfiltratie	5,1	19%	641	610 x

Enzym-activiteit en eiwit-concentratie werden bepaald volgens 2.9.2; TA in 10^3 U; SA in U/mg eiwit.

Hierna kon het enzym nog met een factor 4 worden gezuiverd door chromatografie over DEAE—cellulose en Sephadex G—100 gelfiltratie. Het enzym werd van DEAE—cellulose geëluëerd m.b.v. een zoutgradiënt. Ook deze techniek heeft een groot scheidend vermogen en een hoge opbrengst (60—70%). Na de gelfiltratie heeft het preparaat een specifieke activiteit van 500—600; preparaten met deze zuiverheid zijn gebruikt voor het onderzoek naar de eigenschappen van het atropine—esterase.

5.4 EIGENSCHAPPEN VAN HET ATROPINE—ESTERASE

5.4.1 Analyse van de producten van de enzymreactie

Bij de analyse van de producten van de enzymreactie werd aangetoond dat bij inwerking van AtrE op atropine, tropine en tropazuur werden gevormd. Hiervoor werd 0,4 mmol ($\pm$) - atropine met gezuiverd enzym gedurende 40 min in de pH—staat geïncubeerd (pH 7,0 ; 25°). De hydrolyse werd beëindigd door het enzym bij 80° te inactiveren, waarna het incubatiemengsel werd onderzocht met dunnelaag—chromatografie. Hierbij bleek dat o.i.v. het AtrE atropine gedeeltelijk was omgezet en dat twee stoffen waren gevormd, die zich chromatografisch gedroegen als tropazuur en tropine (fig. 5.2 1 en 2).

5.4.2 Stoechiometrie

Zowel voor de karakterisering van het enzym als voor een kwantitatieve bepaling van de enzym—activiteit dient te worden aangetoond, dat de hoeveelheid geproduceerd tropazuur in een stoechiometrische relatie staat tot de hoeveelheid gehydrolyseerd atropine. Deze relatie is onderzocht in experimenten, waarin een beperkte hoeveelheid (—) - atropine m.b.v. het AtrE vrijwel volledig werd gehydrolyseerd. Uit tabel 5.3 blijkt dat hierbij stoechiometrische hoeveelheden tropazuur werden gevormd. Deze werden berekend uit de zuurproductie t.g.v. de enzymatische hydrolyse; daarnaast werd het gevormde tropazuur kwantitatief bepaald m.b.v. een enzymatische omzetting, die in hoofdstuk 6 zal worden beschreven.

5.4.3 Substraat—optimum

De enzym—activiteit als functie van de concentratie van (—) - atropine vertoont niet het gebruikelijke plateau bij hoge substraat—concentraties. Bij lage substraat—concentraties neemt de activiteit toe bij een verhoging van de concentratie, maar boven een bepaalde waarde leidt verdere verhoging tot een verlaging van de enzym—activiteit (zie fig. 5.4). Het substraat—optimum ligt bij 0,2—0,4 mM (—) - atropine. Het gezuiverde AtrE versnelt ook de hydrolyse van de methyl ester van tropazuur. Bij dit substraat blijkt remming door overmaat substraat niet op te treden en wordt een verzadigings—niveau bereikt.

Fig. 5.2

Dunnelaagchromatogram van de producten van de enzymatische omzetting van atropine

Front (EMX)

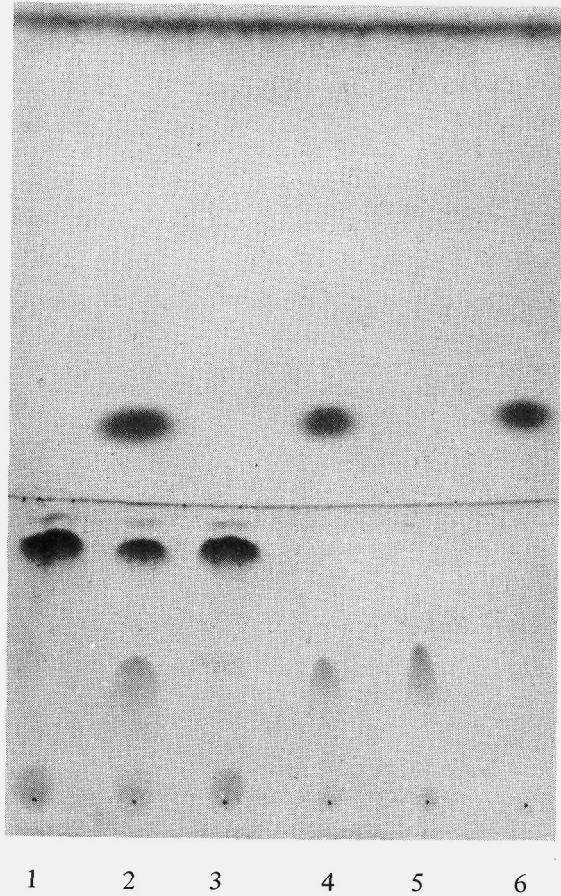
Tropazuur

Front (CD)

Atropine

Tropine

Start



Atropine werd geïncubeerd gedurende 40 min volgens 2.9.2 in aan- en afwezigheid van 10 U AtrE. Vervolgens werd het incubatie-mengsel gedurende 10 min verwarmd op 70° en met dunnelaagchromatografie onderzocht. Hierbij werd geëluëerd met EMX, gedroogd en vervolgens geëluëerd met CD. Detectie: H_2SO_4/HNO_3 .

1. (±) atropine (controle) 40 min geïncubeerd bij 25°
2. (±) atropine + AtrE 40 min geïncubeerd bij 25°
3. (-) atropine (controle) 40 min geïncubeerd bij 25°
4. (-) atropine + AtrE 40 min geïncubeerd bij 25°
5. tropine
6. tropazuur

Tabel 5.3

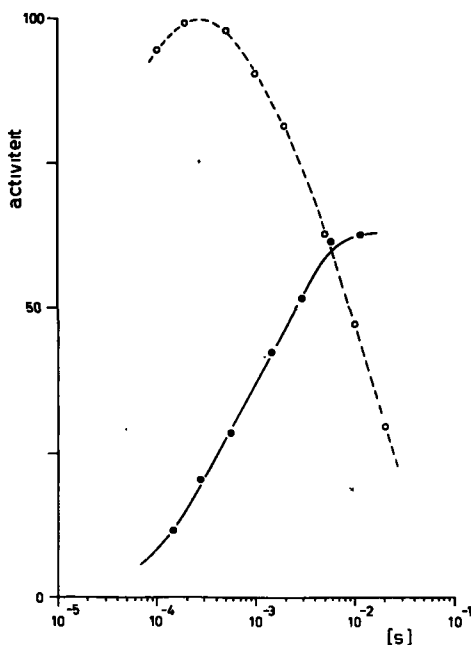
Stoichiometrie van de enzymatische hydrolyse van atropine

ATROPINE (μmol)	TROPAZUUR (μmol)	H ⁺ (μeq)
0,1	0,099	—
0,2	0,197	—
0,3	0,291	—
0,4	0,388	—
1	—	0,81
2	—	1,93
3	—	2,96
4	—	4,16

De aangegeven hoeveelheden (—) - atropine werden geïncubeerd met AtrE volgens 2.9. Na afloop van de reactie werd de gevormde hoeveelheid tropazuur bepaald volgens 6.4.1; het gevormde zuur werd titrimetrisch bepaald.

Fig. 5.4

De invloed van de substraatconcentratie op de activiteit van het AtrE



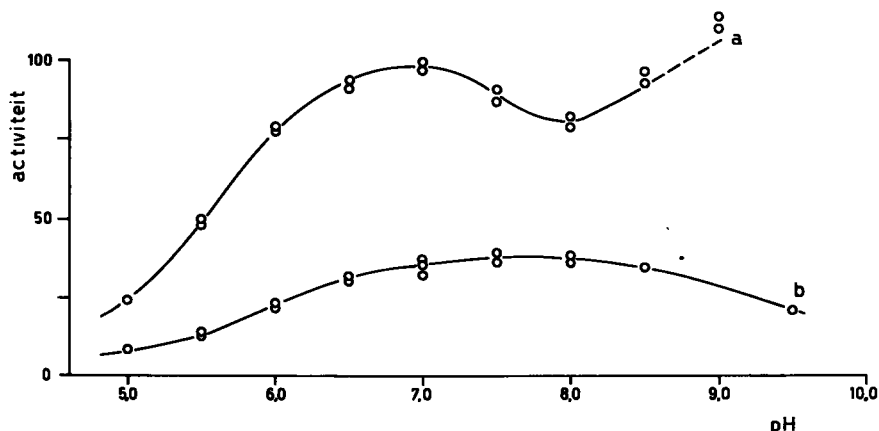
Van een constante hoeveelheid gezuiverd AtrE werd de activiteit bepaald volgens 2.9.2 met (—) - atropine (o - o) en de methyl ester van (±) - tropazuur (● - ●) als substraat. Substraatconcentratie in M. De activiteit met 0,4 mM (—) - atropine is op 100 gesteld.

5.4.4 Het pH-optimum

De activiteit van het atropine-esterase als functie van de pH wordt weergegeven in fig. 5.5. Deze afhankelijkheid is bepaald met 1 mM (–) - atropine en met 2 mM methyl ester van (±) - tropazuur als substraat. Met 1 mM (–) - atropine wordt bij pH 7,0 een optimum waargenomen en bij pH 8,0 een relatief minimum. De metingen bij pH > 9,0 zijn minder nauwkeurig omdat het tropine-residu zich boven deze pH als buffer gaat gedragen, waardoor de titrimetrische bepaling wordt verstoord. Bij gebruik van 2 mM methyl ester van (±) - tropazuur als substraat is de grafische voorstelling van de pH-afhankelijkheid een simpele klokvormige curve. Wellicht wordt het verschil in de vorm van de curven mede veroorzaakt door de invloed van de pH op de remming door overmaat substraat bij (–) - atropine.

Fig. 5.5

Invloed van de pH op de activiteit van AtrE



De afhankelijkheid van de enzymactiviteit van de pH is nagegaan door de instelling van de pH-staat te variëren (2.9.2).

Het reactiemengsel bevatte het substraat en 0,02% saponine in 0,1 M KCl.

De activiteit voor atropine bij pH 7,0 is op 100 gesteld.

a. 1 mM (–) - atropine

b. 2 mM methyl ester van (±) - tropazuur

5.4.5 De substraat-specificiteit

De substraat-specificiteit van het AtrE is onderzocht met de esters, opgenomen in tabel 5.6. Alle stoffen werden getest in een concentratie van 0,4 mM, de optimale concentratie voor (–) - atropine. De enzym-activiteit van het AtrE-preparaat, gemeten met (–) - atropine als substraat, is op 100 gesteld en de hydrolyse van de andere substraten is hierop betrokken. In de gebruikte concentratie zijn racemisch

Tabel 5.6

Substraat—specificiteit van het AtrE

pH 7,0	25°	Substraat—concentratie	0,4 mM	Relatieve Activiteit	K _m (M)
		(-) (+) (+)	ATROPINE	100 59 4	$\pm 10^{-5}$
		(+)	SCOPOLAMINE	65	
		(-) (+)	N - methyl - ATROPINE	74 48	$1,7 \cdot 10^{-5}$
			COCAINE	0	
		(+)	HOMATROPINE	163	
			R ₀ - 3 - 1158	0	
		(+)	TROPAZUUR methyl ester	18	$7 \cdot 10^{-4}$
			2 FENYLMALONZUUR - semi - ALDEHYDE methyl ester	0	
			ATROPAZUUR methyl ester	0	
		(+)	ATROLACTINEZUUR methyl ester	6,5	
			2,3 - EPOXY - 3 - FENYL PROPIONZUUR ethyl ester	0	
		(+)	AMANDELZUUR methyl ester	13	$6 \cdot 10^{-4}$
			FENYLGLYOXYLZUUR methyl ester	7	
			FENYLAZIJNZUUR methyl ester	0,5	
			3 - HYDROXY - PROPIONZUUR methyl ester	0	
			n - BOTERZUUR methyl ester	0	
			3 - CHINUCLIDINYL BENZILLAAT	0	
			ACETYLCHOLINE	1	
			α - NAFTYLACETAAT	0,5	
			p - NITROFENYLACETAAT	1	

atropine en scopolamine gelijkwaardige substraten, maar worden minder snel gehydrolyseerd dan (–) - atropine. (+) - atropine wordt slechts langzaam gehydrolyseerd. (–)-N-methyl-atropine is eveneens een goed substraat en wordt sneller gehydrolyseerd dan de racemische verbinding. Hieruit blijkt een sterke voorkeur van het enzym voor de (–) - enantiomeer. Invoering van drie methoxy-groepen in de aromatische ring van scopolamine maakt de verbinding ongeschikt als substraat. Homatropine, de ester van tropine met amandelzuur wordt 1,5 maal zo snel gehydrolyseerd als (–) - atropine.

De methyl ester van tropazuur en van amandelzuur worden ook gesplitst, zij het veel langzamer. De overige verbindingen, waaronder het tropa-alkaloïde cocaine, het acetylcholine en het atropine-analoon chinuclidinyl-benzilaaat, worden zeer langzaam of niet gesplitst.

Voor vier substraten is de Michaelis constante (K_m) vermeld. De Michaelis constante voor (–) - atropine kan met de in 2.9.2 beschreven enzymbepaling niet nauwkeurig worden berekend; vanwege de remming door overmaat substraat moet voor de bepaling van deze grootte worden gemeten bij zeer lage substraat-concentraties, die experimenteel minder goed toegankelijk zijn. De K_m -waarden voor de methyl ester van tropazuur en van amandelzuur zijn ongeveer 50 x groter dan de K_m -waarde voor (–) - atropine.

5.4.6 De stereo-specificiteit

Uit de snellere hydrolyse van (–) - atropine t.o.v. (+) - atropine (tabel 5.6) blijkt reeds, dat het AtrE een voorkeur heeft voor de (–) - isomeer. Dit blijkt ook duidelijk uit de resultaten van Berends (1969) die heeft waargenomen, dat tijdens de initiële hydrolyse van (+) - atropine o.i.v. het AtrE vrijwel uitsluitend (–) - tropazuur wordt gevormd zoals met de optische rotatie van het gevormde product kon worden aangetoond. Ook met dunnelaagchromatografie is de stereo-specificiteit van het enzym bevestigd. Hiervoor is het experiment dat onder 5.4.1 werd beschreven, uitgevoerd met (–) - atropine i.p.v. met (±) - atropine. Het substraat werd gedurende 40 min geïncubeerd met AtrE, terwijl de pH constant werd gehouden. Na deze incubatie bleek het (–) - atropine – in tegenstelling tot het (±) - atropine – volledig te zijn gehydrolyseerd (fig. 5.2 c en d).

5.4.7 Stabiliteit van het enzym

De enzym-preparaten zijn bij 4° gewoonlijk goed houdbaar. De invloed van de temperatuur op de stabiliteit werd bepaald met een preparaat dat 0,18 mg eiwit per ml bevatte en was gedialyseerd tegen HMP (pH 7,0). Het preparaat werd gedurende 30 min bij verschillende temperaturen geïncubeerd. Bij temperaturen tot 40° leidde dit niet tot verlies van enzymactiviteit; bij 45° ging ongeveer de helft van de activiteit verloren, terwijl boven 50° het enzym vrijwel volledig werd geïnactiveerd.

Met hetzelfde preparaat werd ook het effect van de pH op de stabiliteit van het

enzym bestudeerd. Het enzym werd geïncubeerd gedurende 30 min bij 25° bij verschillende pH's. Het esterase behield volledige activiteit bij pH 5 – 10, maar werd buiten dit pH-gebied geïnactiveerd.

5.4.8 Diversen

Het AtrE heeft voor de katalytische activiteit geen co-factor nodig; de activiteit wordt niet gestimuleerd door het toevoegen van metaalionen en wordt niet geremd door 1 mM EDTA. Het esterase wordt niet geremd door 1 mM tropazuur of fenylazijnzuur. Tropine is een competitieve remmer met een K_i van 0,8 mM (Berends 1969), maar heeft geen effect in concentraties die tijdens de titratie worden gevormd.

5.5 DISCUSSIE

De beschreven bepaling van de activiteit van het atropine-esterase is eenvoudig, betrouwbaar en recht evenredig met de hoeveelheid toegevoegd enzym (fig. 2.2). Dit gegeven in combinatie met de stabiliteit van het enzym en de mogelijkheid het AtrE met een goede opbrengst te zuiveren, bestempelt het enzym als een enzymologisch goed hanteerbaar object.

De remming door overmaat substraat, die voor (–) - atropine gevonden wordt en het normale substraat-verzadigingspatroon voor de methyl ester van tropazuur suggereren, dat het positief geladen tropine-residu de remming veroorzaakt. Remming door overmaat substraat is ook bekend voor het acetylcholine-esterase, waarbij het verschijnsel uitvoerig is onderzocht. Dit wordt verklaard door aan te nemen dat het enzym een 'anionic site' bezit die van belang is voor het aanhechten van het positief geladen substraatmolecuul. Tijdens de enzymreactie wordt de acylgroep van de ester overgedragen op het enzym, waarbij het intermediaire acyl-enzym wordt gevormd. Bij hoge substraat-concentraties wordt aan de 'anionic site' van dit acyl-enzym een tweede substraatmolecuul gebonden, waardoor de de-acylering van het acyl-enzym en dus de enzymatische hydrolyse wordt geremd (Krupka 1963). Wellicht komt ook de remming door overmaat substraat bij het AtrE tot stand door interactie met een 'anionic site'. Voor een uitgewerkte discussie over dit verschijnsel en over de merkwaardige pH-afhankelijkheid van het enzym wordt verwezen naar Berends e.a. (1967).

In tegenstelling tot het atropine-esterase uit konijneserum (zie hoofdstuk 1) is het enzym uit *Pseudomonas* beslist niet een esterase met een breed werkingspectrum. Bij het onderzoek naar de substraat-specificiteit van het AtrE is gebleken dat atropine en sterk op atropine gelijkende esters, zoals N-methyl-atropine, scopoline en homatropine goede substraten zijn voor het enzym. Homatropine wordt zelfs sneller gehydrolyseerd dan (–) - atropine. Men kan zich afvragen of het hier bestudeerde enzym niet beter met homatropine-esterase zou kunnen worden aangeduid. Het enzym staat echter in een veel nauwere relatie tot het metabolisme van atropine dan tot dat van homatropine, omdat amandelzuur – de zuurrest in homa-

tropine — niet door PMBL—1 kan worden gemetaboliseerd (hoofdstuk 3) en omdat homatropine de tropazuur—enzymen vrijwel niet induceert (hoofdstuk 10). Naarmate de verbindingen sterker in structuur afwijken van atropine vermindert de snelheid waarmee zij door het enzym worden gehydrolyseerd. De waargenomen voorkeur voor de (—) - enantiomeer van atropine benadrukt de specificiteit van het atropine—esterase.

Terwille van de volledigheid worden hier in zeer beknopte vorm een aantal gegevens genoemd uit het onderzoek van het atropine—esterase door Dr. R.A. Oosterbaan en Dr. F. Berends.

Het AtrE wordt geremd door organofosfaten zoals DFP (diisopropyl fosforofluoridaat) en Soman (pinacolyl methyl fosfonofluoridaat). Voor de remming met ^{32}P —Soman is aangetoond dat deze berust op de specifieke reactie met één serine—residu in het enzym („de actieve serine”). De aminozuur—volgorde rond de actieve serine blijkt —histidyl—seryl—methionyl—glycyl— te zijn.

De activiteit per katalytisch centrum bedraagt 30.000 moleculen (—) - atropine per minuut. Voor het moleculair gewicht is uit de aminozuur—samenstelling en de sedimentatie—constante een waarde van ca. 30.000 berekend. (Uit het elutie—volume bij gelfiltratie over Sephadex G—100 (zie 2.11.3) werd het moleculair gewicht geschat op 39.000).

Voor het vrijwel zuiver enzym blijkt zowel de bepaling volgens Lowry als de A_{280} (zie 2.9.1) een aanzienlijk hoger eiwitgehalte aan te geven dan uit de aminozuur—analyse volgt. Voor de bepaling van de specifieke activiteit werd het eiwitgehalte altijd met één van de eerste twee methoden gemeten; dit leidde tot een SA van 500—600 voor de meest—gezuiverde preparaten. Wordt echter voor de berekening van de SA het werkelijk eiwitgehalte gebruikt, dat gebaseerd is op de aminozuur—samenstelling dan komt men voor deze preparaten op een waarde van 900—1000. Uit de activiteit per katalytisch centrum en het moleculair gewicht kan men berekenen dat de specifieke activiteit van een volledig gezuiverd preparaat ongeveer 1000 moet bedragen. Hiermee in overeenstemming is dat preparaten met een SA 600, waarin het eiwitgehalte werd bepaald volgens Lowry, praktisch homogeen zijn op grond van sedimentatie—analyse en polyacrylamide—gel elektroforese.

Door immunisatie van een konijn met gezuiverd AtrE is een antiserum tegen het AtrE bereid, waarmee enzymatisch niet—actief AtrE uit *Pseudomonas*—mutanten kan worden herkend.

Voor het onderzoek naar de geschiktheid van het atropine—esterase als beperkt model voor de atropine—receptor, zoals in de inleiding van dit proefschrift is gesteld, zou het enzym specifiek voor atropine moeten zijn. Aan deze voorwaarde is voldaan (tabel 5.6). Bovendien blijken verschillende stoffen met een atropine—achtige werking in vivo het AtrE te remmen. Zo kon worden aangetoond dat het chinuclidinyl—benzillaat een reversibele competitieve remmer is met een $K_i = 3 \times 10^{-6} \text{ M}$; dit duidt op een grote affiniteit van het enzym voor de remmer.

Samenvattend blijkt het AtrE uit PMBL-1 te voldoen aan de in de inleiding gestelde voorwaarden. De enzymologische eigenschappen, de gegevens betreffende de remming door organofosfaten en de specificiteit van de inductie (hoofdstuk 10) karakteriseren het atropine-esterase als een specifiek serine-esterase, dat bij de afbraak van atropine in *Pseudomonas* PMBL-1 is betrokken.

HOOFDSTUK 6

HET TROPАЗUURDEHYDROGENASE

6.1 INLEIDING

De identificatie van fenylazijnzuur als omzettingsproduct heeft een gericht onderzoek naar de hierbij betrokken enzymen mogelijk gemaakt. De omzetting van tropazuur in fenylazijnzuur zou namelijk tot stand kunnen komen door oxydatie en decarboxylering, waarbij de hydroxy-methylgroep in de alifatische zijketen van tropazuur in drie stappen wordt geëlimineerd (zie bijlage I). Derhalve werd onderzocht of een extract van *Pseudomonas PMBL-1*, gekweekt met tropazuur, enzymen bevatte die een decarboxylering of een dehydrogenering van tropazuur teweeg konden brengen. In oriënterende experimenten werden aanwijzingen voor een enzymatische decarboxylering niet gevonden; wel echter voor de aanwezigheid van een tropazuur-dehydrogenase. Het extract bleek nl. een omzetting van de waterstofacceptor NAD^+ in NADH te veroorzaken, indien tropazuur aan het reactiemengsel werd toegevoegd. Dit effect bleef achterwege indien het extract tevoren was verhit, of was behandeld met een proteolytisch enzym (subtilisine of pronase), wat er op duidde dat de verantwoordelijke component een eiwit was. De katalytische activiteit was afwezig in een extract bereid van *PMBL-1* die gekweekt was met fenylazijnzuur, tropine of glucose als koolstofbron, hetgeen er op wees dat het een induceerbaar enzym betrof.

Het onderzoek van de enzymatische dehydrogenering van tropazuur en het daarbij betrokken „tropazuur-dehydrogenase” (TDH) wordt in dit hoofdstuk beschreven. Nadat de omstandigheden waren vastgesteld waarbij de enzymactiviteit reproduceerbaar en kwantitatief kon worden bepaald (6.2) kon een zuiveringsprocedure worden uitgewerkt, waarmee het TDH gedeeltelijk (38 x) kon worden gezuiverd (6.3). Met het gezuiverde enzym werden de stoechiometrie van de dehydrogenering van tropazuur, de substraat-specificiteit en enkele andere eigenschappen van het TDH onderzocht (6.4).

Bij een vergelijking van de pH-afhankelijkheid van een niet-gezuiverd en een gezuiverd TDH-preparaat — die bij pH 9,5 evenveel enzymactiviteit vertoonden — bleek, dat bij neutrale pH o.i.v. het gezuiverde preparaat minder NADH geproduceerd werd dan o.i.v. het niet-gezuiverde preparaat. Bovendien verliep de reactie o.i.v. het gezuiverde enzym volgens een afwijkende (bi-fasische) kinetiek, waarbij in het begin een *snelle NADH-productie* werd waargenomen, die na korte tijd overging in een *langzame productie* van NADH . Dit verschijnsel is nader onderzocht (6.5). De kinetiek kan worden verklaard door aan te nemen, dat de NAD^+ — afhankelijke dehydrogenering van tropazuur een reversibel proces is en dat bij de gebruikte hoeveelheid enzym het evenwicht snel wordt ingesteld.

De snelle NADH-productie zou overeenkomen met de hoeveelheid NADH, die gevormd wordt bij de instelling van het evenwicht:



De hieropvolgende langzame NADH-productie zou dan corresponderen met een verschuiving van het evenwicht t.g.v. decarboxylering van het gevormde pma.

Deze evenwichtstheorie kon worden bevestigd door bestudering van het effect van tropazuur, NAD^+ , H^+ , pma en NADH op de evenwichtsinstelling en door het aantonen van de enzymatische NADH-afhankelijke hydrogenering van pma, de zgn. terugreactie.

De experimenten waarin pma werd toegevoegd, bleken echter kwantitatief niet in overeenstemming met de experimenten waarin werd uitgegaan van tropazuur en NAD^+ . Dit vormde de aanleiding tot een uitvoerige bestudering van de terugreactie (6.6).

De hydrogenering van pma verloopt ook volgens een bi-fasische kinetiek. Déze kinetiek blijkt te worden veroorzaakt doordat het toegevoegde pma grotendeels de enol-vorm bezit, terwijl door het TDH slechts de keto-vorm van 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (keto-pma) kan worden gehydrogeneerd. Derhalve wordt in het begin van de hydrogenering slechts dat gedeelte van pma omgezet, dat als keto-pma aanwezig is; hierna wordt de hydrogenering bepaald door de snelheid van de tautomere omlegging van enol-pma in keto-pma.

Ter bevestiging van de veronderstelling dat de decarboxylering van pma de langzame NADH-productie na instelling van het evenwicht bepaalt, is uit deze langzame NADH-productie de snelheids-constante berekend die voor een eventuele decarboxylering zou moeten gelden (6.7). Deze waarde is vergeleken met de experimenteel bepaalde snelheids-constanten voor de spontane ontleding van enol-pma, resp. keto-pma. Hieruit bleek dat de snelheid van de ontleding van enol-pma te traag verloopt om verantwoordelijk te kunnen zijn voor de langzame NADH-productie; daarentegen verloopt de decarboxylering van keto-pma met de snelheid, die hiervoor uit de langzame NADH-productie kan worden berekend.

Het effect van de keto-enol-tautomerie op de instelling van het evenwicht wordt besproken in 6.8. Voor het evenwicht kan de evenwichts-constante K_{eq} worden berekend:

$$K_{\text{eq}} = \frac{[\text{pma}] [\text{NADH}] [\text{H}^+]}{[\text{tropazuur}] [\text{NAD}^+]}$$

Deze blijkt zeer laag te zijn, nl. $\pm 0,3 \times 10^{-12}$ M. Uit experimenten waarin enol-pma wordt toegevoegd, zal blijken dat hierbij een afwijkende waarde voor K_{eq} wordt gevonden, die zal worden toegeschreven aan de ongeschiktheid van enol-pma als substraat voor de enzymatische hydrogenering.

6.2 DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN HET TROPАЗUURDEHYDROGENASE

Bij een groot aantal dehydrogenases wordt de waterstof, die aan het substraat wordt onttrokken, door het enzym overgedragen op de cofactor nicotinamide-adenine-dinucleotide (NAD^+). Dit is ook bij het tropazuur-dehydrogenase het geval. Bij de werking van dit enzym worden geoxydeerd tropazuur – het 2-fenyl-malonzuur-semi-aldehyde –, de gereduceerde cofactor NADH en een proton als producten gevormd (fig. 6.1).

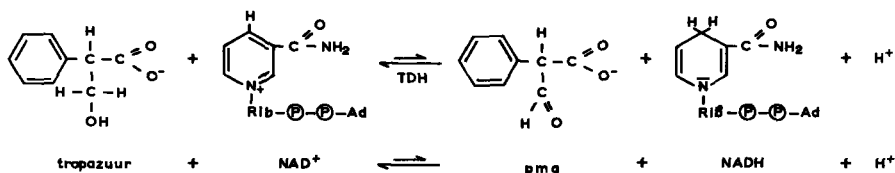


Fig. 6.1

Het ultraviolet spectrum van NADH verschilt van het spectrum van NAD^+ : NADH heeft een absorptie-maximum bij 340 nm, terwijl NAD^+ bij deze golflengte geen absorptie vertoont (Ciotti, 1957). Doordat tropazuur, pma en fenylaceetaldehyde bij deze golflengte niet absorberen, kan de absorptie-toename bij 340 nm worden gebruikt als een maat voor de NADH-produktie. Uit de molaire absorptie-coëfficiënt van NADH bij 340 nm is berekend, dat in een reactievolume van 3 ml (zie 2.9.3) een absorptie-stijging van 2,07 overeenkomt met de vorming van 1 μmol NADH. Deze spectrofotometrische methode is gebruikt, zowel bij het onderzoek van de eigenschappen van het TDH als bij de kwantitatieve bepaling van de TDH-activiteit.

De standaard-bepaling van de TDH-activiteit werd uitgevoerd met 10 mM tropazuur, 0,8 mM NAD^+ en 250 mM hydrazine in 33 mM K-carbonaatbuffer pH 9,5. Tropazuur en NAD^+ zijn in overmaat aanwezig. Het enzym vertoont geen substraat-remming bij deze tropazuur-concentratie. De keuze van de gebruikte pH wordt in 6.4 gemotiveerd.

Hydrazine wordt toegevoegd om het gevormde pma weg te nemen en op deze wijze remming van de enzymatische omzetting te voorkomen (zie 6.5 en 7.2). Bovendien reageert hydrazine met fenylaceetaldehyde, dat kan ontstaan door spontane decarboxylering van pma; hierdoor wordt voorkomen dat de activiteits-bepaling van TDH wordt verstoord door de enzymatische dehydrogenering van fenylaceetaldehyde o.i.v. het NAD^+ –afhankelijke fenylaceetaldehyde-dehydrogenase, dat ook in het extract voorkomt (8.1).

Onder de gestandaardiseerde condities is de enzym-activiteit recht evenredig met de hoeveelheid toegevoegd enzym (fig. 2.2).

6.3 GEDEELTELIJKE ZUIVERING VAN HET TDH

Het TDH werd volgens de methode die in 2.11.2 is beschreven, gedeeltelijk gezuiverd (38 x t.o.v. het uitgangsmateriaal met een rendement van 18%). Van de verschillende zuiveringsstappen is in tabel 6.2 een overzicht gegeven.

Voor het enzymologisch onderzoek werden TDH-preparaten gebruikt met een specifieke activiteit van ± 20 . In deze preparaten kon met de methode volgens 2.9.3 geen 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase en fenylaceetaldehyde-dehydrogenase worden aangetoond. De preparaten waren wel verontreinigd met AtrE, waarmee bij de interpretatie van de substraat-specificiteit rekening moet worden gehouden.

Bij de gelfiltratie over Sephadex G-100 gedroeg het TDH zich als een eiwit met een molecuulgewicht van 46.000 (2.11.3). Tijdens iso-electrische electroforese, werd een iso-electrisch punt van 5,2 gevonden in een pH-gradiënt van LKB „Ampholytes”.

Tabel 6.2
Gedeeltelijke zuivering van het TDH uit PMBL-1

Preparaat	TA	Rendement	SA	Zuiverings-factor
Extract	4,6	100%	0,56	1 x
Na Ammoniumsulfaatprecipitatie	2,2	48%	5,2	9 x
Na Sephadex G-100 gelfiltratie	1,58	34%	8,3	15 x
Na DEAE-cellulose chromatografie	0,82	18%	21,4	38 x

De enzym-activiteit en de eiwit-concentratie zijn bepaald volgens 2.9. TA in 10^3 U; SA in U/mg eiwit.

6.4 EIGENSCHAPPEN VAN HET GEZUIVERD ENZYM

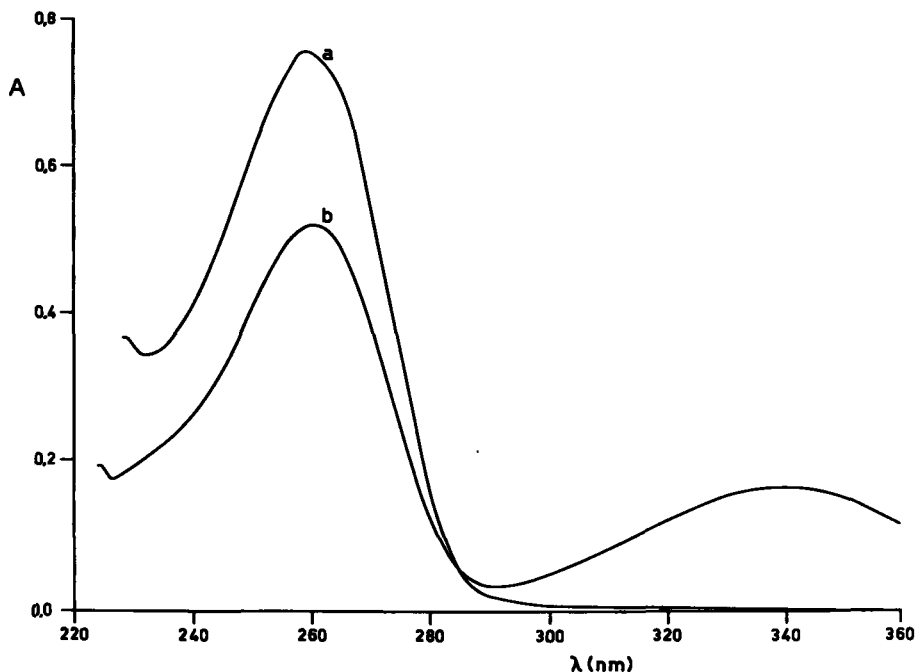
6.4.1 De analyse van de reactie-producten en stoichiometrie van de reactie

Bij de NAD^+ -afhankelijke enzymatische dehydrogenering van tropazuur verwacht men als reactie-producten pma, NADH en H^+ . De vorming van NADH tijdens de dehydrogenering blijkt uit de verandering van het spectrum tijdens de incubatie van tropazuur, NAD^+ en TDH (fig. 6.3). [Het effect van toegevoegd NADH op de dehydrogenering o.i.v. TDH (6.5) en de geschiktheid van het reactie-product om als waterstofdonor te fungeren voor LDH (7.2) zijn additionele argumenten voor de identiteit van de gevormde verbinding, die bij 340 nm absorbeert].

De hoeveelheid NADH, die tijdens de dehydrogenering wordt gevormd, staat in een stoichiometrische relatie tot de hoeveelheid omgezet tropazuur. Dit werd aange-

Fig. 6.3

Spectrale aanwijzingen voor de vorming van NADH
bij de enzymatische dehydrogenering van tropazuur.



Het incubatie-mengsel bevatte 1 mM tropazuur, 0,05 mM NAD^+ en TDH in 3 ml 33 mM K-carbonaat pH 9,5; de absorptie werd gemeten tegen het incubatie-mengsel zonder NAD^+ .
curve a : niet geïncubeerd;
curve b : na 10 min incubatie bij 25°

toond door een beperkte hoeveelheid tropazuur te incuberen met 1 U TDH en een overmaat NAD^+ (1,6 mM). Om een volledige omzetting te verkrijgen, werd de reactie bij pH 10,0 uitgevoerd; bij deze pH nam de absorptie zeer snel toe en bereikte in 1–2 min een eindwaarde. Hieruit kon de hoeveelheid gevormd NADH worden berekend. Deze bleek overeen te komen met de toegevoegde hoeveelheid tropazuur. Uitgaande van 0,06 resp. 0,12 en 0,24 μmol tropazuur werd bij deze omzetting 0,06 resp. 0,11 en 0,23 μmol NADH gevormd. Hiermee is een stoechiometrische relatie aangetoond. In aanwezigheid van hydrazine, dat bij de standaard activiteitsbepaling wordt toegevoegd, kan ook bij lagere pH een volledige omzetting worden verkregen. Ook onder deze omstandigheden is de stoechiometrie van de reactie aangetoond. Met 1 U TDH, een overmaat NAD^+ (1,6 mM) en 0,12 M hydrazine in 33 mM K-fosfaat buffer pH 8,5 werd uit 0,10, 0,20 en 0,30 μmol tropazuur resp. 0,10, 0,20 en 0,29 μmol NADH geproduceerd.

Vanwege de instabiliteit van het pma is de identificatie van het omzettingsproduct van tropazuur uitgevoerd in combinatie met de analyse van het product van het decarboxylase, dat in het volgende hoofdstuk zal worden besproken (7.2). Hierbij is de omzetting van tropazuur in fenylacetaldehyde en koolzuur door de gezamenlijke werking van het TDH en het decarboxylase aangetoond.

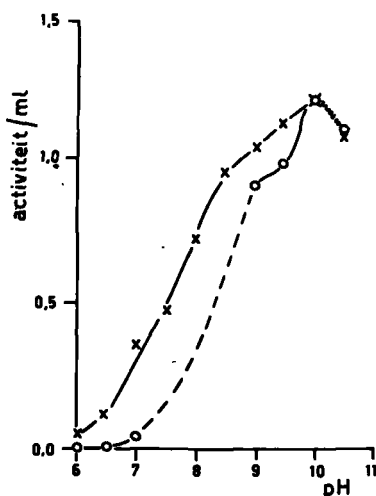
6.4.2 Invloed van de pH op de enzymatische dehydrogenering

Bij de enzymatische omzetting van tropazuur door gezuiverd TDH werd in neutraal milieu een bi-fasische kinetiek waargenomen (6.1), die een berekening van de enzym-activiteit onmogelijk maakte. Wel kon worden vastgesteld dat de NADH-productie per tijdseenheid bij pH 6-7 zeer gering en bij pH 10 maximaal was (zie fig. 6.4).

Met een niet-gezuiverd TDH-preparaat werd in neutraal milieu de bi-fasische kinetiek niet waargenomen. Bovendien was van dit preparaat, dat bij pH 10 dezelfde activiteit bezat als het gezuiverde TDH-preparaat, de activiteit bij pH 6-7 veel hoger. De productie van NADH was evenals die van het gezuiverde preparaat maximaal bij pH 10 (fig. 6.4).

Fig. 6.4

pH-afhankelijkheid van de enzymatische dehydrogenering



Het reactiemengsel bestond uit 10 mM tropazuur, 0,8 mM NAD⁺ in 33 mM K-fosfaatbuffer (pH 6,5 - 8,5) of in 33 mM K-carbonaatbuffer (pH 8,5 - 10,5). De enzym-activiteit bij pH 8,5 was in beide buffers vrijwel gelijk.

niet-gezuiverd TDH-preparaat: x - x - x;

gezuiverd TDH-preparaat : o - o - o.

Op de ordinaat is uitgezet de absorptie-stijging per min per ml enzym-preparaat.

Bij $\text{pH} \geq 10$ was een nauwkeurige bepaling van de NADH-productie niet mogelijk. Bij deze hoge pH-waarden gaf fenylaceetaldehyde, dat door decarboxylering uit pma wordt gevormd, aanleiding tot een aanzienlijke α -specifieke absorptie-toename. Omdat het TDH bij deze pH bovendien langzaam wordt geïnactiveerd, is voor de standaard-bepaling van het TDH aan pH 9,5 de voorkeur gegeven. Het verschil in de reactie-kinetiek van de dehydrogenering o.i.v. een gezuiverd en een niet-gezuiverd preparaat wordt in 6.5 uitvoeriger behandeld.

6.4.3 Specificiteit van het tropazuur-dehydrogenase

Substraat-specificiteit

Van een aantal aromatische alcoholen en hydroxycarbonzuren is nagegaan of deze verbindingen in aanwezigheid van TDH worden gedehydrogeneerd onder omstandigheden, waarbij het enzym een groot katalytisch effect heeft op de dehydrogenering van tropazuur. Behalve tropazuur werd echter geen van de verbindingen in tabel 6.5.1 (groep I) gedehydrogeneerd. Het is daarom niet waarschijnlijk dat het TDH in de bacterie een functie heeft bij de afbraak van één van deze verbindingen.

Het enzym is evenmin betrokken bij de omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur, zoals blijkt uit de ongeschiktheid van fenylaceetaldehyde als substraat. Een aantal alifatische alcoholen en hydroxycarbonzuren (tabel 6.5.1, groep IV) zijn onderzocht, omdat het TDH wellicht bij de omzetting van één van deze verbindingen zou kunnen zijn betrokken. Daarvoor zijn echter geen aanwijzingen gevonden.

Blijkbaar is het TDH specifiek voor het substraat tropazuur, zodat de conclusie gewettigd lijkt, dat het hier niet een α -specifiek dehydrogenase betreft, maar dat in PMBL-1 een enzym aanwezig is dat specifiek bij de afbraak van tropazuur is betrokken.

Geschiktheid van verschillende stoffen als waterstof-acceptor

De geschiktheid van nicotinamide-adenine-dinucleotide-fosfaat (NADP^+), kaliumferricyanide en dichloorfenol-indofenol-natrium (DCIP) als waterstof-acceptor voor het TDH is onderzocht.

Het NADP^+ , waarvan de gereduceerde vorm dezelfde spectrale eigenschappen heeft als gereduceerd NAD^+ , kan niet i.p.v. NAD^+ als waterstof-acceptor worden gebruikt. Onder omstandigheden zoals beschreven in 2.9.3 gaf NADP^+ slechts 1,1% van de absorptietoename, die met NAD^+ werd waargenomen.

De verbindingen kaliumferricyanide en DCIP zijn evenmin geschikt als waterstof-acceptor bij een incubatie met een gezuiverd enzympreparaat. Met een niet-gezuiverd preparaat in aanwezigheid van NAD^+ werden kaliumferricyanide en DCIP wel gereduceerd, hetgeen kon worden afgeleid uit de verandering van het absorptiespectrum van het reactiemengsel bij 410 resp. 600 nm. De reductie kon echter volledig worden toegeschreven aan een „diaphorase-systeem”, omdat zonder NAD^+ de reactie niet werd waargenomen.

Substraat-specificiteit van het TDH en PDH

Tabel 6.5.1 Tabel 6.5.2

Substraat	TDH	PDH
I		
tropazuur (2-fenyl-3-hydroxy-propionzuur)	100	—
atrolactinezuur (2-fenyl-2-hydroxy-propionzuur)	0,1	0,1
3-fenylmelkzuur (3-fenyl-2-hydroxy-propionzuur)	0,7	0,6
amandelzuur (2-hydroxy-fenylazijnzuur)	0,1	0,1
2-fenylpropanol-1	0,1	0,2
3-fenylpropenol-1	0,1	0,1
2-fenylethanol	0,1	0,1
benzylalcohol	0,1	0,1
II.		
fenylaceetaldehyde	0,1	100
methylester van pma	0,1	0,1
2-fenylpropanal	—	0,5
3-fenylpropenal	0,1	0,1
fenylglyoxaalhydraat	0,1	0,1
benzaldehyde	—	0,1
o-nitrobenzaldehyde	—	0,1
o-chloorbenzaldehyde	—	0,1
m-hydroxybenzaldehyde	—	0,1
p-nitrobenzaldehyde	—	0,1
p-dimethylaminobenzaldehyde	—	0,1
p-hydroxy-m-methoxybenzaldehyde	—	0,1
III.		
2-fenylacrylzuur	0,8	0,1
fenylpyrodruivenzuur	0,2	0,2
fenylglyoxylzuur	0,1	0,1
IV.		
3-hydroxypropionzuur	0,1	0,1
melkzuur	0,1	0,2
appelzuur	0,1	0,1
wijnsteenzuur	0,1	0,1
citroenzuur	0,1	0,4
isocitroenzuur	0,1	0,1
n-decylalcohol	0,1	0,1
n-heptylalcohol	0,1	0,1
n-propanol	0,1	0,1
V.		
aceetaldehyde	0,1	0,1
formaldehyde	0,1	0,1
pyrodruivenzuur-aldehyde	0,1	0,6

Tabel 6.5.1 Substraat-specificiteit van het TDH

De substraten werden als een 10% oplossing in water of aceton toegevoegd tot een eindconcentratie van 3 mM. Voor optisch actieve stoffen werd het racemische mengsel gebruikt. De TDH-bepaling werd uitgevoerd volgens 2.9.3, maar in afwezigheid van hydrazine. De enzymactiviteit met tropazuur als substraat is op 100 gesteld.

Tabel 6.5.2 Substraat-specificiteit van PDH

Deze tabel zal worden besproken in hoofdstuk 8. De substraatconcentratie was 3 mM. De PDH-activiteit werd gemeten volgens 2.9.3; de enzymactiviteit met fenylaceetaldehyde als substraat is op 100 gesteld. Benzaldehyde, derivaten hiervan en 2-fenylpropanal zijn onderzocht bij pH 8,0 en vergeleken met fenylaceetaldehyde als substraat bij deze pH.

6.4.4 De stabiliteit van het TDH

De stabiliteit van het TDH bij verschillende temperaturen is onderzocht met een gezuiverd TDH-preparaat in HMP (0,18 mg eiwit/ml). Het enzym werd gedurende 10 min bij verschillende temperaturen geïncubeerd. Hierbij bleek dat het TDH boven 55° volledig werd geïnactiveerd; na incubatie bij 46° bleef nog 20% van de activiteit behouden; bij 40° werd het enzym niet geïnactiveerd. Toevoegen van 0,1 M KCl noch van 1 mM van het substraat of de co-factor had effect op de hitte-inactivering. Bij kamertemperatuur is het enzym stabiel gedurende enkele dagen.

De invloed van de pH op de stabiliteit van het TDH is bepaald met hetzelfde preparaat bij 25°. Het enzym was stabiel gedurende 20 min bij pH 7–9 en werd bij pH 6 en bij pH 10 in 20 min voor 20% resp. 30% geïnactiveerd. In 0,1 M K-carbonaat pH 11 verloor het enzym vrijwel momentaan de activiteit. Deze inactivering verliep echter veel langzamer in 10 mM tropazuur of 0,8 mM NAD⁺. In aanwezigheid van beide stoffen werd bij pH 11 een duidelijke NADH-productie waargenomen, die voortdurend minder werd. Blijkbaar wordt het enzym door het substraat en door NAD⁺ gedeeltelijk beschermd tegen inactivering.

6.4.5 Enkele andere eigenschappen van het TDH

De enzymatische dehydrogenering in K-fosfaat buffer pH 9,5 wordt geremd door NADH. De aard van deze remming werd onderzocht in een aantal experimenten waarin de NAD⁺-concentratie werd gevarieerd van 0,2 – 1,1 mM bij enkele vaste NADH-concentraties (0, 0,1, 0,2 en 0,3 mM). Uit de gemeten initiële reactiesnelheden kon volgens de methode van Lineweaver en Burk (1934) worden afgeleid, dat NADH competitief remt t.o.v. NAD⁺. Voor de remmings-constante werd $6,1 \times 10^{-5}$ M gevonden. Het effect van NADH op de dehydrogenering bij neutrale pH zal in 6.5 uitvoeriger worden behandeld.

Fenylacetaldehyde en fenylazijnzuur, die tijdens de afbraak van tropazuur ontstaan, bleken in een concentratie van 1 mM geen invloed te hebben op de activiteit van het TDH. De structureel aan tropazuur verwante stoffen: 2-fenylpropionzuur, 2-hydroxy-fenylazijnzuur en fenylglyoxylzuur vertoonden evenmin een remmende werking in dezelfde concentratie.

De dehydrogenering van tropazuur is vermoedelijk niet gekoppeld aan een fosforylering. Adenosine-difosfaat, adenosine-trifosfaat (0,1 mM) of anorganisch fosfaat (1mM) beïnvloeden de enzym-activiteit niet in een fosfaatvrij incubatiemengsel.

In een concentratie van 1 mM hadden Mg⁺⁺ -, Ca⁺⁺ - en Mn⁺⁺ -ionen evenmin als 1 mM EDTA invloed op de TDH-activiteit. De reagentia op SH-verbindingen p-chloormercuribenzoëzuur, Hg⁺⁺ - en Cu⁺⁺ -ionen bleken na een preïncubatie van 5 min van het enzym met 0,01 mM van deze reagentia de activiteit voor 80–100% te remmen. Met Na-arseniet en joodazijnzuur (1 mM) werd echter geen remming gevonden.

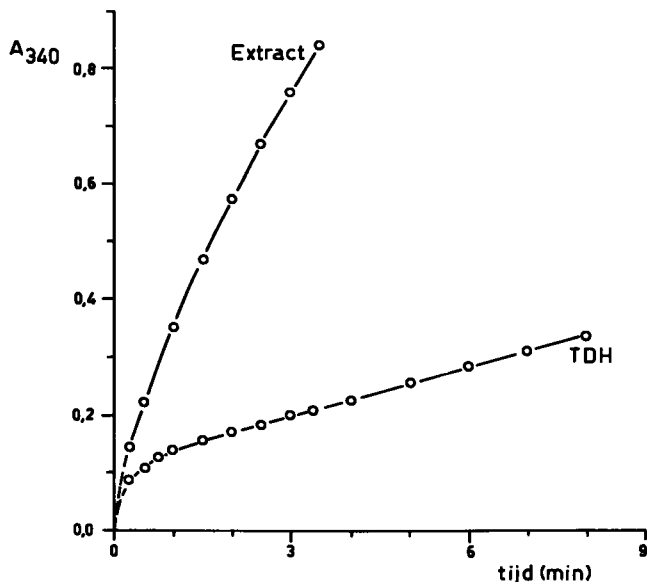
6.5 De enzymatische dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu

Bij de bestudering van de pH-afhankelijkheid van gezuiverde TDH-preparaten kwam aan het licht, dat bij de dehydrogenering in neutraal milieu o.i.v. gezuiverd TDH relatief weinig NADH werd geproduceerd en dat de NADH-productie bovendien een ander verloop had dan werd waargenomen met het niet-gezuiverde enzym.

Het verschil in de dehydrogenering van tropazuur bij pH 8,0 o.i.v. een niet-gezuiverd TDH-preparaat en een gezuiverd TDH-preparaat is weergegeven in fig. 6.6. Hierbij werden preparaten gebruikt met dezelfde activiteit bij pH 9,5. O.i.v. het niet-gezuiverde enzym nam de absorptie continu toe. Bij de dehydrogenering met het gezuiverde enzym echter werd in het begin in een snelle reactie een kleine hoeveelheid NADH gevormd, waarna de NADH-productie abrupt minder werd en overging in een langzame fase. Aangezien met het niet-gezuiverde preparaat dit verschijnsel niet werd waargenomen, leek het niet waarschijnlijk dat de beperkte NADH-productie o.i.v. het gezuiverde enzym werd veroorzaakt door een beperkende factor in het incubatie-mengsel.

Het was echter vreemd dat het enzym-preparaat evenmin een beperkende factor bevatte; een 10-voudige hoeveelheid TDH bleek slechts weinig effect te hebben

Fig. 6.6
Enzymatische dehydrogenering van tropazuur bij pH 8,0



Enzymatische dehydrogenering van tropazuur o.i.v. een celvrij extract („extract”) en een gezuiverd TDH-preparaat („TDH”), beide 1,3 U/ml. De incubatie werd uitgevoerd met 12 mM tropazuur, 2,0 mM NAD⁺ en TDH in 2,5 ml 33 mM K-fosfaat pH 8,0.

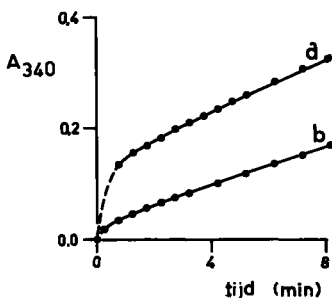
op het verloop van de NADH-productie; met deze grote hoeveelheid enzym verliep de initiële absorptie-toename sneller, maar de absorptie waarbij de afbuiging plaats had en de langzame NADH-productie daarna werden hierdoor niet beïnvloed.

Met een NAD^+ -preparaat van andere herkomst (Boehringer, Mannheim) werden dezelfde verschijnselen waargenomen. Het toevoegen van EDTA, metaal-ionen, andere co-factoren of SH-beschermende stoffen had evenmin effect op deze kinetiek.

Omdat het niet zonder meer mogelijk bleek een verklaring te geven voor het verloop van de enzymatische dehydrogenering bij neutrale pH o.i.v. het gezuiverde enzym, is de invloed van een aantal factoren op deze reactie nader onderzocht. Hierbij bleek dat toevoegen van een kleine hoeveelheid NADH een duidelijk remmend effect had (fig. 6.7). Dit duidde op remming door een van de reactie-producten; het reactie-verloop van de dehydrogenering kon hiermee echter niet volledig worden verklaard.

Fig. 6.7

Dehydrogenering van tropazuur o.i.v. gezuiverd TDH. Effect van NADH.



curve a : 20 mM tropazuur, 0,83 mM NAD^+ en TDH werd geïncubeerd in 3 ml 33 mM K-fosfaatbuffer pH 8,0.

curve b : idem, nu in aanwezigheid van 0,06 mM NADH; voor de absorptie hiervan is gecorrigeerd.

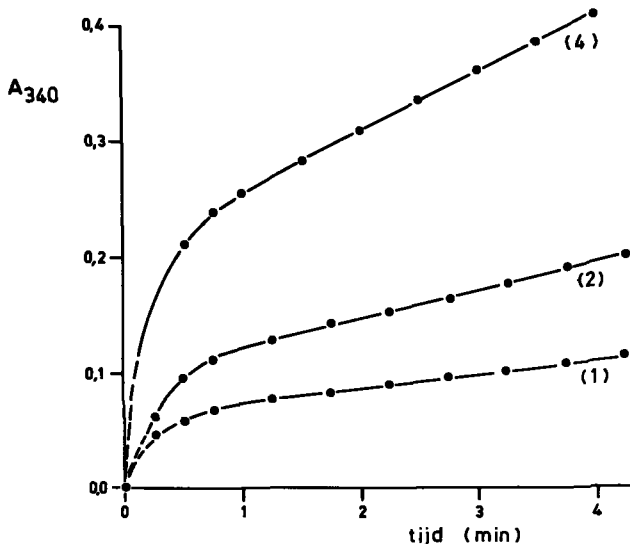
Meer aanwijzingen voor de achtergronden van de enzymatische dehydrogenering in neutraal milieu werden verkregen door bestudering van het effect van de tropazuur- en NAD^+ -concentratie op de kinetiek van de reactie.

Hierbij bleek dat zowel de hoeveelheid NADH die in de initiële fase werd gevormd als de daaropvolgende langzame NADH-productie groter werden bij verhoging van de tropazuur- en NAD^+ -concentratie. Dit effect wordt duidelijk geïllustreerd door de resultaten van een experiment, waarin de tropazuur- én de NAD^+ -concentratie werden verdubbeld resp. verviervoudigd (fig. 6.8). Bij een tweemaal zo grote concentratie tropazuur en NAD^+ was de absorptie, waarbij de afbuiging optrad ook ongeveer tweemaal zo hoog. Evenzo werd bij een viervoudige

hoeveelheid tropazuur en NAD^+ een afbuiging bij een viermaal zo grote absorptie waargenomen. Ook de langzame NADH -productie na de afbuiging bleek zich in dit experiment te verhouden als 1 : 2 : 4.

Fig. 6.8

Effect van de tropazuur- en de NAD^+ -concentratie



Verschillende hoeveelheden tropazuur en NAD^+ werden geïncubeerd met TDH in 3 ml 33 mM K-fosfaat pH 7,5.

(1) 10 mM tropazuur, 0,83 mM NAD^+ ; (2) 20 mM tropazuur, 1,67 mM NAD^+ ; (4) 40 mM tropazuur 3,33 mM NAD^+ . Afbuiging (berekend door extrapoleren van de initiële fase en de langzame fase) bij 0,063 resp. 0,106 en 0,219. Absorptietoename per min na de afbuiging: 0,012 resp. 0,026 en 0,052.

Deze directe relatie tussen de concentratie van de reagerende stoffen en de kinetiek van de dehydrogenering alsmede het grote effect van NADH (fig. 6.7) en het geringe effect van de enzym-concentratie hebben geleid tot de veronderstelling, dat de reactie die ten grondslag ligt aan de enzymatische dehydrogenering van tropazuur reversibel is en dat TDH in feite de instelling van een evenwicht katalyseert:



De initiële absorptie-toename zou dan overeenkomen met de hoeveelheid NADH , die bij de instelling van het evenwicht wordt geproduceerd. Deze toename zou dan worden bepaald door de concentratie van de reagerende stoffen en door de evenwichts-constante K_{eq} .

$$K_{eq} = \frac{[pma] [NADH] [H^+]}{[tropazuur][NAD^+]}$$

Uit de reactie—vergelijking en de formule van de evenwichts—constante volgt direct dat een verdubbeling resp. verviervoudiging van zowel de tropazuur— als de NAD^+ —concentratie een verdubbeling resp. verviervoudiging van de $NADH$ —concentratie bij evenwicht ten gevolge zal hebben.

De langzame $NADH$ —productie, die na instelling van het evenwicht wordt waargenomen zou kunnen worden toegeschreven aan een spontane eerste orde decarboxylering van pma, waardoor dit voortdurend aan het evenwicht wordt onttrokken. Dit is in overeenstemming met de waarneming dat pma in waterig milieu ontleedt (Struchov 1953; 3.4).

Indien deze ontleding verloopt als een reactie van de eerste orde zal de snelheid van de langzame $NADH$ —productie rechtevenredig zijn met de pma—concentratie, die bij de instelling van het evenwicht wordt bereikt, zodat deze snelheden zich zullen verhouden als 1 : 2 : 4, zoals experimenteel is gevonden (fig. 6.8).

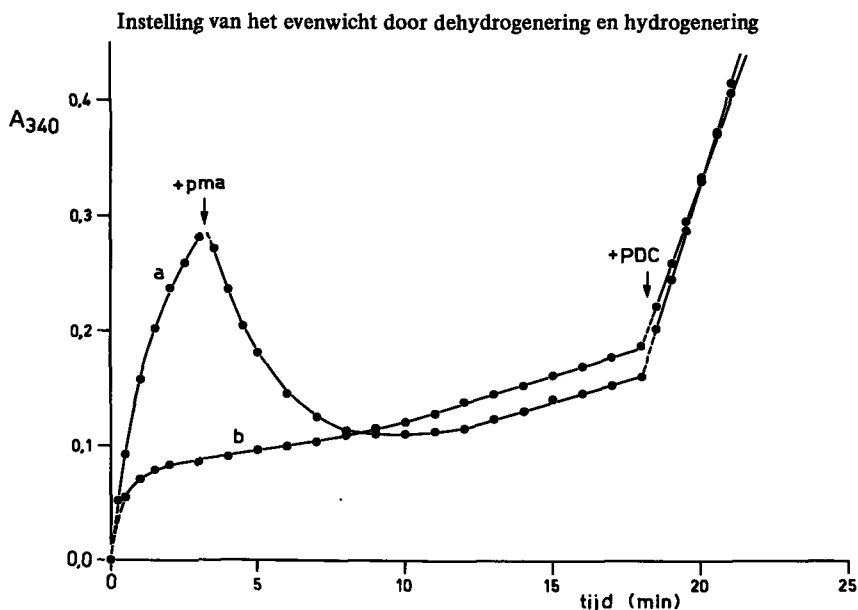
Deze theorie is bevestigd door bestudering van het effect van pma op het verloop van de enzymatische *dehydrogenering van tropazuur* en door het aantonen van de z.g. terugreactie, de $NADH$ —afhankelijke *hydrogenering van pma* o.i.v. het TDH.

In een experiment waarin pma werd toegevoegd tijdens de *dehydrogenering van tropazuur* (fig. 6.9 curve a) bleek dat hierdoor niet alleen de verdere *dehydrogenering* werd geremd, maar dat er zelfs een daling van de absorptie optrad. Na enige tijd werd een minimum—waarde bereikt waarna de absorptie weer langzaam toenam. Wanneer dezelfde hoeveelheid pma bij de aanvang van het experiment werd toegevoegd, werd een snelle absorptie—stijging waargenomen, gevolgd door een periode waarin de absorptie vrijwel constant bleef; na enige tijd nam ook hier de absorptie weer toe.

Uit de waargenomen absorptie—daling in curve a van fig. 6.9 blijkt dat de reactie een reversibel proces is, omdat door toevoegen van pma de *hydrogenering van NAD^+* wordt omgezet in een *dehydrogenering van $NADH$* . Dit is in overeenstemming met de veronderstelde evenwichts—reactie. Blijkbaar heeft het toevoegen van pma tot gevolg dat een andere evenwichts—instelling wordt nagestreefd dan voor het toevoegen van deze stof; hiervoor is het nodig een gedeelte van het $NADH$ en pma om te zetten in NAD^+ en tropazuur. De absorptie—stijging die na enige tijd optreedt, kan worden toegeschreven aan een verschuiving van het evenwicht t.g.v. de ontleding van pma.

In een tweede experiment waarbij het pma op tijd $t = 0$ werd toegevoegd (fig. 6.9 curve b) werd een snelle evenwichts—instelling waargenomen. Opvallend is dat hierbij ongeveer dezelfde $NADH$ —concentratie werd bereikt als bij de instelling van het evenwicht na het toevoegen van pma in het vorige experiment. Het feit dat in dit systeem zowel via de omzetting van NAD^+ in $NADH$ als via de omzetting van $NADH$ in NAD^+ dezelfde situatie kan worden bereikt, vormt een sterke steun voor de evenwichts—hypothese.

Fig. 6.9



Aan NAD^+ (3,33 mM), tropazuur (50 mM) en TDH (0,8 U) in 3 ml 33 mM K-fosfaat pH 7,5 werd pma, opgelost in ether, toegevoegd (eindconcentratie 1 mM) op tijd $t = 3$ min 15 sec (curve a) en op $t = 0$ (curve b). Het effect van PDC wordt in hoofdstuk 7 besproken.

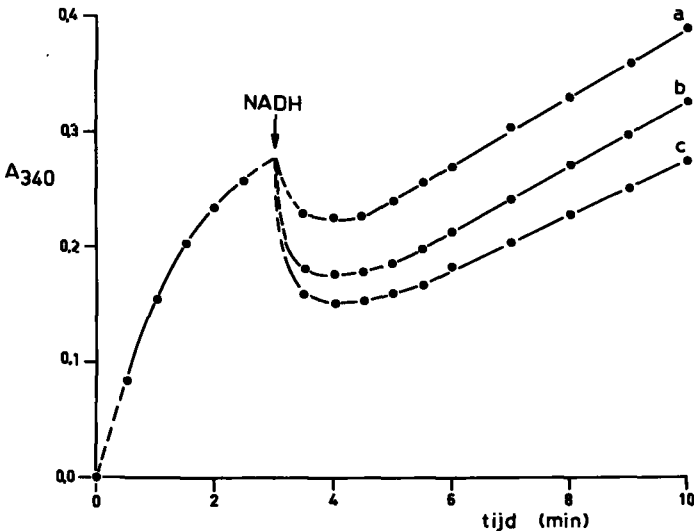
Een verdere bevestiging werd verkregen door een analoog experiment uit te voeren, waarin tijdens de enzymatische dehydrogenering van tropazuur NADH werd toegevoegd. De resultaten zijn weergegeven in fig. 6.10, waarin de A_{340} , gecorrigeerd voor de absorptie van het toegevoegde NADH, is uitgezet tegen de tijd. Ook hier werd een absorptie-daling waargenomen, die des te groter was naarmate meer NADH werd toegevoegd.

De stijging van de absorptie na instelling van het evenwicht was des te groter naarmate minder NADH werd toegevoegd. Ook dit is in overeenstemming met de theorie; naarmate minder NADH wordt toegevoegd zal in de evenwichts-situatie een grotere pma-concentratie aanwezig zijn. De NADH-productie die optreedt na het instellen van het evenwicht, wordt bepaald door de hoeveelheid pma die per tijdseenheid ontleedt; deze zal des te groter zijn naarmate de pma-concentratie hoger is.

De terugreactie kon ook rechtstreeks worden aangetoond door uit te gaan van NADH en pma. Tijdens de incubatie van een mengsel van NADH en pma met TDH werd een daling van de absorptie waargenomen (zie fig. 6.11.a). Hierbij werd het NADH, dat in ondermaat aanwezig was, vrijwel volledig omgezet in NAD^+ . Deze omzetting wordt alleen met pma waargenomen. Het diethylacetaal van pma, fenyl-

Fig. 6.10

Effect van NADH op de instelling van het evenwicht



Tropazuur (50 mM), NAD^+ (33 mM) en TDH werden geïncubeerd in K-fosfaat pH 7,5 (33 mM); na 3 min werd NADH toegevoegd: a) 0,25 μmol b) 0,37 μmol c) 0,50 μmol . Voor de absorptie van het toegevoegde NADH werd gecorrigeerd.

glyoxylzuur, 2-fenylpropanal, fenylacetaldehyde en fenylpyrodruivenzuur vertonen deze terugreactie niet.

Dat tropazuur bij deze reactie uit pma wordt gevormd, is als volgt aangetoond: 5 mg pma werd gedurende 60 min geïncubeerd bij 25° met 4 U TDH en 18 mg NADH in 10 ml 0,1 MK-fosfaat buffer pH 7,5, waarna het reactiemengsel met dunnelaagchromatografie werd onderzocht. Tijdens de incubatie was een stof ontstaan met dezelfde R_f -waarde als tropazuur bij chromatografie met de loopmiddelen EMX en BEM (2.7). Door het aantonen van tropazuur als reactie-product is de terugreactie en daarmee de veronderstelling dat de enzymatische dehydrogenering een evenwichtsreactie is, definitief bevestigd.

Uit de resultaten van enkele van de hiervoor besproken experimenten kan een schatting worden gemaakt van de grootte van de evenwichts-constante K_{eq} . Uit experiment 2, weergegeven in fig. 6.8, werd dit als volgt berekend. De NADH-concentratie „bij evenwicht” werd berekend uit het afbuigingspunt van de curve. Deze bedraagt 0,017 mM; de pma-concentratie werd hieraan gelijkgesteld.

Uit deze waarde en uit de concentratie van tropazuur en NAD^+ en de pH bij het

begin van de dehydrogenering kan de evenwichts—constante worden berekend.

$$K_{eq} = \frac{[pma][NADH]}{[tropazuur][NAD^+]} \times [H^+] = \frac{0,017 \times 0,017}{20 \times 1,67} \times 0,32 \times 10^{-7} = 0,28 \times 10^{-12} \text{ M}$$

Bij deze berekening is verondersteld dat de tropazuur— en NAD^+ —concentratie en de pH tijdens de reactie niet veranderen en is de hoeveelheid pma, die was ontleed voordat het afbuigingspunt werd bereikt, verwaarloosd. Ook voor de experimenten 1 en 4 uit fig. 6.8 is op deze wijze de K_{eq} berekend. Hierbij wordt resp. $0,38$ en $0,30 \times 10^{-12}$ M gevonden.

De zeer lage waarde van de K_{eq} verklaart het sterke effect van een relatief geringe hoeveelheid NADH op de enzymatische dehydrogenering en de waarneming dat bij de terugreactie een ondermaat NADH vrijwel volledig werd omgezet in NAD^+ .

Uit de evenwichts—vergelijking volgt dat de pH een belangrijke invloed zal hebben op de ligging van het evenwicht. In overeenstemming hiermee werd waargenomen dat verhoging van de pH in het gebied van pH 7,5–9,0 een vergelijkbaar effect had op het verloop van de reactie als een verhoging van de tropazuur— of NAD^+ —concentratie. Naarmate de pH hoger was, trad de afbuiging bij een steeds hogere absorptie op en was de NADH—productie na instelling van het evenwicht groter.

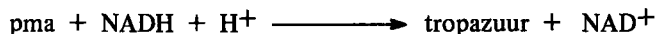
Ook uit het experiment, waarin pma werd toegevoegd bij de aanvang van incubatie van tropazuur en NAD^+ met TDH (fig. 6.9 curve b) kon de K_{eq} worden berekend; hiervoor werd een waarde van $2,5 \times 10^{-12}$ M gevonden, d.i. ca 8 maal zo groot als de evenwichts—constante berekend uit bovenstaande experimenten. Ook in een ander opzicht week dit experiment af; na het instellen van het evenwicht werd een aanzienlijk tragere NADH—productie waargenomen dan op grond van de pma—concentratie werd verwacht.

Dit verschil is aanleiding geweest om de terugreactie uitvoeriger te bestuderen. Dit onderzoek wordt in paragraaf 6.6 besproken.

Het verschil van de kinetiek die werd waargenomen met het gezuiverde, resp. het niet—gezuiverde preparaat kan eveneens worden verklaard met de evenwichts—theorie indien men aanneemt dat het niet—gezuiverde extract een component bevat, die de decarboxylering van pma versnelt; in dat geval wordt de evenwichts—instelling niet bereikt, doordat het pma voortdurend aan het reactie—mengsel wordt onttrokken, waardoor een aflopende reactie wordt verkregen. Deze component zou tijdens de zuivering van het TDH worden gescheiden zodat met gezuiverd TDH de evenwichts—instelling wel wordt waargenomen. In hoofdstuk 7 wordt hier nader op ingegaan.

6.6 HET EFFECT VAN DE KETO-ENOL TAUTOMERIE OP DE ENZYMATISCHE HYDROGENERING VAN PMA.

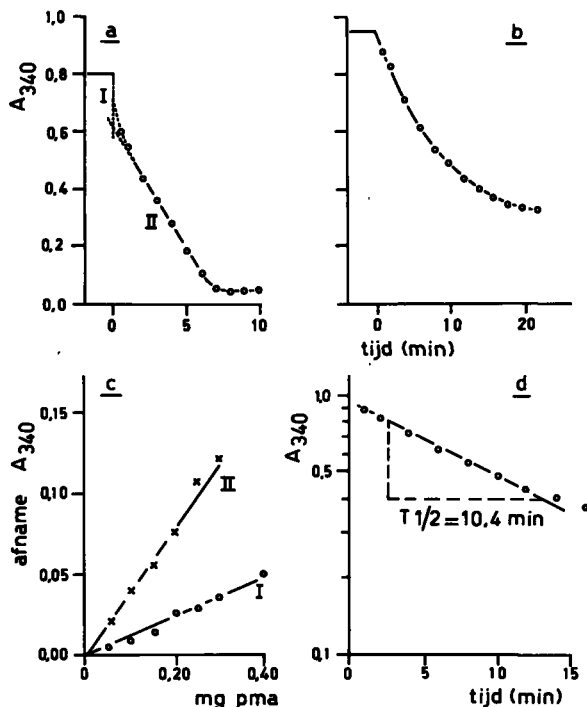
De afname van de absorptie die werd waargenomen tijdens de incubatie van pma, NADH en TDH, is toegeschreven aan de enzymatische hydrogenering van pma, de zg. terugreactie:



Bij een nader onderzoek van de enzymatische hydrogenering viel het op dat deze reactie verliep volgens een bifasische kinetiek (fig. 6.11.a).

Fig. 6.11

Effect van de pma-concentratie op de kinetiek van de terug-reactie



Alle experimenten werden uitgevoerd bij pH 7,5. In een totaal volume van 3 ml werden gemengd: 0,8 U TDH, 0,4 – 0,5 μmol NADH en een oplossing van pma in ether bij 0°.

a) 33 mM K-fosfaat; 0,25 mg (1,5 μmol) pma;

b) 0,2 M tris-HCl; 0,06 mg (0,35 μmol) pma;

c) 33 mM K-fosfaat; verschillende concentraties pma, opgegeven in mg/3 ml.

d) als b), echter semi-logaritmisch uitgezet.

In a) werd de reactie gestart door toevoegen van TDH, in b) en c) door toevoegen van pma.

In de beginfase trad een snelle daling van de absorptie op (fase I), die daarna in een minder snelle fase overging (fase II). Dit bifasisch verloop werd niet beïnvloed door het toevoegen van meer enzym of door het verhogen van de NADH-concentratie, maar was wel gevoelig voor veranderingen in de toegevoegde hoeveelheid pma.

Effect van de pma-concentratie

De invloed van de pma-concentratie kon worden aangetoond in enkele experimenten, waarin aan NADH en TDH in fosfaat-buffer verschillende hoeveelheden pma werden toegevoegd. Zowel de totale absorptie-daling gedurende fase I (berekend uit het verschil tussen de beginwaarde van de A_{340} en de waarde, verkregen door extrapolatie van fase II naar tijd $t = 0$) als de absorptiedaling per minuut in fase II bleek recht evenredig te zijn met de pma-concentratie (fig. 6.11.c). De hoeveelheid NADH die in fase I werd geoxydeerd, was slechts een klein gedeelte van de hoeveelheid pma die was toegevoegd. Zo werd na toevoegen van $1,2 \mu\text{mol}$ pma ($0,2 \text{ mg}$) slechts $0,012 \mu\text{mol}$ NADH in fase I geoxydeerd. Omdat er toch een recht evenredig verband werd gevonden tussen de pma-concentratie en de absorptie-afname in fase I, rees het vermoeden dat óf een omzettingproduct van pma óf een verontreiniging in het pma-preparaat verantwoordelijk was voor de absorptiedaling in de eerste fase van de hydrogenering.

Effect van preïncubatie

Aanwijzingen voor een spontane omzetting van pma in een verbinding, die voor de initiële absorptiedaling verantwoordelijk zou kunnen zijn, werden verkregen door pma voorafgaande aan de enzymatische hydrogenering gedurende 2 minuten in waterig milieu te incuberen. Hierna werd TDH toegevoegd en de NADH-afname geregistreerd. In een controle-experiment werd TDH vrijwel gelijktijdig met het pma toegevoegd (fig. 6.13.a).

Door deze preïncubatie van pma bleek de hoeveelheid materiaal, die in fase I werd gehydrogeneerd, te zijn toegenomen. Blijkbaar verloopt de omzetting van pma in „fase-I-materiaal” onder deze omstandigheden spontaan. Daarom leek de veronderstelling gerechtvaardigd dat pma in de vorm waarin het werd toegevoegd, niet geschikt was als substraat voor de hydrogenering, maar dat hieruit eerst een andere stof moest worden gevormd. De absorptie-daling in fase I zou dan corresponderen met de hydrogenering van de hoeveelheid van deze stof die initieel aanwezig is, terwijl de absorptie-daling in fase II zou worden bepaald door de snelheid, waarmee pma in deze stof wordt omgezet.

Zoals in hoofdstuk 3 is beschreven werd bij de chemische synthese van pma de enol-vorm verkregen. In etherische oplossing is de stof ook in deze vorm aanwezig (2.13); in alcoholische oplossing werd een omlegging in de keto-vorm waargenomen (3.4).

Bij de zojuist beschreven experimenten werd een oplossing van pma in ether gebruikt; de verbinding werd dus in de enol-vorm toegevoegd, maar zou in het waterig milieu misschien kunnen overgaan in de keto-vorm. Het lag daarom voor de hand te veronderstellen, dat het effect van preïncubatie van pma op het verloop van

de hydrogenering werd veroorzaakt door omzetting van enol-pma in keto-pma en dat keto-pma het werkelijke substraat zou zijn voor het TDH. In fase I zou dan het keto-pma, dat in het begin van de reactie aanwezig is, snel worden gehydrogeneerd, terwijl de hydrogenering in fase II zou worden bepaald door de snelheid, waarmee enol-pma in de tautomere keto-vorm wordt omgelegd.

In hoofdstuk 3 is aangetoond, dat enol-pma in waterig milieu wordt omgezet; hierbij werd het omzettingsproduct niet geïdentificeerd. Wel kon worden aangetoond dat deze omzetting in 0,2 M tris - HCl pH 7,5 verloopt volgens een reactie van de eerste orde met een snelheidsconstante van $0,073 \text{ min}^{-1}$ (halveringstijd 9,5 min). Indien deze omzetting de snelheid van de enzymatische hydrogenering in fase II bepaalt, zou de hydrogenering van pma onder deze omstandigheden moeten verlopen volgens een reactie van de eerste orde met dezelfde snelheidsconstante.

Omzetting van een kleine hoeveelheid pma

Een beperkte hoeveelheid pma ($0,35 \mu\text{mol}$) werd enzymatisch gehydrogeneerd in 0,2 M tris - HCl pH 7,5. Vanwege de geringe hoeveelheid pma werd - zoals blijkt uit figuur 6.11.b - fase I niet meer waargenomen en werd het NADH-verbruik tijdens fase II voortdurend minder. Door de logaritme van de A_{340} tegen de tijd uit te zetten (fig. 6.11.d) kon worden afgeleid, dat de hydrogenering verloopt volgens een reactie van de eerste orde met een reactiesnelheidsconstante van $0,067 \text{ min}^{-1}$ (halveringstijd 10,4 min). De goede overeenkomst van deze waarde met die voor de spontane omzetting van enol-pma onder vergelijkbare omstandigheden suggereert, dat de hydrogenering van pma in fase II bepaald wordt door snelheid, waarmee de enol-vorm in waterig milieu wordt omgezet.

Omzetting in ethanol bij 0°

Omdat enol-pma in ethanol bij 0° langzaam wordt omgezet in de tautomere keto-vorm, was het mogelijk de veronderstelling, dat keto-pma werkelijk het substraat voor de terugreactie is, te verifiëren.

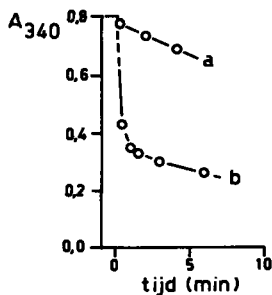
Inderdaad is gebleken dat oplossing van enol-pma in ethanol na 4 uur bij 0° een aanzienlijke hoeveelheid materiaal bevat, die volgens fase I wordt gehydrogeneerd (fig. 6.12). In dit experiment werd $0,3 \mu\text{mol}$ pma opgelost in ethanol bij 0° en onmiddellijk na het oplossen onderzocht (curve a); de hydrogenering van dezelfde hoeveelheid van deze oplossing na 4 uur bij 0° is weergegeven in curve b. Uit de overeenkomst van de vorming van keto-pma in ethanol bij 0°, zoals met infra-rood-spectroscopie is aangetoond, met de vorming van het materiaal dat in fase I wordt omgezet, mag worden geconcludeerd, dat TDH specifiek is voor keto-pma en dat de hoeveelheid keto-pma die in het begin van de reactie aanwezig is, verantwoordelijk is voor de absorptiedaling in fase I.

Uit de gelijkenis van de kinetiek van de hydrogenering in dit experiment met de kinetiek na preïncubatie van pma in waterig milieu mag worden afgeleid, dat enol-pma in waterig milieu in keto-pma wordt omgezet. Uit de overeenkomst van de snelheid, waarmee enol-pma in waterig milieu wordt omgezet - zoals is bepaald m.b.v. de ferrichloride-methode - met de snelheid waarmee de hydrogenering in

fase II verloopt, mag worden geconcludeerd dat de snelheid in fase II bepaald wordt door de tautomere-omlegging.

Fig. 6.12

Verschuiving van het keto-enol evenwicht in alcohol bij 0°



Het pma ($0,3 \mu\text{mol}$) werd toegevoegd aan $0,4 \mu\text{mol}$ NADH en $1,6 \text{ U}$ TDH in 33 mM K-fosfaat pH 7,5. a) pma opgelost in alcohol bij 0° en direct gemeten. b) pma opgelost in alcohol bij 0° en na 4 uur gemeten.

Ter completering van de bewijsvoering voor deze verklaring van de absorptiedaling in fase I en fase II is deze kinetiek op de volgende wijze nader onderzocht.
Preïncubatie bij pH 5,5

Het effect van preïncubatie is onderzocht door enol-pma gedurende 20 sec te incuberen bij pH 5,5 en vervolgens door toevoegen van NADH en TDH de kinetiek van de hydrogenering te bepalen. Als controle is het effect van preïncubatie gedurende 20 sec bij pH 7,5 nagegaan.

Dit experiment, weergegeven in fig. 6.13.b., toont dat de hoeveelheid keto-pma t.g.v. de preïncubatie bij pH 5,5 toeneemt. Dit suggereert dat ook voor deze omlegging de H^+ -katalyse geldt, die in het algemeen voor tautomere omleggingen wordt gevonden.

Bufferconcentratie

Bij verhoging van de bufferconcentratie werden zowel de absorptie-daling in fase I als de snelheid van de absorptie-afname in fase II groter. In 1 M K-fosfaat buffer pH 7,5 verliep de hydrogenering zelfs uitsluitend volgens fase I (fig. 6.13.c). Blijkbaar verloopt de tautomere omlegging van enol-pma in 1 M buffer zo snel, dat deze reactie niet langer snelheidsbepalend is bij de enzymatische hydrogenering en dat deze hydrogenering uitsluitend volgens fase I verloopt.

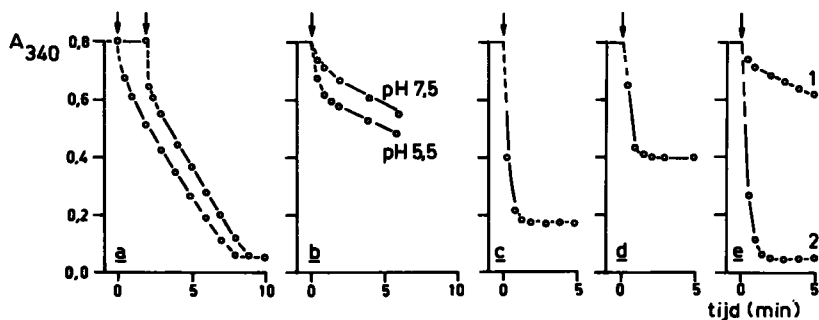
Tevens blijkt uit dit experiment dat bij de hydrogenering in 1 M buffer een stoichiometrische hoeveelheid NADH wordt geoxydeerd (toegevoegd $0,30 \mu\text{mol}$ pma; absorptie-daling $0,62 \equiv 0,30 \mu\text{mol}$ NADH). Vanwege de stoichiometrie van deze omzetting kwam hiermee een kwantitatieve bepaling van pma ter beschikking voor het verdere onderzoek.

Effect van het oplosmiddel van pma

Uit het verschil tussen pma opgelost in ether en pma opgelost in ethanol werd reeds een groot effect van het oplosmiddel op de tautomerie van pma waargenomen (3.4.2). De invloed van het oplosmiddel bleek eveneens met een oplossing van pma in 50 μ l ethanol, die met water was aangevuld tot 1 ml. Deze oplossing werd getest in het NADH-systeem met een buffer-concentratie van 33 mM, waarbij een etherische oplossing van pma aanleiding gaf tot een bifasische hydrogenering. Hierbij bleek de hydrogenering uitsluitend volgens fase I te verlopen (fig. 6.13.d). Blijkbaar heeft in dit mengsel een volledige omzetting van enol-pma in keto-pma plaats gehad, die waarschijnlijk is gekatalyseerd door de lage pH van het mengsel (vanwege de zuurgroep in pma). De stabiliteit van keto-pma in deze oplossing bij kamertemperatuur was opvallend (halveringstijd 40 min). Bij de hydrogenering van pma opgelost in ethanol-water 1-20, werd niet de stoichiometrische hoeveelheid NADH verbruikt. Blijkbaar ontleedt bij pH 7,5 een gedeelte van het keto-pma in de tijd, die nodig is voor de enzymatische hydrogenering.

Fig. 6.13 a t/m e.

Effect van preincubatie, bufferconcentratie en oplosmiddel van pma



In experiment a, c, d en e werd 1,6 U TDH en 0,4 μ mol NADH in 3 ml K-fosfaatbuffer pH 7,5 gebruikt.

- preincubatie bij pH 7,5:* 1,5 μ mol pma + NADH in 33 mM buffer; TDH toegevoegd op tijd $t = 0$ min en $t = 2$ min.
- preincubatie bij pH 5,5:* 0,5 μ mol pma in 0,5 ml 5 mM buffer pH 5,5 of pH 7,5; na 15 sec (tijd $t = 0$) werden 0,4 U TDH, 0,4 μ mol NADH en 2,5 ml 33 mM K-fosfaatbuffer pH 7,5 toegevoegd.
- effect bufferconcentratie:* hydrogenering van 0,3 μ mol pma in 1 M buffer.
- pma opgelost in ethanol-water (1 - 20):* 0,3 μ mol pma toegevoegd aan NADH en TDH in 33 mM buffer.
- 1. pma opgelost tetra:* toegevoegd aan TDH en NADH in 33 mM buffer.
2. pma opgelost in tetra-water (1 - 20): toegevoegd aan TDH en NADH in 33 mM buffer.

Een snelle vorming van keto-pma is ook waargenomen in een soortgelijk experiment met tetra(chloorkoolstof) i.p.v. ethanol. Dit blijkt uit fig. 6.13 e, waarin de enzymatische hydrogenering is weergegeven van pma, dat aan het incubatie-mengsel was toegevoegd als oplossing in tetra (curve 1) of als oplossing in tetra-water 1-20 (curve 2). Omdat pma opgelost in tetra (vrijwel) geheel in de enol-vorm aanwezig is (3.4.2) kan uit dit experiment met betrekking tot fase I worden afgeleid, dat de hydrogenering in deze fase niet louter aan de aanwezigheid van keto-pma in de pma-oplossing mag worden toegeschreven maar ook zou kunnen worden veroorzaakt door een snelle tautomere omlegging, wanneer het pma tijdens het homogenee worden van de apolaire pma-oplossing en het incubatie-mengsel tijdelijk aan een zuur waterig milieu wordt blootgesteld.

Kwantitatieve verklaring van fase I

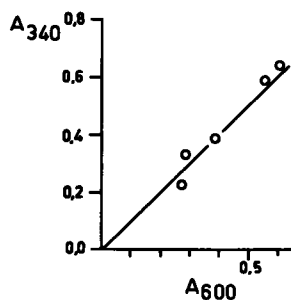
Een kwantitatieve verklaring voor fase I werd verkregen door op verschillende tijden monsters te nemen tijdens de omlegging van enol-pma in ethanol bij 0°. Hierbij bleek dat bij benadering aan de volgende relatie werd voldaan:

totaal pma	— keto-pma	≡ enol-pma
(absorptie-daling in 1 M buffer)	(absorptie-daling in fase I in 33 mM buffer)	(absorptie bij 600 nm bepaald met ferrichloride)

Dit verband is grafisch weergegeven in fig. 6.14. Hieruit volgt dat de hoeveelheid pma, die in fase I wordt gehydrogeneerd gelijk is aan de totale hoeveelheid toegevoegd pma minus de hoeveelheid, die in het begin van de reactie als enol-pma aanwezig is. Dit vormt een verdere bevestiging van de gegeven verklaring van het bifasisch verloop van de enzymatische hydrogenering van pma.

Fig. 6.14

Verband tussen het enol-gehalte van pma en de hydrogenering in fase I



Een pma-oplossing in ethanol (2,5 mg/ml) werd geïncubeerd bij 0°. Na verschillende tijden werd met 20 µl van deze oplossing de totale absorptie-afname in 1 M K-fosfaatbuffer pH 7,5 bepaald en in 33 mM buffer de afname in fase I. Het verschil van deze waarden is uitgezet tegen de absorptie bij 600 nm van 100 µl van de pma-oplossing, bepaald m.b.v. de ferrichloride-methode volgens 2.13.

De stoechiometrie van de omzetting in 1 M buffer, de identificatie van tropazuur als reactieproduct (6.5), het effect van de pH op de tautomerie en de relatie pma (totaal) — pma (fase I) $\equiv$ pma (enol) vormen een bevestiging van de hier gegeven verklaring voor de kinetiek van de enzymatische hydrogenering. Voorts kan de hydrogenering in 1 M buffer worden gebruikt voor een kwantitatieve bepaling van pma en is met ethanol—water 1—20 als oplosmiddel voor pma een redelijk stabiele oplossing van keto—pma ter beschikking gekomen, zodat de ontleding van het keto—pma (6.7) en het effect van keto—pma op de instelling van het door TDH gekatalyseerde evenwicht (6.8) konden worden bestudeerd.

6.7 DE SNELHEID VAN SPONTANE ONTLEDING VAN PMA

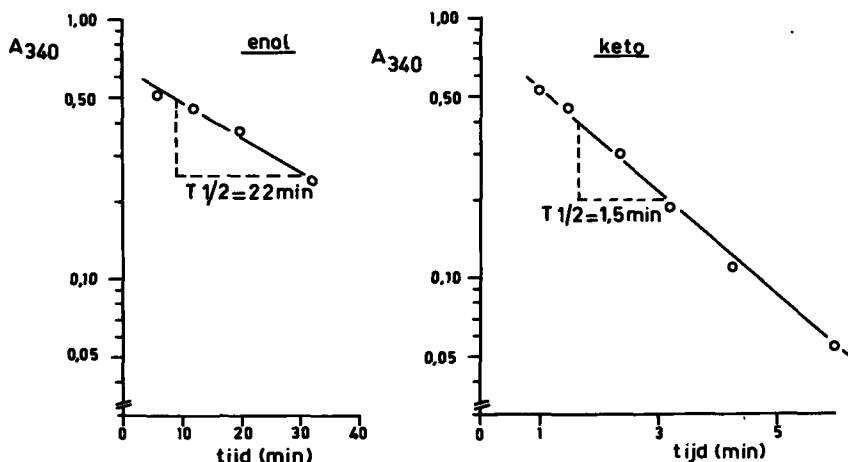
Bij de verklaring van de dehydrogenering van tropazuur o.i.v. gezuiverd TDH in neutraal milieu is verondersteld, dat de langzame NADH—productie na instelling van het evenwicht wordt bepaald door de snelheid, waarmee het gevormde pma ontleeft onder heersende omstandigheden (6.5). Met de kwantitatieve bepaling voor pma, die in de voorafgaande paragraaf is beschreven, is zowel voor de enol—vorm als voor de keto—vorm de ontledingssnelheid bepaald en vergeleken met de snelheid, die uit de NADH—productie kan worden berekend. Op deze manier is een bevestiging verkregen voor de bovenstaande veronderstelling.

Voor de bepaling van de snelheid van de ontleding van keto—pma werd 2,5 mg pma opgelost in 50 μ l ethanol en vervolgens aangevuld met water tot 1 ml. Van deze oplossing van keto—pma werd een monster van 40 μ l gedurende verschillende tijden gepreïncubeerd met 0,4 ml 33 mM K—fosfaat buffer pH 7,5. Hierna werd NADH en TDH in 2,55 ml 33 mM K—fosfaat buffer pH 7,5 toegevoegd en werd de absorptie na 5 minuten gemeten. Het verschil van de absorptie van een controle—mengsel (zonder pma) met de absorptie, die na 5 minuten werd bepaald, is een maat voor de keto—pma—concentratie na de preincubatie; in fig. 6.15 is dit verschil logaritmisch tegen de preincubatietijd uitgezet. De stof blijkt te ontleden volgens een reactie van de eerste orde met een snelheids—constante van $0,46 \text{ min}^{-1}$, d.w.z. een halveringstijd van 90 sec.

Op geheel analoge wijze werd de stabiliteit van enol—pma in dit milieu onderzocht. Hierbij werd uitgegaan van monsters van 20 μ l van een oplossing van enol—pma in ether (2,5 mg/ml). Voor de bepaling van de hoeveelheid nog aanwezig pma werd de incubatie met NADH en TDH uitgevoerd in 1 M K—fosfaat buffer pH 7,5. Uit de resultaten weergegeven in fig. 6.15 blijkt dat ook met deze oplossing pma volgens een eerste orde kinetiek verdwijnt met een snelheids—constante van $0,032 \text{ min}^{-1}$ (halveringstijd 22 min). In 1 M fosfaat wordt enol + keto—pma gemeten. Gezien de geringe stabiliteit van keto—pma in dit milieu kunnen de gemeten waarden worden toegeschreven aan enol—pma en zal de snelheids—constante betrekking hebben op de ontleding van enol—pma (waarschijnlijk via de keto—vorm).

Hiermee is een groot onderling verschil in stabiliteit aangetoond tussen keto- en enol-pma.

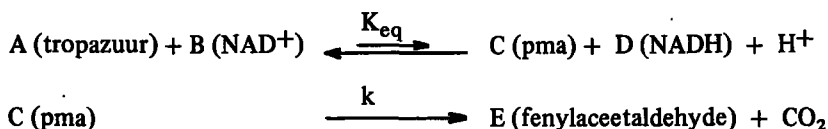
Fig. 6.15
Spontane ontleding van enol- en keto-pma



De enzymatische bepaling van pma werd uitgevoerd met NADH (0,13 mM) en TDH (1,6 U) in K-fosfaatbuffer pH 7,5. Bufferconcentratie bij de enol-pma bepaling 1M; bij de keto-pma bepaling 33 mM.

De snelheid van de spontane ontleding van pma kan ook berekend worden uit de NADH-productie na instelling van het evenwicht. Het is niet eenvoudig de halveringstijd van pma uit de NADH-productie te berekenen, omdat deze NADH-productie niet verloopt via een eerste orde kinetiek, daar er voortdurend pma wordt geproduceerd t.g.v. de verschuiving van het evenwicht.

Omdat de instelling van het evenwicht bij de gebruikte hoeveelheid TDH een snelle reactie is t.o.v. de spontane ontleding van pma en omdat verandering in de concentraties van tropazuur, NAD^+ en H^+ bij de dehydrogenering van een klein gedeelte van het tropazuur mogen worden verwaarloosd, kunnen voor de reacties:



de volgende vergelijkingen worden opgesteld:

$$\frac{d[E]}{dt} = k [C] \quad (1)$$

$$\frac{d[C]}{dt} = - \frac{d[E]}{dt} + \frac{d[D]}{dt} \quad (2)$$

$$\text{Stel } [C] \times [D] = K_{eq} \cdot \frac{[A][B]}{[H^+]} = K^1 = \text{constant} \quad (3)$$

differentiëren van (3) geeft

$$\frac{d[C]}{dt} = - \frac{K^1}{[D]^2} \cdot \frac{d[D]}{dt} \quad (4)$$

Substitutie van (1), (2) en (3) in (4) geeft na integratie vergelijking (5) waarin D_0 en D de concentratie van NADH op tijd $t = 0$ resp. $t = t$ voorstellen en $t = 0$ een willekeurig tijdstip is na instelling van het evenwicht:

$$\ln \frac{[D]}{[D_0]} + \frac{[D]^2 - [D_0]^2}{2 K^1} = k \cdot t \quad (5)$$

Met vergelijking (5) is uit de NADH-productie na de instelling van het evenwicht de waarde k berekend voor de curven 2 en 4 uit fig. 6.8. In curve 2 bedraagt na 45 sec ($t=0$) en 3 min 45 sec ($t=3$) de A_{340} van het gevormde NADH 0,124 resp. 0,203; voor de NADH-concentraties D_0 en D kan hieruit 0,0200 en 0,0326 mM worden berekend. Indien de hoeveelheid pma, die tijdens het instellen van het evenwicht reeds ontleed is, wordt verwaarloosd, is $[C] = [D]$ en K^1 derhalve $= (0,020)^2 = 0,0004 \text{ mM}^2$. Substitutie van deze waarden in (5) geeft $k = 0,44 \text{ min}^{-1}$ (halveringstijd 95 sec). Aangezien voor $[C]$ een te hoge waarde is aangenomen, zal de werkelijke waarde van k iets hoger liggen (geschat wordt 5–10%). Uit fig. 6, curve 4, kan op analoge wijze een k van $0,40 \text{ min}^{-1}$ worden berekend (halveringstijd 104 sec).

Deze waarden zijn in goede overeenstemming met de ontledings-constante van keto-pma, zoals die is bepaald uit de eerder in deze paragraaf beschreven experimenten. Uit deze overeenstemming mag worden geconcludeerd dat de NADH-productie na instelling van het evenwicht wordt bepaald door de ontledingssnelheid van keto-pma en niet kan worden toegeschreven aan de instabiliteit van enol-pma onder de reactie-omstandigheden.

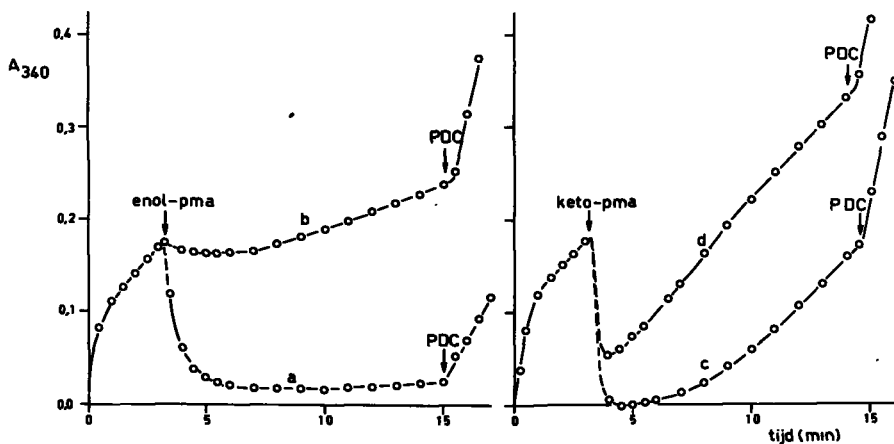
6.8 HET EFFECT VAN KETO-PMA OP DE INSTELLING VAN HET EVENWICHT

Indien de keto-vorm van pma het product is van de enzymatische dehydrogenering van tropazuur, zoals kan worden afgeleid uit de snelheid van ontleding van het reactie-product, zal keto-pma een veel groter effect hebben op de instelling van het evenwicht dan enol-pma. Daarom is het effect van enol-pma en van keto-pma op de instelling van het evenwicht vergeleken (zie fig. 6.16). Tropazuur, NAD^+ en TDH werden gedurende 3 min en 15 sec. geïncubeerd; vervolgens werd $3 \mu\text{mol}$ enol-pma (curve a), $0,3 \mu\text{mol}$ enol-pma (curve b), $3 \mu\text{mol}$ keto-pma (curve c) of $0,3 \mu\text{mol}$ keto-pma (curve d) toegevoegd en de absorptie bij 340 nm gedurende enige tijd gevolgd.

Uit het linker gedeelte van fig. 6.16 blijkt $3 \mu\text{mol}$ enol-pma een duidelijk effect te hebben op de evenwichtsinstelling. Dit experiment is vergelijkbaar met het experiment weergegeven in fig. 6.9 curve a: ook hierbij wordt na de instelling van het evenwicht dezelfde vertraging in de NADH-productie waargenomen. Een gering effect werd waargenomen met $0,3 \mu\text{mol}$ pma. In het rechter gedeelte van fig. 6.16 is het effect van keto-pma weergegeven; hieruit blijkt, dat dezelfde hoeveelheden keto-pma een groter en sneller effect hebben op de instelling van het evenwicht, maar dat dit effect slechts van korte duur is.

Fig. 6.16

Het effect van enol-pma en keto-pma op de instelling van het evenwicht



Na 3 min 15 sec werd aan tropazuur (50 mM), NAD^+ (3,3 mM) en TDH (4U) in 3 ml 33 mM K-fosfaat pH 7,0 toegevoegd: $3 \mu\text{mol}$ resp. $0,3 \mu\text{mol}$ enol-pma (etherische oplossing) curve a resp. b: $3 \mu\text{mol}$ resp. $0,3 \mu\text{mol}$ keto-pma (ethanol-water 1-20) curve c resp. d. Voor de absorptie van het incubatie-mengsel in afwezigheid van het enzym is gecorrigeerd. Het effect van PDC wordt in hoofdstuk 7 besproken.

Met de gegevens over de keto-enol tautomerie kunnen deze waarnemingen als volgt worden verklaard: keto-pma heeft een direct en groot effect op de evenwichtsinstelling, omdat keto-pma het product is dat bij de dehydrogenering ontstaat. Het effect is maar van korte duur door de instabiliteit van het keto-pma (halveringstijd 90 sec); hierdoor wordt na enkele minuten weer een NADH-productie gevonden, die vergelijkbaar is met de NADH-productie die vóór het toevoegen van het keto-pma werd waargenomen. Enol-pma heeft een veel geringer effect, dat echter veel langer werkzaam is. Dit kan worden verklaard door aan te nemen dat enol-pma zelf geen effect heeft, maar uitsluitend werkzaam is doordat het kan overgaan in de keto-vorm. De lange duur van het effect komt tot stand door de langzame tautomere omlegging, waardoor gedurende lange tijd een kleine hoeveelheid keto-pma wordt gevormd. Ondanks de spontane ontleding van het gevormde keto-pma wordt gedurende meer dan 10 min zoveel keto-pma gevormd, dat het evenwicht vrijwel niet verschuift en er geen NADH wordt geproduceerd.

Zo kan ook het verschil worden verklaard, dat werd gevonden tussen de evenwichts-constante, bepaald uit experimenten met en zonder pma. Aangezien het toegevoegd pma grotendeels in de onwerkzame enol-vorm aanwezig was, werd voor de berekening van de evenwichts-constante in feite een te hoge pma-concentratie gebruikt, waardoor voor de constante een te hoge waarde werd berekend.

In overeenstemming met deze verklaring kan met het experiment met keto-pma een waarde voor de evenwichts-constante worden afgeleid, die overeenkomt met de vroeger gevonden waarden, berekend uit de experimenten waarin géén pma was toegevoegd. De evenwichts-constante is berekend uit het absorptie-minimum van curve d (fig. 6.16). Naar schatting is na 4 minuten 25% van het toegevoegde pma en 70% van het tijdens de dehydrogenering gevormde pma ontleed. Indien hiervoor bij de berekening wordt gecorrigeerd, wordt een waarde van $\pm 0,4 \times 10^{-12}$ M gevonden.

6.9 DISCUSSIE

Het dehydrogenase dat in *Pseudomonas PMBL-1* betrokken is bij de dehydrogenering van tropazuur is specifiek voor dit substraat; het enzym draagt de waterstof over op de cofactor NAD^+ , zodat als officiële naam van het enzym tropazuur: NAD^+ oxidoreductase wordt voorgesteld.

Het dehydrogenase blijkt zowel de NAD^+ -afhankelijke dehydrogenering van tropazuur als de NADH-afhankelijke hydrogenering van keto-pma te katalyseren; in aanwezigheid van het enzym en cofactor wordt gestreefd naar instelling van het van het evenwicht. Uit de bestudering van de kinetiek is gebleken, dat de snelle initiële absorptie-toename bij de enzymatische dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu correspondeert met de instelling van een evenwicht en dat de hierop volgende langzame NADH-productie wordt bepaald door de snelheids-constante

(k) van de spontane decarboxylering, waardoor het gevormde pma aan het evenwicht wordt onttrokken. De evenwichtsconstante is bepaald bij verschillende concentraties substraat en cofactor en bij verschillende pH-waarden (tabel 6.17). De evenwichtsconstante heeft een waarde van $\pm 0,30 \times 10^{-12}$ M, zoals berekend uit de experimenten, waarin het evenwicht is ingesteld door dehydrogenering van van tropazuur. In aanwezigheid van enol-pma lijkt de evenwichtsconstante 5–8 maal groter, maar dit wordt veroorzaakt doordat niet het enol-pma, maar de keto-vorm het werkelijk substraat is bij de hydrogenering o.i.v. TDH. In overeenstemming hiermee is uit het experiment met keto-pma $K_{eq} = \pm 0,4 \times 10^{-12}$ M berekend.

Van verschillende andere NAD^+ -afhankelijke dehydrogenases is bekend, dat deze zijn betrokken bij reversibele reacties. De meest bekende voorbeelden zijn wel het alcohol-dehydrogenase en het melkzuur-dehydrogenase, die zowel de dehydrogenering van ethanol resp. melkzuur als de hydrogenering van acetaldehyde resp. van pyrodruivenzuur katalyseren. De bijbehorende evenwichtsconstanten zijn bepaald op $8,0 \times 10^{-12}$ M (Bäcklin 1958) resp. $2,4 \times 10^{-12}$ M (Kubowitz 1943). Vergelijkt men de evenwichtsconstante voor het door TDH gekatalyseerde evenwicht met deze waarden dan blijkt dat bij omzetting o.i.v. het TDH de hydrogenering nog in sterkere mate wordt bevorderd.

Tabel 6.17

Evenwichts-constante voor de NAD^+ -afhankelijke dehydrogenering van tropazuur

fig.	tropazuur mM	NAD^+ mM	pma enol mM	pma keto mM	NADH mM	H^+ M	K_{eq} M
6.6	12	2,0	—	—	0,020	10^{-8}	$0,17 \times 10^{-12}$
6.7	20	0,83	—	—	0,022	10^{-8}	$0,29 \times 10^{-12}$
6.8	10	0,83	—	—	0,010	$0,32 \times 10^{-7}$	$0,39 \times 10^{-12}$
6.8	20	1,67	—	—	0,017	$0,32 \times 10^{-7}$	$0,28 \times 10^{-12}$
6.8	40	3,33	—	—	0,035	$0,32 \times 10^{-7}$	$0,30 \times 10^{-12}$
6.9	50	3,33	1,0	—	0,013	$0,32 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-12}$
6.16	50	3,33	1,0	—	0,003	10^{-7}	$1,9 \times 10^{-12}$
6.16	50	3,33	0,1	—	0,027	10^{-7}	$1,6 \times 10^{-12}$
6.16	50	3,33	—	$<0,083$	0,0081	10^{-7}	$<0,40 \times 10^{-12}$

Uit de directe bepaling van de snelheid van de spontane decarboxylering blijkt, dat de snelheid waarmee keto-pma ontleedt ($k = 0,46 \text{ min}^{-1}$) fraai in overeenstemming is met de ontledings-constante die m.b.v. de formule (6.7) kan worden berekend ($k = 0,42 \text{ min}^{-1}$). Hierdoor behoeft geen twijfel te bestaan dat de NADH-productie na instelling van het evenwicht berust op de ontleding van keto-pma.

De invloed van de pH op de snelheid van ontleding van keto-pma kon vanwege experimentele moeilijkheden niet nauwkeurig worden onderzocht. Wel werd de indruk verkregen, dat in het pH-gebied van 5–9 deze snelheid bij benadering constant is. Enol-pma bleek in waterig milieu een stabiliteits-optimum te hebben bij pH 7; waarschijnlijk verloopt de ontleding van enol-pma via de omzetting in de minder stabiele keto-vorm en duidt dit pH-optimum erop dat zowel bij hoge als bij lage pH de tautomere omlegging sneller verloopt.

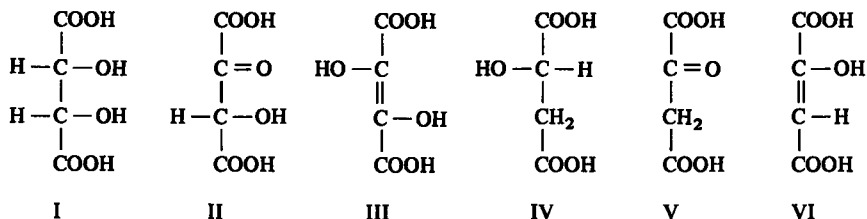
In *Pseudomonas* ATCC 12633 wordt amandelzuur (2-hydroxy-fenylazijnzuur) o.i.v. een amandelzuur-dehydrogenase geoxydeerd tot fenylglyoxylzuur. Dit enzym blijkt NAD^+ niet als waterstof-acceptor te kunnen gebruiken (Kennedy 1968). Men zou kunnen veronderstellen dat voor de hypothetische reactie:



het evenwicht zo ver naar links ligt, dat experimenteel NADH-productie niet kan worden waargenomen. Voor deze veronderstelling konden echter geen aanwijzingen worden gevonden. Noch spectrofotometrisch, noch met dunnelaagchromatografie kon de hydrogenering van fenylglyoxylzuur o.i.v. amandelzuur-dehydrogenase + NADH worden aangetoond.

Uit de literatuur zijn twee onderzoeken bekend van het effect van keto-enol tautomerie op de enzymatische (de)hydrogenering. Kohn en Jacoby (1968) hebben de NAD^+ -afhankelijke dehydrogenering van mesowijnsteenzuur (I) onderzocht, die verloopt o.i.v. het appelzuurdehydrogenase (fig. 6.18). Zij hebben hierbij als reactie-product niet oxaalglycerinezuur (II) maar de tautomere enol-vorm dihydroxyfumaarzuur (III) geïsoleerd. De auteurs stellen zich voor dat de reactie verloopt via II als intermediair, maar de bewijsvoering hiervoor is niet sluitend.

Fig. 6.18



Loewus (1955) onderzocht met hetzelfde enzym het effect van de keto-enol tautomerie van oxaalazijnzuur (V) op de enzymatische hydrogenering tot appelzuur (IV). Hierbij bleek dat V in fosfaat-buffer veel sneller wordt gehydrogeneerd dan de tautomere enol-vorm hydroxymaleïnezuur (VI). Dit suggereerde dat VI als zodanig niet door het enzym kan worden omgezet, maar in waterig milieu eerst moet worden omgelegd tot V. In aanwezigheid van Mg^{2+} -ionen werden V en VI met dezelfde snelheid gehydrogeneerd, wat er op duidde dat onder deze omstandigheden de tautomere omlegging van VI niet langer snelheidsbepalend is voor de hydrogenering. Een kwalitatieve bevestiging hiervoor werd verkregen door chemisch onderzoek van de keto-enol tautomerie van V en VI, waarbij bleek dat Mg^{2+} inderdaad de tautomere omlegging versnelde. Een kwantitatief verband tussen de verschillende effecten van Mg^{2+} kon echter niet worden gelegd.

De bestudering van de hydrogenering van pma o.i.v. het TDH heeft geleid tot de opheldering van het effect van de keto-enol tautomerie op de kinetiek van de enzymatische hydrogenering bij pH 7,5. Door combinatie van enzymologisch onderzoek met infrarood spectroscopie (3.4) en de kwantitatieve enol-bepaling kon worden afgeleid dat het TDH specifiek is voor de keto-vorm, dat het initiële snelle NADH-verbruik in fase I van de terug-reactie overeenkomt met de hydrogenering van de keto-vorm en dat de daarop volgende langzame fase wordt bepaald door een tautomere omlegging van enol-pma in keto-pma.

HOOFDSTUK 7

HET 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE-DEHYDROGENASE

7.1 INLEIDING

Het derde enzym dat in *Pseudomonas* PMBL-1 betrokken is bij de omzetting van atropine in fenylazijnzuur is het keto-2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC). Omdat de decarboxylering van keto-2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (keto-pma), in waterig milieu ook spontaan verloopt (halveringstijd ca. 90 seconden pH 7,5 25°) is het niet mogelijk de activiteit van het PDC op eenvoudige wijze (b.v. uit de CO₂-productie) te bepalen.

Voor de activiteitsbepaling en het verdere onderzoek van de eigenschappen van het enzym werd daarom gebruik gemaakt van het effect van PDC op de dehydrogenering van tropazuur o.i.v. TDH in neutraal milieu. Bij deze reactie wordt de snelheid van de NADH-productie na instelling van het evenwicht bepaald door de snelheid waarmee het gevormde keto-pma door decarboxylering aan het evenwicht wordt onttrokken. Aangezien deze decarboxylering wordt versneld door het PDC kan de NADH-productie in dit systeem worden gebruikt als een maat voor de activiteit van het decarboxylase.

Naast de identificatie van het enzym (7.2) en de beschrijving van de activiteitsbepaling (7.3) worden ook de gedeeltelijke zuivering (7.4) en enkele eigenschappen van het gezuiverde PDC (7.5) beschreven. In de discussie (7.6) komt de vraag aan de orde waarom in *Pseudomonas* een enzym aanwezig is voor de katalyse van een reactie, die ook spontaan snel verloopt.

7.2 AANWIJZINGEN VOOR HET VOORKOMEN VAN EEN DECARBOXYLASE

In het vorige hoofdstuk is aangetoond dat de dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu o.i.v. gezuiverd TDH verloopt via de instelling van een evenwicht gevolgd door een snelheidsbepalende niet-enzymatische decarboxylering van het gevormde keto-pma.

De instelling van dit evenwicht werd niet waargenomen bij niet-gezuiverde TDH-preparaten; dit deed vermoeden dat hierin nog een bepaalde component aanwezig was, die de decarboxylering van pma zodanig versnelde, dat in plaats van een langzaam verschuivend evenwicht een aflopende reactie werd verkregen.

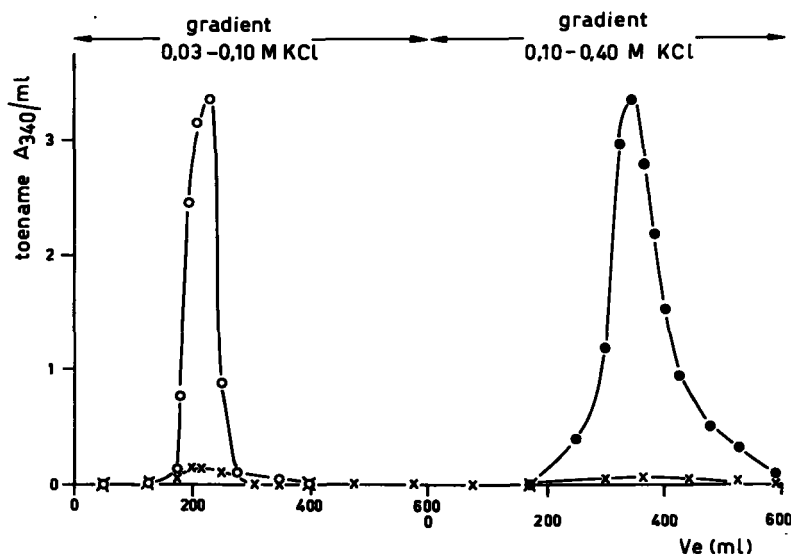
Chromatografie van niet-gezuiverd TDH

Omdat de TDH-preparaten pas na chromatografie over DEAE-cellulose aanleiding gaven tot de instelling van het evenwicht, lag het voor de hand, dat bij deze fractionering de bovenbedoelde component van het TDH werd gescheiden – een veronderstelling, die door het volgende experiment werd bevestigd.

Een DEAE-cellulose-kolom waaraan een niet-gezuiverd TDH-preparaat was geadsorbeerd, werd eerst geëluëerd met 600 ml HMP met een oplopende zoutconcentratie 0,03–0,1 M KCl en vervolgens met 600 ml HMP met een oplopende zoutconcentratie van 0,1–0,4 M KCl (fig. 7.1). Het eluaat werd op TDH-activiteit onderzocht met de standaardbepaling voor dit enzym. De activiteit bleek hoofdzakelijk aanwezig in de fracties 40–50 (elutievolume 200–250 ml).

Fig. 7.1

Fractionering van een TDH-preparaat op DEAE-cellulose



De kolom werd geëluëerd met 600 ml 0,03–0,1 M KCl in HMP (fractie 1–120) en vervolgens met 600 ml 0,1–0,4 M KCl in HMP (fractie 121–240). Op de ordinaat is uitgezet de totale absorptie-stijging gedurende de eerste 3 min, berekend voor 1 ml eluaat.

x – x – x absorptie-toename gemeten zonder toevoegingen.

● – ● – ● absorptie-toename gemeten met 50 μ l van fractie 46.

o – o – o absorptie-toename gemeten met 50 μ l van fractie 189.

Voor verdere gegevens betreffende de chromatografie zie 2.11.

Teneinde na te gaan of in de overige fracties een component aanwezig was, die in staat was de NADH-productie o.i.v. gezuiverd TDH bij pH 7,5 te stimuleren, werd de invloed van de overige fracties op de NADH-productie van fractie 46 bij deze pH onderzocht. Hiervoor werd de TDH-activiteit van alle fracties bepaald bij pH 7,5 (x – x – x) en van alle fracties in aanwezigheid van fractie 46 (o – o – o).

In aanwezigheid van fractie 46 werd in de fracties 160–240 (elutievolume 200–600 ml van de tweede zoutgradiënt) een veel grotere NADH-productie waargenomen

dan op grond van de afzonderlijke activiteit werd verwacht. Bovendien werd met deze gecombineerde fracties een andere kinetiek waargenomen: terwijl met fractie 46 een snel afnemende NADH-productie optrad (instelling van het evenwicht) werd met fractie 46 in aanwezigheid van de fracties 160–240 een NADH-productie waargenomen, die ook met niet-gezuiverde preparaten bij deze pH was gevonden. Wellicht bevatten deze fracties een component die in staat is het gevormde pma aan het evenwicht te onttrekken.

Op analoge wijze werd vervolgens de invloed onderzocht van "fractie 192" (verzamelde fracties 180–200, elutie-volume 300–400 ml van de tweede zoutgradiënt; aangeduid met fractie 192 naar de meest actieve fractie) op de NADH-productie bij pH 7,5 o.i.v. de fracties met TDH-activiteit. Hierbij bleek dat de NADH-productie van de fracties 40–50 aanzienlijk werd gestimuleerd door fractie 192. Ook in dit geval ging dit gepaard met een verandering van de bifasische absorptie—toename bij 340 nm in een meer continue vorming van NADH.

Monsters van fractie 192 die waren behandeld met proteolytische enzymen (subtilisine, pronase) of gedurende 5 min op 100° waren verhit, bleken hun stimulerende werking te hebben verloren; hieruit kon worden afgeleid, dat de component naar alle waarschijnlijkheid een eiwit was.

Effect van fractie 192 op het door TDH ingestelde evenwicht

De verandering in de kinetiek wordt geïllustreerd in fig. 7.2 waarin een experiment is weergegeven, waarbij een hoeveelheid van het gezuiverde TDH uit fractie 46 werd geïncubeerd met tropazuur en NAD^+ bij pH 7,5 en waaraan, nadat het evenwicht zich had ingesteld 100 μl van fractie 192 werd toegevoegd. Dit had tot gevolg dat de NADH-productie momentaan het verloop kreeg, dat met een ongezuiverd preparaat werd waargenomen.

Een vergelijkbaar resultaat werd verkregen indien i.p.v. fractie 192 een hoeveelheid hydrazine werd toegevoegd. Van hydrazine is bekend dat het met aldehyden reageert; het zou derhalve pma aan het evenwicht kunnen onttrekken. De overeenkomst tussen het effect van de eiwitfractie en van hydrazine vormt een duidelijke steun voor de veronderstelling dat het effect van fractie 192 moet worden toegeschreven aan een component die de omzetting van pma katalyseert.

Effect van fractie 192 op de stabiliteit van keto-pma

Een direct bewijs dat het betrokken eiwit een omzetting van pma katalyseert en niet op een andere wijze de kinetiek van de enzymatische dehydrogenering beïnvloedde, werd verkregen door bestudering van het effect van dit eiwit op de stabiliteit van keto-pma; voor de bepaling van keto-pma werd gebruik gemaakt van de enzymatische dehydrogenering beschreven in 6.6.

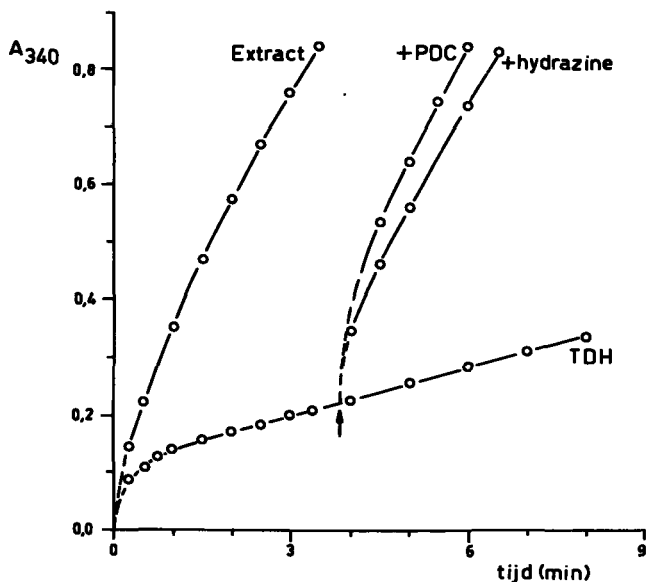
Bij de bepaling van het effect van het eiwit op de stabiliteit van het pma werd nagegaan hoeveel pma gedurende 30 sec spontaan ontleedde in 33 mM K-fosfaat pH 7,5 en hoeveel pma onder vergelijkbare omstandigheden werd omgezet in aanwezigheid van het eiwit uit fractie 192.

Uit de resultaten weergegeven in tabel 7.3 blijkt dat in afwezigheid van het eiwit

21% van het pma na 30 sec spontaan is omgezet. In aanwezigheid van de eiwit-fractie 192 is pma volledig ontleed in dezelfde tijd.

Fig. 7.2

Effect van PDC en hydrazine op de enzymatische dehydrogenering van tropazuur bij pH 8,0.



Na 3 min 45 sec werd 50 μ l fractie 192 ("PDC") resp. 0,25 M hydrazine pH 8,0 toegevoegd. Voor de volume-verandering t.g.v. deze toevoeging is gecorrigeerd. Tropazuur en NAD^+ werden geïncubeerd met niet-gezuiverd TDH ("Extract") of met gezuiverd TDH ("TDH" fractie 46; fig. 7.1). Voor verdere details wordt verwezen naar fig. 6.6.

Fig. 7.3

Effect van de eiwit-fractie op de stabiliteit van pma

Incubatietijd (sec)	"fractie 192"	concentratie pma (mM)
0	—	0,067
30	—	0,053
30	+	<0,001

Keto-pma (in alcohol-water 1-20) werd geïncubeerd met 0,3 μ mol NADH in 3 ml 33 mM K-fosfaat pH 7,5 bij 25° in aan- of afwezigheid van 20 μ l van fractie 192. Op tijd $t = 0$ resp. $t = 30$ sec werd de pma-concentratie bepaald door toevoegen van TDH (zie 6.6).

Het lag voor de hand te veronderstellen dat de omzetting van pma, die door de eiwit-component werd gestimuleerd, de decarboxylering van de verbinding zou zijn en het eiwit derhalve een decarboxylase. Door een onderzoek naar de producten die bij de inwerking van het enzym op pma worden gevormd is getracht dit te bevestigen.

Effect van fractie 192 op de productie van fenylaceetaldehyde

Bij de enzymatische decarboxylering van pma verwacht men dat fenylaceetaldehyde en CO_2 ontstaan, maar deze producten worden ook gevormd bij de snelle spontane decarboxylering van keto-pma. Wil men de enzymatische decarboxylering kunnen onderscheiden van deze spontane ontleding dan moeten speciale voorzorgen genomen worden, b.v. een zeer kortdurende incubatie met een hoge concentratie van het enzym of een systeem waarbij gedurende langere tijd een lage concentratie keto-pma aan een relatief grote hoeveelheid enzym wordt aangeboden. Dit laatste werd bereikt door tropazuur, NAD^+ en TDH te incuberen in aanwezigheid van het NAD^+ , -regenerend systeem: melkzuurdehydrogenase (LDH) + pyrodruivenzuur. Hierdoor werd het gevormde NADH onder verbruik van pyrodruivenzuur omgezet in NAD^+ en melkzuur en bleef de NADH-concentratie laag, zodat de dehydrogenering niet werd geremd door het gevormde NADH (6.4.5 en 6.5).

De omzetting van tropazuur door dit systeem is onderzocht in aan- en in afwezigheid van fractie 192. In aanwezigheid van de fractie werd gedurende 60 min incuberen bij 25° een aanzienlijke hoeveelheid fenylaceetaldehyde gevormd. Dit werd aangetoond met dunnelaagchromatografie met de elutiemiddelen BEM (fig. 7.4) en EMX.

In afwezigheid van de fractie 192 werd in een soortgelijk experiment slechts een zeer kleine hoeveelheid fenylaceetaldehyde gevormd. Hieruit kon worden afgeleid dat de eiwit-fractie betrokken is bij de vorming van het decarboxylerings-product: fenylaceetaldehyde. Dit gegeven in combinatie met het directe effect van het enzym op keto-pma vormen een zeer duidelijke aanwijzing dat de eiwit-fractie 192 het fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC) bevat.

Het reactieproduct werd ook geïdentificeerd als het 2,4-dinitrofenyl-hydraxon; hiervoor werd het etherische extract van het incubatie-mengsel behandeld met 2,4-dinitrofenylhydrazine (2.7) en onderzocht met dunnelaagchromatografie. Met het loopmiddel benzeen:petroleumether 40-60° (75:25 v/v) werd voor het hydraxon van het product een R_f -waarde van 0,27 gevonden; het hydraxon van fenylaceetaldehyde had een R_f -waarde van 0,28.

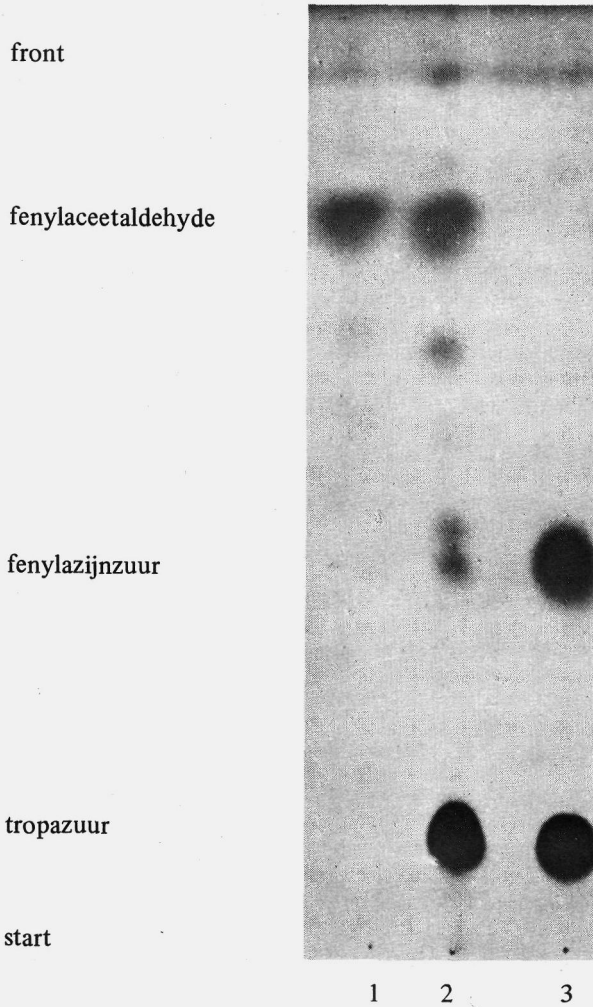
Het omzettingsproduct is ook geïdentificeerd d.m.v. gaschromatografie (2.12). De retentietijd van het product bedroeg 8,8 min en was gelijk aan die van fenylaceetaldehyde.

Effect van fractie 192 op de CO_2 -productie

De vorming van het reactie-product CO_2 en het effect van fractie 192 hierop is nagegaan met de manometrische techniek volgens Warburg (2.6). Hierbij werden tropazuur, NAD^+ , TDH en fractie 192 in de hoofdruimte van het Warburg-vat

Fig. 7.4

Dunnelaag-chromatogram van het incubatie-mengsel van tropazuur met TDH en PDC



In 15 ml 0,1 M K-fosfaat pH 8,5 werden gedurende 60 min bij 25⁰ geïncubeerd: tropazuur (300 μ mol), NAD⁺ (10 μ mol), TDH (20 U), fractie 192 (1 ml) en een NAD⁺-regenererend systeem (450 μ mol pyrodruivenzuur en 0,3 mg LDH). Het reactie-mengsel werd met ether geëxtraheerd en gechromatografeerd met het loopp middel BEM. Detectie H₂SO₄/HNO₃.

1. fenylaceetaldehyde
2. incubatiemengsel
3. tropazuur en fenylazijnzuur

Pyrodruivenzuur ($R_f = 0,12$) werd met de gebruikte detectie-techniek niet aangetoond.

geïncubeerd in aanwezigheid van het NAD^+ –regenererend systeem. De incubatie werd uitgevoerd bij pH 8,4 waardoor eventueel gevormd CO_2 als bicarbonaat in oplossing bleef. Na 60 min werd H_2SO_4 uit het zijvat toegevoegd; uit de hierop volgende drukverandering werd berekend hoeveel $\mu\text{l CO}_2$ er gedurende de incubatie was gevormd.

Uit tabel 7.5 blijkt dat in het complete incubatie–mengsel een aanzienlijke hoeveelheid gas werd vrijgemaakt. In aanwezigheid van KOH trad deze gasontwikkeling niet op zodat het hier een CO_2 –ontwikkeling betreft. De CO_2 –productie bleek niet op te treden in afwezigheid van TDH of van fractie 192. Het grote effect van deze fractie op de CO_2 –productie vormt een verdere bevestiging van de rol van dit enzym bij de afbraak van tropazuur. Thiaminepyrofosfaat en pyridoxaalfosfaat, die als cofactoren vaak een rol spelen bij de enzymatische decarboxylering, hebben geen invloed op de CO_2 –ontwikkeling; ook werd geen effect van Mg^{2+} of EDTA waargenomen.

Hiermee is de directe rol van de eiwit–fractie 192 bij de decarboxylering van pma tot fenylacetaldehyde en CO_2 aangetoond en betreft het hier het 2–fenylmalonzuur–semi–aldehyde–decarboxylase. Ook zijn door de identificatie van fenylacetaldehyde en CO_2 de producten aangetoond (zie 6.4) die indirect worden gevormd bij de enzymatische dehydrogenering van tropazuur.

Fig. 7.5

CO_2 –productie bij de enzymatische omzetting van tropazuur o.i.v. TDH en PDC

Incubatie–mengsel	mM	$\mu\text{l CO}_2$
Compleet	–	209
middenvat met KOH	–	9
– TDH	–	4
– PDC (fractie 192)	–	6
+ thiaminepyrofosfaat	0,15	195
+ pyridoxaalfosfaat	0,15	210
+ MgCl_2	0,5	219
+ EDTA	0,5	198

Het incubatie–mengsel in het hoofdvat van het Warburg–vaatje bevatte: 13 μmol tropazuur, 1 μmol NAD^+ , 0,8 U TDH, 0,2 ml fractie 192 en het NAD^+ –regenererend systeem (0,3 mg LDH en 18 μmol pyrodruivenzuur) in 2,7 ml 40 mM K–fosfaat pH 8,4.

In het middenvat werd 0,1 ml water of 0,1 ml 5 N KOH gebracht; in het zijvat 0,2 ml 2 N H_2SO_4 . Na 60 min incuberen bij 30° werd het zwavelzuur toegevoegd en de CO_2 –ontwikkeling gemeten.

7.3 DE KWANTITATIEVE BEPALING VAN DE PDC-ACTIVITEIT

De bepaling van de PDC-activiteit (zie 2.9.3) berust op het effect van dit enzym op de enzymatische dehydrogenering van tropazuur.

Deze bepaling werd als volgt uitgevoerd: 10 mM tropazuur, 0,8 mM NAD^+ en 0,8 U TDH werden geïncubeerd in fosfaat-buffer pH 8,5 totdat de snelheid van de NADH-productie werd bepaald door de spontane decarboxylering van pma. Hierna werd PDC toegevoegd en de NADH-productie verder gevolgd. Uit het verschil van de NADH-productie in aanwezigheid en in afwezigheid van het PDC werd de PDC-activiteit berekend. Om te voorkomen dat bij deze bepaling de verschuiving van het evenwicht in aanwezigheid van PDC snelheidsbepalend werd, is de bepaling uitgevoerd met een overmaat TDH (0,8 U). De tropazuur- en NAD^+ -concentratie en de pH zijn gebaseerd op resultaten van inleidende experimenten, waarin deze parameters werden gevarieerd. Bij een hogere pH of een grotere substraat- of NAD^+ -concentratie kan het effect van PDC niet nauwkeurig worden bepaald tengevolge van de hoge absorptie bij 340 nm, die onder deze omstandigheden bij de instelling van het evenwicht ontstaat. Bij een lagere pH of een kleinere tropazuur- of NAD^+ -concentratie was deze absorptie-toename gering; de absorptie-stijging die waargenomen werd na het toevoegen van PDC was echter onder deze omstandigheden niet rechtevenredig met de tijd, zodat een nauwkeurige bepaling van de activiteit van dit enzym niet mogelijk was.

Onder de beschreven omstandigheden kan de activiteit van PDC wel nauwkeurig worden bepaald en is de gemeten enzym-activiteit recht evenredig met de toegevoegde hoeveelheid (zie fig. 2.2).

Deze enzymbepaling wordt niet gestoord door TDH dat eventueel in het PDC-preparaat aanwezig is, omdat dit enzym reeds in overmaat wordt toegevoegd. De PDC-bepaling wordt wel gestoord door het volgende enzym uit de stofwisselingsketen van tropazuur, het fenylacetaldehyde-dehydrogenase dat onder de gebruikte omstandigheden het product van de decarboxylering (fenylacetaldehyde) onder productie van NADH omzet in fenylazijnzuur. Dit kan volledig worden onderdrukt door het enzym-preparaat (0,5 mg eiwit/ml) gedurende 15 min op 55° te verhitten; onder deze omstandigheden wordt het PDH volledig geïnactiveerd, terwijl het PDC zijn activiteit vrijwel geheel behoudt.

7.4 GEDEELTELIJKE ZUIVERING VAN HET PDC

Het resultaat van de zuivering van het PDC (2.11.2) is weergegeven in tabel 7.6. Het enzym is t.o.v. het extract van de bacteriën 85 x gezuiverd met een rendement van 29%; het werd hierbij vrijwel volledig van de andere tropazuur-enzymen gescheiden.

Uit het gedrag tijdens gel-filtratie over Sephadex G-100 kon het moleculair gewicht worden geschat op ± 45.000 (2.11.3); deze behandeling leidde niet tot een verdere zuivering.

Tabel 7.6
Gedeeltelijke zuivering van het PDC uit PMBL-1

Preparaat	TA	rendement	SA	zuivering
Extract	7,0	100%	0,76	1 x
Na streptomycine precipitatie	6,9	99%	—	—
Na ammoniumsulfaat precipitatie	3,9	56%	3,5	5 x
Na DEAE—cellulose chromatografie	2,0	29%	64,2	85 x

Enzym—activiteit en eiwit—concentratie werden bepaald volgens 2.9. TA is opgegeven in 10^3 U; SA in U/mg eiwit.

Het iso—electrisch punt van het enzym is 4,6 zoals is bepaald m.b.v. elektroforese in een pH—gradiënt van LKB 'Ampholytes'.

7.5 EIGENSCHAPPEN VAN HET GEZUIVERD ENZYM

7.5.1 De substraat—specificiteit

Omdat de activiteits—bepaling van het PDC berust op een stimulering van de enzymatische dehydrogenering van tropazuur, zal het duidelijk zijn dat de substraat—specificiteit niet op de in 7.3 beschreven wijze kan worden bepaald.

Daarom is de geschiktheid van verschillende aromatische carbonzuren om als substraat te dienen onderzocht door ca. 20 μ mol van deze verbindingen gedurende 1 uur te incuberen met het enzym (2 U) bij pH 7,0 en 25° en daarna het incubatie—mengsel aan te zuren, te extraheren met ether en het extract te onderzoeken op de aanwezigheid van omzettings—producten m.b.v. dunnelaagchromatografie met de elutievloeistoffen EMX en BEM.

De detectie werd uitgevoerd met $H_2SO_4-HNO_3$, 2,4—dinitrofenylhydrazine en Rhodamine—B, een universeel detectiemiddel voor UV—licht absorberende stoffen. Als controle werd de verbinding zonder PDC geïncubeerd.

Het bleek dat pma zowel spontaan als in aanwezigheid van PDC werd omgezet in fenylacetaldehyde, maar dat geen van de volgende verbindingen werd gedecarboxyleerd door het PDC:

fenylglyoxylzuur	2—fenyl—2—hydroxypropionzuur
fenylpyrodruienzuur	fenylazijnzuur
fenylmalonzuur	2—fenylpropionzuur
tropazuur	2—hydroxy—fenylazijnzuur

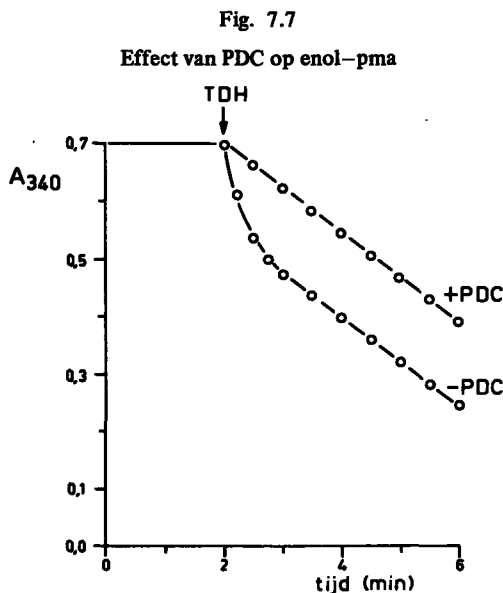
Dat een eventuele decarboxylering wel op deze manier kon worden aangetoond, blijkt uit een soortgelijk experiment, waarin fenylglyoxylzuur werd geïncubeerd met het fenylglyoxylzuur-decarboxylase uit *Pseudomonas* ATCC 12633 (9.5); hierbij werd een aanzienlijke omzetting in benzaldehyde aangetoond.

De ongeschiktheid van tropazuur, fenylmalonzuur en fenylazijnzuur als substraat voor het PDC, bleek tevens uit manometrische experimenten, waarbij tijdens de incubatie van deze verbindingen met het enzym geen CO_2 werd vrijgemaakt.

7.5.2 Specificiteit voor de keto-vorm van pma

Zoals in 7.2 is beschreven heeft PDC een sterke katalytische invloed op de decarboxylering van het keto-pma. Bij een analoog experiment met enol-pma werd de verbinding geïncubeerd in een NADH-oplossing in aan- en afwezigheid van PDC. Vervolgens werd TDH toegevoegd en de absorptie-daling bij 340 nm gemeten (fig. 7.7).

In het experiment zonder PDC werd het reeds in 6.6 beschreven verloop van de absorptie-daling waargenomen, n.l. een snelle initiële daling (fase I) tengevolge van de hydrogenering van de hoeveelheid keto-pma, die op het moment van het toevoegen van TDH aanwezig was, gevolgd door een langzame daling (fase II), die werd bepaald door de snelheid waarmee het resterende enol-pma in de keto-vorm werd omgezet.



Curve - PDC: enol-pma ($1,5 \mu\text{mol}$) werd gedurende 2 min geïncubeerd met $0,11 \text{ mM}$ NADH in 20 mM K-fosfaat pH 7,5 bij 25° . Vervolgens werd 5 U TDH toegevoegd.

Curve + PDC: als boven, bovendien werd op tijd $t = 0$ $0,2 \text{ U}$ PDC toegevoegd.

Bij het toevoegen van TDH aan de oplossing van enol-pma, die geïncubeerd was met PDC werd de snelle initiële daling van de A_{340} niet waargenomen, terwijl de absorptie-afname in fase II met precies dezelfde snelheid verliep als in het vorige experiment. Kennelijk heeft de preïncubatie met PDC uitsluitend de decarboxylering van keto-pma tot gevolg en wordt enol-pma door dit enzym niet omgezet.

Hieruit blijkt dat het PDC specifiek is voor keto-pma. Bij dit experiment werd een grote hoeveelheid TDH en weinig PDC gebruikt om te voorkomen, dat het PDC de daling van de absorptie tijdens fase II merkbaar zou beïnvloeden door decarboxylering van keto-pma, dat in deze fase door tautomere omlegging werd gevormd.

7.5.3 De stabiliteit van het enzym

De stabiliteit van het PDC bij verschillende temperaturen is onderzocht met een gezuiverd preparaat, dat was gedialyseerd tegen HMP en 0,18 mg eiwit/ml bevatte.

Het enzym bleek bij hogere temperaturen veel stabiel te zijn dan de andere tropazuur-enzymen. Het werd niet geïnactiveerd tengevolge van een incubatie gedurende 30 min bij 65°; door een incubatie bij 85° werd het enzym in 30 min voor $\pm$ 50% geïnactiveerd.

De stabiliteit van PDC tijdens incubatie bij verschillende pH-waarden is met eenzelfde preparaat bepaald. Het enzym was stabiel gedurende 30 min bij 25° van pH 5–10, maar werd buiten dit pH-gebied geïnactiveerd.

7.5.4 Diversen

Met de in dit hoofdstuk beschreven bepaling van het PDC is het niet mogelijk het pH-optimum van het enzym te bepalen, omdat veranderingen in de pH ook effect zullen hebben op het TDH en op de evenwichts-instelling.

Wel kon het effect worden nagegaan van enkele toevoegingen, die de dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu niet beïnvloedden (zie 6.4). De metaal-ionen: Mg^{2+} , Mn^{2+} resp. Ca^{2+} (1mM), EDTA (1 mM), fenylacetaldehyde en fenylazijnzuur (1 mM) hadden geen effect op de enzymatische decarboxylering.

Evenmin als bij de experimenten met de Warburg-techniek (7.2), werd enig effect waargenomen van de cofactoren thiaminepyrofosfaat en pyridoxaalfosfaat.

Tenslotte zij nog vermeld dat de werking van het PDC ook titrimetrisch kon worden aangetoond, bij pH 5,0 in een pH-staat. Dit was mogelijk, omdat de decarboxylering bij deze pH gepaard gaat met een zuurverbruik, daar het geproduceerde CO_2 niet als bi-carbonaat in oplossing gaat. Bij incubatie van pma in dit systeem werd een zuurconsumptie waargenomen, die door toevoegen van PDC met een factor 2,5 toenam. Deze methode bleek echter niet bruikbaar voor een activiteitsbepaling van het enzym.

7.6 DISCUSSIE

De werking van het PDC is op verschillende manieren aangetoond. Het enzym versnelt de NADH-productie tijdens de enzymatische dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu na instelling van het evenwicht (zie ook fig. 6.9 en fig. 6.16). Het enzym stimuleert eveneens de vorming van fenylacetaldehyde en CO_2 en heeft een direkt effect op de stabiliteit van keto-pma. Uit deze waarnemingen mag worden geconcludeerd dat het hier inderdaad het 2-keto-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase betreft.

Hydrazine heeft een soortgelijk effect op het evenwicht dat o.i.v. TDH wordt ingesteld. Waarschijnlijk berust dit ook op het onttrekken van pma aan het evenwicht. Dit zou kunnen worden veroorzaakt door een reactie van pma met hydrazine tot het hydrazon; het is echter ook mogelijk dat hydrazine de ontleding van pma versnelt.

Vanwege de indirecte bepaling van de PDC-activiteit kan het pH-optimum niet worden bepaald. Het enzym heeft geen cofactor nodig, zoals thiaminepyrofosfaat of pyridoxaalfosfaat. Het enzym is opvallend resistent tegen hogere temperaturen in tegenstelling tot verschillende decarboxylases voor andere aromatische zuren, zoals het 2,3-dihydroxybenzoëzuur-decarboxylase (Subba Rao, 1967) en het fenylpyrroldruivenzuur-decarboxylase (Asakawa, 1968), die zeer instabiel zijn.

De substraat-specificiteit van het PDC is d.m.v. dunnelaagchromatografie onderzocht; behalve pma wordt geen van de onderzochte aromatische zuren in aanwezigheid van het PDC omgezet. Evenmin katalyseert het PDC de decarboxylering van enol-pma.

Het lijkt dus waarschijnlijk dat het PDC specifiek is voor het substraat keto-pma. De specifieke functie in de bacterie van dit enzym is bevestigd door de bestudering van de inductie van het PDC, die in hoofdstuk 10 zal worden beschreven.

Vanwege de instabiliteit van keto-pma in neutraal waterig milieu lijkt het op het eerste gezicht vreemd, dat in *Pseudomonas PMBL-1* een enzym wordt gesynthetiseerd dat als functie heeft de decarboxylering van pma te katalyseren.

De aanwezigheid van het decarboxylase zou echter kunnen worden begrepen, wanneer men aanneemt, dat onder fysiologische omstandigheden – vanwege de ligging van het door TDH gekatalyseerde evenwicht – de „steady state-concentratie” van het keto-pma zo laag is, dat door de spontane ontleding te weinig fenylacetaldehyde per tijdseenheid wordt gevormd, om een normale groei van de cel mogelijk te maken met tropazuur als enige koolstofbron.

De noodzaak van de aanwezigheid van het decarboxylase blijkt uit de eigenschappen van mutanten, waarin t.g.v. een mutagene behandeling alleen de genetische informatie voor het PDC verloren is gegaan; deze zijn nl. niet meer in staat te groeien met atropine of tropazuur als enige koolstofbron (10.7).

In de stofwisselingsketen van tropazuur wordt een NAD^+ – afhankelijke dehydrogenering gevolgd door een enzymatische decarboxylering. Dit is uit theoretisch

oogpunt interessant met betrekking tot het gebruik van NAD^+ als cofactor. Gezien de ligging van het evenwicht is de redox-potentiaal van pma/tropazuur aanzienlijk hoger dan van NAD^+/NADH ; voor de dehydrogenering op zich is NAD^+ dan ook niet geschikt als waterstof-acceptor.

Wanneer het TDH een waterstof-acceptor met een hogere redox-potentiaal zou gebruiken, zou de dehydrogenering op zich beter verlopen; een dergelijke waterstof-acceptor is echter vanwege de energievoorziening van de cel minder gunstig. Dat NAD^+ toch door de cel als waterstof-acceptor kan worden gebruikt bij de enzymatische dehydrogenering van tropazuur is waarschijnlijk mogelijk doordat – naast de voortdurende oxydatie van NADH – een irreversibele volgreactie optreedt, waardoor het product aan het evenwicht wordt onttrokken. Dit betekent dat de grote daling van de vrije energie die bij de decarboxylering optreedt, het de cel mogelijk maakt in de voorgaande stap een waterstof-acceptor te gebruiken met een lage redox-potentiaal.

Voor de energievoorziening van de cel is dit uiteraard bijzonder gunstig.

HOOFDSTUK 8

HET FENYLACEETALDEHYDE-DEHYDROGENASE

8.1 INLEIDING

De enzymatische dehydrogenering van fenylaceetaldehyde is de laatste reactie in de omzetting van atropine tot fenylazijnzuur.

Het hierbij betrokken enzym wordt aangeduid met fenylaceetaldehyde-dehydrogenase (PDH) en kan worden aangetoond in extracten van PMBL-1, gekweekt met atropine of tropazuur. Het PDH heeft evenals het tropazuur-dehydrogenase bij zijn werking NAD^+ nodig als co-factor, maar onderscheidt zich overigens in velerlei opzichten van dit enzym. Het onderzoek van het PDH werd aanvankelijk ernstig bemoeilijkt door de geringe stabiliteit van het enzym tijdens dialyse en in verdunde oplossingen. Door gebruik te maken van een speciaal samengestelde buffer (8.2), waarin de inactivering van het PDH slechts in geringe mate optrad, bleek het mogelijk een procedure uit te werken, waarmee een gedeeltelijke zuivering van het enzym kon worden bereikt (8.3). Onder invloed van het PDH wordt fenylaceetaldehyde omgezet in fenylazijnzuur, waarbij een stoichiometrische hoeveelheid NAD^+ wordt verbruikt; voor zover kon worden nagegaan, is de reactie in vitro niet reversibel.

Het dehydrogenase is specifiek voor fenylaceetaldehyde en heeft een grote affiniteit voor dit substraat.

Het PDH is afwezig in PMBL-1, gekweekt met fenylazijnzuur of glucose als koolstofbron, zodat het ook hier waarschijnlijk een induceerbaar enzym betreft.

8.2 ACTIVITEITS-BEPALING EN STABILITEIT VAN HET PDH

De activiteits-bepaling van het PDH berust op dezelfde principes als de methode die voor TDH is beschreven (2.9.3); ook hierbij wordt spectrofotometrisch de hoeveelheid NADH bepaald, die tijdens de reactie wordt gevormd. Het gebruikte systeem bestaat uit 0,13 mM fenylaceetaldehyde en 0,8 mM NAD^+ in 33 mM K-carbonaat pH 9,0 (zie 8.4). Zowel het substraat als NAD^+ zijn in voldoende hoge concentratie aanwezig om de enzymatische omzetting als een reactie van de nulde orde te laten verlopen. Remming door overmaat substraat werd niet waargenomen.

In het begin van het onderzoek werd de ultrasonische extractie van de bacteriën uitgevoerd in 10 mM K-fosfaatbuffer pH 7,0. Het bleek echter dat het enzym in dergelijke extracten niet stabiel was. In minder geconcentreerde preparaten (1–4 mg eiwit/ml) daalde de activiteit van het PDH in enkele uren tot ongeveer 70% van de waarde, die direct na de bereiding van het extract werd gevonden. Na 18 uur was de activiteit nog slechts 10–30%. De activiteit van meer geconcentreerde preparaten (20–50 mg eiwit/ml) was evenmin constant, alhoewel de enzym-activiteit minder snel afnam. Bovendien bleek dat het PDH tijdens een dialyse tegen 10 mM tris-HCl

pH 8,0 (48 uur bij 4°), volledig werd geïnactiveerd. Deze inactivering verliep onafhankelijk van de eiwitconcentratie. Omdat deze instabiliteit de zuivering en het verder onderzoek van het PDH ernstig bemoeilijkte, werd van een niet-gezuiverd preparaat de stabiliteit tijdens dialyse en bij bewaren in verdunde oplossing nader onderzocht. Hierbij werd getracht omstandigheden te vinden, waaronder de inactivering niet of slechts in geringe mate optrad.

8.2.1 Stabiliteit tijdens dialyse

Het PDH werd door dialyse tegen 10 mM tris-HCl pH 8,0 (48 uur bij 4°) irreversibel geïnactiveerd (tabel 8.1). Noch door toevoegen van de geconcentreerde dialyse-buffer, noch door mengen met een door verhitting gedenateerd enzym-preparaat kon een reactivering worden bewerkstelligd. De inactivering werd niet ongedaan gemaakt door toevoegen van de ionen: Mg^{2+} , Zn^{2+} of Mn^{2+} en evenmin door de co-factoren NAD^+ of $NADP^+$.

Bij een dialyse van een meer geconcentreerd preparaat kon een gedeeltelijke stabilisering worden bereikt door 100 mM KCl aan de dialyse-buffer toe te voegen (zie tabel 8.1). Een verdere bescherming werd door toevoegen van 1 mM EDTA verkregen. De zouten NH_4Cl , $MgCl_2$ en Na_2SO_4 waren niet in staat KCl te vervangen. Wanneer werd gedialyseerd tegen 100 mM K-fosfaat pH 8,0 1 mM EDTA bleek nog minder inactivering op te treden. De activiteit na dialyse tegen 100 mM K-fosfaat pH 7,0 1 mM EDTA was ongeveer gelijk aan die van een ongedialyseerd preparaat, dat gedurende 48 uur bij 4° was bewaard. Blijkbaar wordt het enzym tegen de inactivering door dialyse beschermd door 100 mM K^+ -ionen. Beide preparaten bevatten echter $\pm 40\%$ minder enzym-activiteit dan direct na bereiding van het extract werd gevonden.

Tabel 8.1

Invloed van de samenstelling van de dialyse-buffer op de stabiliteit van PDH

Buffer	Enzym-activiteit U/ml
10 mM tris-HCl pH 8,0	0,01
10 mM tris-HCl pH 8,0 + 100 mM KCl	0,15
10 mM tris-HCl pH 8,0 + 100 mM KCl + 1 mM EDTA	0,40
100 mM K-fosfaat pH 8,0 + 1 mM EDTA	0,67
100 mM K-fosfaat pH 7,0 + 1 mM EDTA	0,95
direct bepaald na extractie	1,62
na 48 uur bewaren bij 4°	1,01

Een niet-gezuiverd PDH-preparaat (24 mg eiwit/ml; 5 ml) werd gedurende 48 uur gedialyseerd tegen 2 l van de vermelde buffer; vervolgens werd de enzym-activiteit bepaald volgens 2.9.3.

8.2.2 Stabiliteit in verdunde preparaten

Het gebruik van 100 mM K-fosfaat pH 7,0 1 mM EDTA tijdens de ultrasonische extractie kon echter niet voorkomen, dat vooral in verdunde preparaten (1–4 mg eiwit/ml) nog verlies van activiteit optrad. Daarom is het effect van verschillende stoffen op de stabiliteit van het PDH na verdunnen nader onderzocht.

Hierbij werd uitgegaan van een zeer geconcentreerd extract (60 mg eiwit/ml) dat 3,1 U/ml bevatte. Dit werd 20 maal verdund in 50 mM K-fosfaat pH 7,0 1 mM EDTA, waaraan één of meer andere verbindingen waren toegevoegd. Direct na verdunnen en na bewaren gedurende 48 uur bij 4° werd de enzym-activiteit bepaald. Zoals uit tabel 8.2 blijkt, zijn mercapto-ethanol (ME), Na-laurylsulfaat (SDS), het substraat fenylaceetaldehyde en de cofactor NAD⁺ in de gebruikte concentraties in staat de inactivering gedeeltelijk tegen te gaan.

Later bleek dat ook 0,01% runderserum-albumine en SH-verbindingen als cysteine, dithiothreitol en glutathion (1 mM) geen bescherming geven. De oppervlakte-actieve stoffen Triton X-100 en saponine (0,01%), de cofactor flavine-adenine-dinucleotide (1 mM), ammoniumsulfaat (1%) en aceton (5%) zijn niet in staat de inactivering te voorkomen.

Zoals uit tabel 8.2 blijkt, geven Na-laurylsulfaat, mercapto-ethanol en fenylaceetaldehyde in combinatie een goede bescherming tegen de spontane inactivering van PDH. Na dialyse gedurende 48 uur in 50 mM K-fosfaat pH 7,0 1 mM EDTA 1 mM ME 0,05 mM SDS 1 mM fenylaceetaldehyde werd zelfs een geringe verhoging van de enzym-activiteit waargenomen. Door deze buffer tijdens de bereiding van extracten te gebruiken, was het mogelijk extracten te verkrijgen met een reprodu-

Tabel 8.2

Invloed van enkele verbindingen op de stabiliteit van PDH in een verdunde oplossing

	mM	activiteit direct na verdunning (U/ml)	activiteit na 48 uur bij 4° (U/ml)
1. geen toevoeging	—	0,165	0,025
2. mercapto-ethanol	1	0,165	0,047
3. Na-laurylsulfaat	0,05	0,160	0,120
4. fenylaceetaldehyde	1	0,160	0,126
5. NAD ⁺	10	0,180	0,076
2 + 3 + 4 in combinatie	—	0,165	0,208

Een niet-gezuiverd PDH-preparaat (3,1 U/ml; 37 mg eiwit/ml) werd 20 x verdund met 50 mM K-fosfaat buffer en 0,1 mM EDTA (pH 7,0), waaraan verschillende stoffen waren toegevoegd. Enzym-activiteit bepaald volgens 2.9.3

ceerbaar PDH-gehalte. Ook in extracten bereid uit een geringe hoeveelheid bacteriën, bleef de activiteit constant, zodat een betrouwbare bepaling van het enzym-gehalte kon worden uitgevoerd.

Bij dit onderzoek naar het stabiliserende effect van diverse verbindingen werd uitgegaan van een oplossing, die 50 mM fosfaat bevatte en niet 100 mM, zoals aanwezig was in de buffer die bij de dialyse goede resultaten opleverde. Een zoutconcentratie van 100 mM werkt echter storend bij verschillende zuiveringstechnieken, zoals precipitatie met streptomycine-sulfaat en de chromatografie over DEAE-cellulose.

Aangezien deze technieken nog wel bij een concentratie van 50 mM konden worden gebruikt voor de zuivering van het PDH, werd het onderzoek naar de stabiliteit van het enzym in een verdunde oplossing met deze concentratie uitgevoerd. Gedurende de zuivering werd bij dialyse wel de hogere zoutconcentratie gebruikt; hierna werd het preparaat dan tot 50 mM verdund.

Bij de bepaling van PDH in niet-gezuiverde preparaten met een lage PDH-activiteit is het vereist te corrigeren voor de absorptie-toename in afwezigheid van het substraat. Omdat deze correctie niet mogelijk is wanneer fenylaceetaldehyde in het enzym-preparaat aanwezig is, werd in deze gevallen fenylaceetaldehyde uit de stabiliserende buffer weggelaten; de PDH-bepaling werd dan wel direct na de bereiding van het extract uitgevoerd.

8.3 GEDEELTELIJKE ZUIVERING VAN HET PDH

De zuivering van het PDH werd uitgevoerd in aanwezigheid van de stabiliserende buffer (zie 8.2) en volgens de in 2.11.2 beschreven methode. Hoewel de aanwezigheid van fenylaceetaldehyde de bewerkingen niet bepaald elegant maakt, is een verrijking van 52 x verkregen t.o.v. het extract met een rendement van 15%. Het overzicht van de zuivering in tabel 8.3 is representatief voor drie op deze manier uitgevoerde zuiverings-procedures. Het meest gezuiverde preparaat bezat een specifieke activi-

Tabel 8.3
Zuivering van PDH uit PMBL-1

Preparaat	TA (U)	Rendement	SA(U/mg)	Zuivering
Extract	790	100%	0,10	1 x
Streptomycine-sulfaat precipitatie	726	92%	—	—
Ammonium-sulfaat fractionering	370	47	0,54	5,4 x
DEAE-cellulose chromatografie	118	15	5,2	52 x

Eiwitconcentratie en enzym-activiteit bepaald volgens 2.9

teit van 22,5 U/mg eiwit; het bevatte nog aantoonbare hoeveelheden AtrE en was aanzienlijk verontreinigd met TDH. Het preparaat vertoonde geen PDC-activiteit.

Hoewel zoveel mogelijk gebruik is gemaakt van de stabiliserende buffer kon niet worden voorkomen dat in sommige gevallen, o.a. tijdens de chromatografie, verliezen optraden. De stabiliteit van gedeeltelijk gezuiverde PDH-preparaten wordt blijkbaar mede bepaald door enkele nog onbekende factoren.

8.4 ENKELE EIGENSCHAPPEN VAN HET GEZUIVERD PDH

8.4.1 *Analyse van de producten van de enzymatische omzetting*

De omzetting van fenylaceetaldehyde is onderzocht door deze verbinding gedurende 60 min bij 30° te incuberen met PDH in aanwezigheid van NAD⁺ en een NAD⁺-regenerend systeem (7.2). Na de incubatie werd het reactiemengsel geëxtraheerd en onderzocht d.m.v. dunnelaagchromatografie. Het mengsel bleek geen fenylaceetaldehyde meer te bevatten, maar wel een stof die zich tijdens de chromatografie met de ontwikkelvloeistoffen BEM (fig. 8.4) en EMX als fenylazijnzuur gedroeg.

Voor de vorming van NADH bij de dehydrogenering van fenylaceetaldehyde zijn dezelfde aanwijzingen gevonden als bij de dehydrogenering van tropazuur door TDH (6.4.1). Het absorptie-spectrum van een reactiemengsel met fenylaceetaldehyde, NAD⁺ en PDH vertoonde tijdens de incubatie een daling van de absorptie bij 260 nm en de specifieke stijging van de absorptie bij 340 nm.

8.4.2 *Stoichiometrie van de reactie*

Bij dit experiment werd de hoeveelheid NADH bepaald die werd gevormd bij de volledige omzetting van een beperkte hoeveelheid substraat. Aangezien de reactie onder normale omstandigheden van de activiteitsbepaling (2.9.3) kwantitatief verloopt, waren hiervoor bijzondere voorzorgen – zoals hoge pH bij het analoge experiment met het TDH – niet nodig. Bij de omzetting van 0,08 resp. 0,16 en 0,32 μ mol fenylaceetaldehyde werd een toename van de absorptie bij 340 nm waargenomen, die overeenkomt met de productie van 0,08 resp. 0,16 en 0,32 μ mol NADH (fig. 8.5).

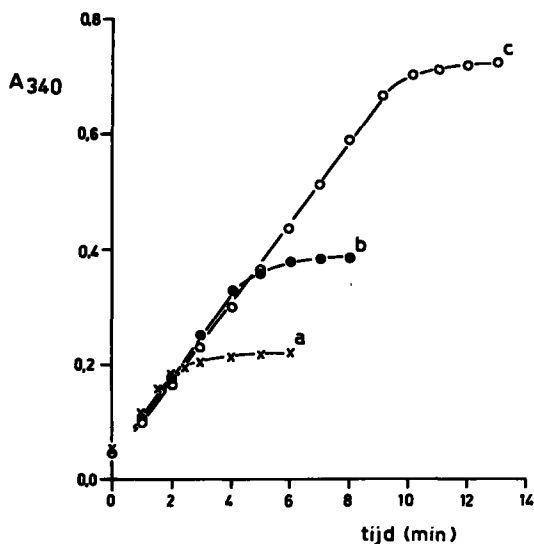
8.4.3 *Het pH-optimum*

De pH-afhankelijkheid van de activiteit van PDH is weergegeven in fig. 8.6, curve a.

De waargenomen activiteit van het PDH nam bij oplopende pH toe en had een relatief maximum bij pH 9,0, dat werd gevolgd door een snelle toename boven pH 10,0. Het bleek dat toename van de absorptie bij 340 nm bij hoge pH een gevolg was van een spontane reactie van fenylaceetaldehyde (aldol-condensatie?), waarbij absorberende producten werden gevormd (fig. 8.6, curve b). Na een correctie voor deze niet-enzymatische omzetting van fenylaceetaldehyde bleek pH 9,0 ook

Fig. 8.5

Invloed van de substraat-concentratie op de vorming van NADH



Fenylaceetaldehyde werd geïncubeerd met 0,8 mM NAD^+ en 0,035 U PDH in 3 ml 33 mM K-fosfaat pH 9,0. Voor 0,08 μmol , 0,16 μmol en 0,32 μmol fenylaceetaldehyde bedroeg de totale absorptie-stijging bij 340 nm 0,165 (curve a) resp. 0,335 (curve b) en 0,67 (curve c).

het absolute pH-optimum te zijn (fig. 8.6, curve c). Vanwege de spontane reactie van fenylaceetaldehyde kon de pH-afhankelijkheid van de activiteit boven pH 10,0 niet nauwkeurig worden bepaald.

8.4.4 Specificiteit van PDH

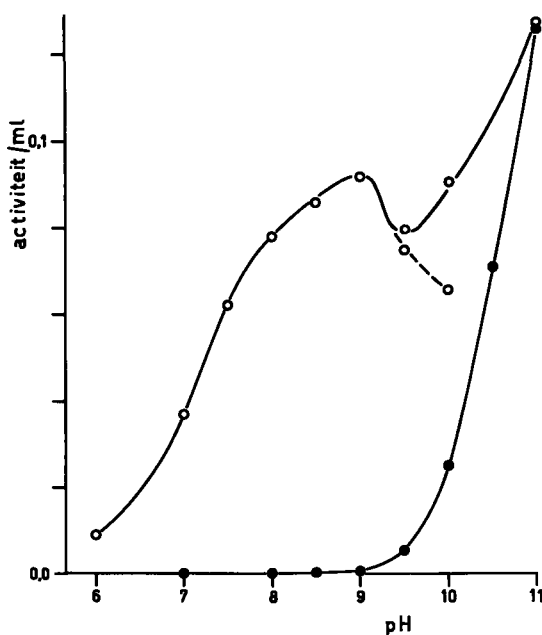
Substraat-specificiteit

Evenals de enzymen AtrE en TDH vertoont ook dit enzym uit de stofwisselingsketen van atropine en tropazuur een grote substraat-specificiteit. In tabel 6.5.2 is een overzicht gegeven van de geschiktheid van een aantal verbindingen als substraat voor het PDH. Benzaldehyde, benzaldehyde-derivaten en 2-fenylpropanal vertonen bij pH 9,0 een grote spontane absorptie-stijging. Deze stoffen zijn daarom onderzocht bij pH 8,0 en vergeleken met fenylaceetaldehyde bij deze pH.

Van de verbindingen uit de tabel 6.5.2 wordt uitsluitend fenylaceetaldehyde o.i.v. het TDH gedehydrogeneerd. Zelfs verbindingen, die een grote structurele overeenkomst bezitten met fenylaceetaldehyde zijn als substraat ongeschikt: 2-fenylpropanal, de methyl ester van pma en ook benzaldehyde en benzaldehyde-derivaten vertonen geen activiteit met PDH.

Fig. 8.6

De invloed van de pH op de activiteit van PDH



De activiteit van de PDH werd van pH 6–9 gemeten in 33 mM K–fosfaat buffer; van pH 9–11 in 33 mM K–carbonaat buffer. Bij pH 9,0 werd in beide buffers vrijwel dezelfde activiteit gemeten.

- a. o — o waargenomen enzymatische absorptie–toename
- b. ● — ● spontane absorptie–toename
- c. o - - - o correctie voor spontane absorptie–toename

Fenylpyrodruivenzuur waaruit door decarboxylering fenylaceetaldehyde kan ontstaan, geeft bij incubatie met NAD^+ en het gezuiverde enzym of met ongezuiverd extract geen aanleiding tot productie van NADH. Aceetaldehyde wordt niet gedehydrogeneerd.

De affiniteit van het PDH voor het substraat is groot. Verlaging van de fenylaceetaldehyde–concentratie van 0,12 mM tot 0,03 mM heeft geen invloed op de snelheid van de NADH–productie (zie fig. 8.5). De snelheid van de NADH–productie is constant totdat het substraat vrijwel volledig is omgezet.

Uit de curve voor de omzetting van 0,03 mM fenylaceetaldehyde kan een schatting worden gemaakt voor de K_m van het PDH. Als de concentratie van het substraat beneden 6×10^{-6} M daalt, vermindert de omzettingssnelheid merkbaar. Hieruit moet worden afgeleid dat de K_m voor fenylaceetaldehyde kleiner is dan 6×10^{-6} M.

De geschiktheid van enkele verbindingen als waterstof-acceptor.

De cofactor NADP^+ is niet in staat NAD^+ als waterstof-acceptor te vervangen. Onder standaard-condities (2.11.2) bedraagt de activiteit met NADP^+ minder dan 1% van de activiteit met NAD^+ . Dichloorfenol-indofenol-natrium (DCIP) en kaliumferricyanide zijn evenmin geschikt als waterstof-acceptor voor het gezuiverde enzym (6.4).

In gezuiverde preparaten werd in afwezigheid van NAD^+ wel een reductie van DCIP waargenomen. Deze verandering bleek niet het gevolg te zijn van een door PDH gekatalyseerde omzetting van fenylaceetaldehyde met DCIP als waterstof-acceptor, maar kon volledig worden toegeschreven aan een reactie van DCIP met mercapto-ethanol, dat voor het stabiliseren van PDH aan het reactiemengsel was toegevoegd.

8.5 OMZETTING VAN PMA DOOR EEN GEDEELTELIJK GEZUIVERD PDH-PREPARAAT

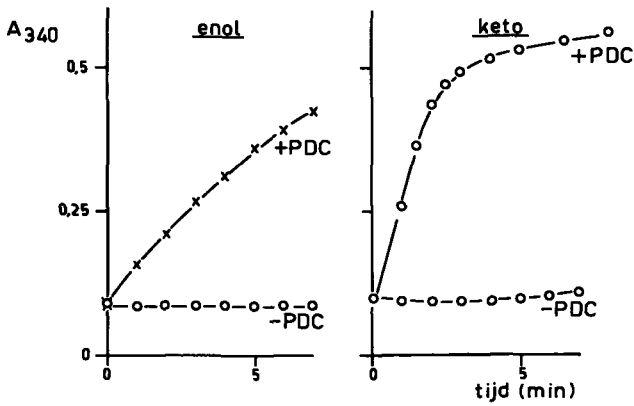
Het door TDH uit tropazuur gevormde pma is geen geschikt substraat voor het PDH. Bij het leveren van het bewijs voor deze stelling doen zich echter een aantal complicaties voor. A priori lijkt het moeilijk om dit te bewijzen, vanwege de geringe stabiliteit van de keto-vorm van het pma; deze verbinding wordt in waterig milieu bij neutrale pH in korte tijd (halveringstijd 90 sec) vrijwel volledig omgezet in fenylaceetaldehyde, het substraat voor PDH. Men zou dus verwachten dat bij incubatie van keto-pma met NAD^+ en PDH altijd een zekere hoeveelheid NADH wordt gevormd. Dit werd echter niet waargenomen bij de incubatie van $0,3 \mu\text{mol}$ keto-pma met NADH en een gedeeltelijk gezuiverd PDH-preparaat (fig. 8.7).

Het achterwege blijven van de NADH-productie kon worden verklaard op grond van het betrekkelijk hoge TDH-gehalte in het PDH-preparaat. Dit had tot gevolg dat het NADH, dat bij dehydrogenering van fenylaceetaldehyde o.i.v. het PDH werd gevormd, weer werd verbruikt bij de terugreactie van keto-pma tot tropazuur o.i.v. TDH (fig. 8.8). Blijkbaar verloopt deze terugreactie snel, vergeleken met de spontane decarboxylering van pma en de omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur, zodat gedurende de eerste minuten de NADH-concentratie niet merkbaar toeneemt. Volgens dit mechanisme worden in de eerste fase van de reactie uit twee moleculen keto-pma één molecuul tropazuur en één molecuul fenylazijnzuur gevormd. Na verloop van tijd neemt de absorptie langzaam toe. Dit zal worden veroorzaakt doordat het door TDH ingestelde evenwicht naar rechts verschuift door spontane decarboxylering van pma. Deze reactie verloopt echter langzaam vanwege de lage evenwichts-concentratie van pma bij pH 7,5.

Deze verklaring werd experimenteel bevestigd door het effect van PDC. In aanwezigheid van het PDC (fig. 8.7, rechter curve) wordt de omzetting van keto-pma in fenylaceetaldehyde snel t.o.v. de enzymatische dehydrogenering van fenylaceet-

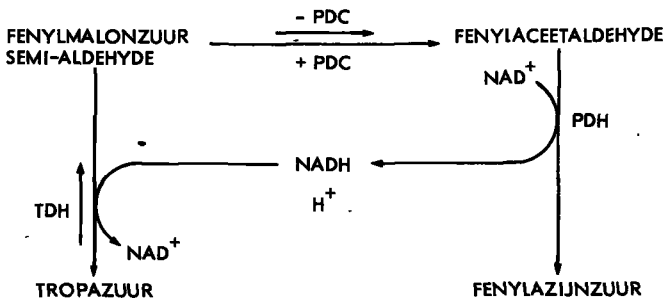
Fig. 8.7

Invloed van PDC op de omzetting van pma door PDH



In 3 ml 0,2 M tris-HCl pH 7,5 werden geïncubeerd: 0,3 μ mol enol-pma of keto-pma, 2,4 μ mol NAD^+ en 0,3 ml van een PDH-preparaat, dat onder de omstandigheden van dit experiment met fenylacetaldehyde als substraat een absorptie-stijging gaf van 0,190 per min. Het PDH-preparaat bevatte per ml 0,26 U TDH. De experimenten +PDC werden in aanwezigheid van 0,8 U PDC uitgevoerd.

Fig. 8.8



aldehyde. Hierdoor is het keto-pma – het substraat voor de terugreactie – grotendeels ontleed op het moment dat nog maar een gedeelte van het fenylaceetaldehyde is gedehydrogeneerd en dus slechts weinig NADH is gevormd. Hierdoor wordt slechts een gedeelte van pma voor de terugreactie gebruikt, wat resulteert in een aanzienlijke NADH-productie.

Een soortgelijk experiment met enol-pma (fig. 8.7, linker curve) is in overeenstemming met de eigenschappen, die voor enol-pma in hoofdstuk 6 zijn beschreven. In afwezigheid van PDC is de hoeveelheid fenylaceetaldehyde, die spontaan wordt gevormd, aanzienlijk minder dan in het experiment met keto-pma, zodat hierbij zeker de dehydrogenering o.i.v. PDH en de hydrogenering o.i.v. TDH snel zijn vergeleken met de hoeveelheid keto-pma die per min ontleedt. Toevoegen van PDC heeft hier veel minder effect dan in het experiment met keto-pma, omdat er niet meer keto-pma gedecarboxyleerd kan worden dan er spontaan uit enol-pma wordt gevormd. Uit het effect dat PDC heeft op de NADH-productie bij incubatie van pma, NAD^+ , PDH en TDH kan dus worden geconcludeerd, dat de decarboxylering aan de dehydrogenering vooraf gaat en dat het pma zeer slecht of in het geheel niet door het PDH wordt gedehydrogeneerd.

8.6 DIVERSEN

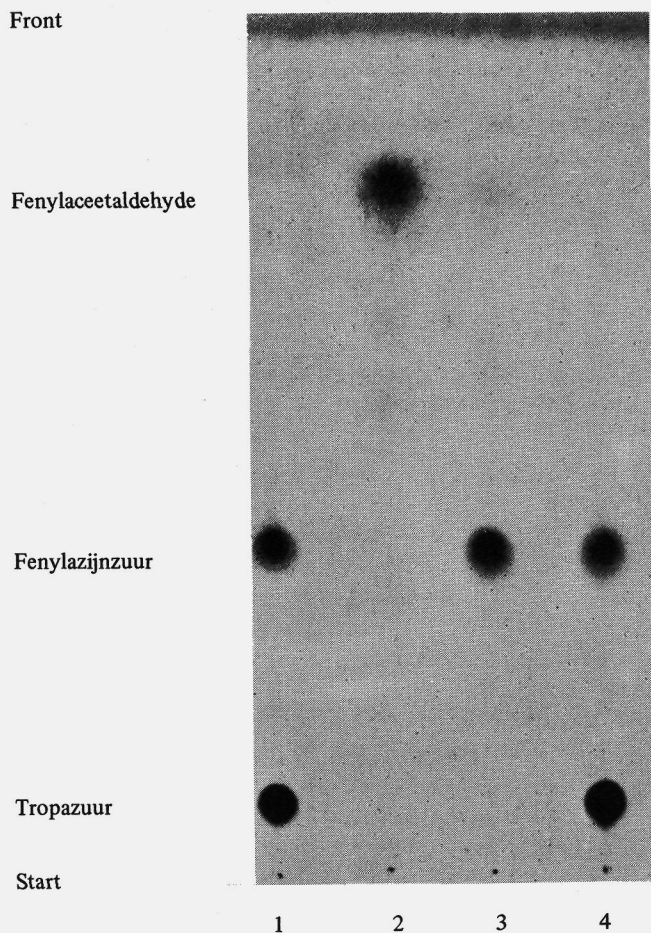
De enzymatische dehydrogenering van fenylaceetaldehyde is in vitro een irreversibel proces; bij incubatie van fenylazijnzuur met PDH en NADH werd ook bij lagere pH (pH 7,0) een daling van de absorptie niet waargenomen. Het product fenylazijnzuur gedraagt zich niet als remmer voor het PDH; in aanwezigheid van 1 mM van deze verbinding verloopt de dehydrogenering ongestoord. De dehydrogenering wordt wel geremd door NADH, waarschijnlijk door competitie met NAD^+ . Deze remming speelt geen rol onder de omstandigheden van de activiteitsbepaling van PDH, zoals blijkt uit het experiment dat in fig. 8.5 is weergegeven. NADH wordt met een constante snelheid geproduceerd, totdat het substraat vrijwel volledig is omgezet.

Het effect van de volgende toevoegingen is onderzocht met een gezuiverd PDH-preparaat, dat was gedialyseerd tegen 10 mM tris-HCl en 100 mM KCl pH 7,0. De dehydrogenering van fenylaceetaldehyde wordt geremd door toevoegen van 0,25 M hydrazine. Het substraat wordt daarbij waarschijnlijk door hydrazine gebonden; hiervan is bij de TDH-bepaling (zie 6.2) gebruik gemaakt. PDH wordt niet geremd of gestimuleerd door toevoegen van 0,1 mM adenosine-difosfaat of adenosine-trifosfaat, of 10 mM K-fosfaat, als de activiteitsbepaling wordt uitgevoerd in een fosfaatvrij incubatie-mengsel. Het is daarom niet waarschijnlijk dat deze dehydrogenering direct aan een fosforylering is gekoppeld.

In een concentratie van 0,5 mM hebben de metaalionen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} en Mn^{2+} geen invloed op de enzym-activiteit. Het enzym is wel gevoelig voor de SH-remmers Cu^{2+} , Hg^{2+} en p-chloormercuribenzoëzuur. Door een preincubatie van twee minuten met 0,05 mM Cu^{2+} , 0,01 mM Hg^{2+} of 0,02 mM p-chloormercuri-

Fig. 8.4

Omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur o.i.v. het PDH.



Fenylaceetaldehyde ($80 \mu\text{mol}$), gezuiverd PDH (3 U), NAD^+ ($10 \mu\text{mol}$) en het NAD^+ -regenererend systeem (fig. 7.4) werden geïncubeerd gedurende 60 min bij 25° in 33 mM K-fosfaatbuffer pH 8,0.

Het incubatiemengsel werd aangezuurd, geëxtraheerd en het extract werd m.b.v. dunnelaagchromatografie onderzocht met het elutiemiddel BEM; de detectie werd met $\text{H}_2\text{SO}_4\text{--HNO}_3$ uitgevoerd (2.7).

1. tropazuur + fenylazijnzuur
2. niet geïncubeerd
3. geïncubeerd gedurende 60 min 25°
4. tropazuur + fenylazijnzuur

benzoëzuur wordt PDH volledig geremd. Joodazijnzuur, joodaceetamide en Na-arseniet hebben in een concentratie van 1 mM geen effect.

Van een PDH-preparaat dat 0,18 mg eiwit/ml bevatte en dat was gedialyseerd tegen de stabiliserende buffer (8.2) werd de stabiliteit bij verschillende temperaturen en pH's onderzocht. De activiteit ging volledig verloren bij een behandeling bij 55° gedurende 30 min. Een dergelijke incubatie bij 40° had geen inactivering tot gevolg.

De invloed van de pH op de stabiliteit van het PDH werd onderzocht door het enzym gedurende 30 min bij 25° te preincuberen waarna de activiteit op de normale wijze (2.9.3) werd bepaald. Het enzym werd door incubatie bij pH < 5 en bij pH > 9 geheel geïnactiveerd.

8.7 DISCUSSIE

Het fenylaceetaldehyde-dehydrogenase blijkt de omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur te versnellen. Het enzym gebruikt NAD^+ als waterstof-acceptor, die tijdens de dehydrogenering in stoechiometrische hoeveelheden wordt gereduceerd. De spontane inactivering en het verlies van enzym-activiteit bij dialyse heeft aanvankelijk de bestudering en de zuivering van het PDH bemoeilijkt. Door gebruik van een speciaal samengestelde buffer waarin, behalve 50 mM K-fosfaat pH 7,0 en EDTA, ook mercapto-ethanol, Na-laurylsulfaat en fenylaceetaldehyde was toegevoegd, werd een kwantitatieve bepaling en gedeeltelijke zuivering mogelijk.

Door Gunsalus (1953 a) zijn in *Pseudomonas putida* (ATCC 12633) twee benzaldehyde-dehydrogenases aangetoond, die vanwege hun instabiliteit niet konden worden gezuiverd. Stachow (1967) heeft de stabiliteit van het NADP^+ -afhankelijke benzaldehyde-dehydrogenase nader onderzocht. Het enzym verliest activiteit tijdens dialyse tegen verdunde buffer-oplossingen (10 mM), maar kan tegen inactivering worden beschermd door 0,1 M K^+ , Rb^+ of NH_4^+ -ionen. Stachow neemt aan, dat bij hogere ionensterkte irreversibele conformatie-veranderingen worden voorkomen. Het benzaldehyde-dehydrogenase kon door Stachow worden gezuiverd in aanwezigheid van 0,2 M KCl en 1 mM dithiothreitol.

Het stabiliserend effect van Na-laurylsulfaat (SDS) op het PDH kan wellicht in verband worden gebracht met de resultaten van Chilson (1965), die het effect van SDS op het appelzuur-dehydrogenase uit varkenshart-mitochondriën heeft onderzocht. Hierbij bleek dat in verdunde oplossing inactieve enzym-aggregaten worden gevormd met een grote sedimentatie-constante. In aanwezigheid van SDS treedt deze aggregatie niet op en blijft de enzym-activiteit constant.

Uit de vergelijking van aromatische aldehyden als substraat voor de enzymatische dehydrogenering o.i.v. PDH blijkt, dat het enzym zeer specifiek is voor fenylaceetaldehyde. Bovendien kan uit de lage waarde voor de Michaelis-constante worden afgeleid, dat het enzym een grote affiniteit heeft voor dit substraat. Deze eigenschappen van het PDH doen vermoeden, dat het hier een enzym betreft dat speciaal voor de dehydrogenering van fenylaceetaldehyde in *Pseudomonas* aanwezig is.

HOOFDSTUK 9

DE STOFWISSELINGSKETEN VAN ATROPINE

9.1 INLEIDING

Met de tropazuur-enzymen zijn de biokatalysatoren geïdentificeerd, die in *Pseudomonas* PMBL-1 betrokken zijn bij de afbraak van atropine tot fenylazijnzuur. In de voorafgaande hoofdstukken zijn de enzymen afzonderlijk beschreven; in dit hoofdstuk zal de onderlinge relatie van deze enzymen in het atropine-metabolisme aan de orde komen. Vervolgens wordt ingegaan op de mogelijkheid dat — behalve deze — nog andere enzymen speciaal voor het atropine-metabolisme worden geïnduceerd. Hierna worden de aanwijzingen besproken, dat in een aantal andere *Pseudomonas*-stammen, die in staat zijn atropine te metaboliseren, de afbraak van deze verbinding volgens hetzelfde stofwisselingsschema verloopt als in PMBL-1. Tenslotte worden de tropazuur-enzymen vergeleken met de enzymen, die in *Pseudomonas putida* ATCC 12633 betrokken zijn bij de afbraak van amandelzuur.

9.2 VOLGORDE, WAARIN DE TROPAZUUR-ENZYMEN WERKZAAM ZIJN

De stofwisselingsketen van atropine tot fenylazijnzuur, zoals deze is weergegeven in bijlage I, is gebaseerd op de substraat-specificiteit van de tropazuur-enzymen en op het onderzoek van de producten die o.i.v. deze enzymen worden gevormd.

Men kan zich de vraag stellen of dezelfde enzymen niet in een andere volgorde werkzaam zouden kunnen zijn met hetzelfde eindresultaat. De relevante mogelijkheden hiervoor worden in fig. 9.1 schematisch weergegeven.

Een eerste mogelijkheid is dat atropine als substraat dient voor het TDH, waarbij de tropine ester van pma wordt gevormd. Deze verbinding zou door het AtrE kunnen worden omgezet in pma en tropine. Deze mogelijkheid kan worden uitgesloten, aangezien atropine niet door het TDH wordt gedehydrogeneerd. Dit werd aangetoond in het volgende experiment: In een gezuiverd TDH-preparaat werd de nog aanwezige AtrE-activiteit volledig geremd door een behandeling met het organofosfaat Soman (pinacolyl methylfosfonofluoridaat). De dehydrogenerende werking van dit preparaat op atropine, tropazuur en de methyl ester van tropazuur werd onderzocht en vergeleken met die van hetzelfde preparaat, dat niet was behandeld met Soman. De resultaten, weergegeven in tabel 9.2, tonen duidelijk aan dat atropine, noch de methyl ester van tropazuur door het TDH wordt gedehydrogeneerd. Hiermee worden tevens andere reactieschema's, waarin de tropine ester van pma als eerste product wordt gevormd, uitgesloten.

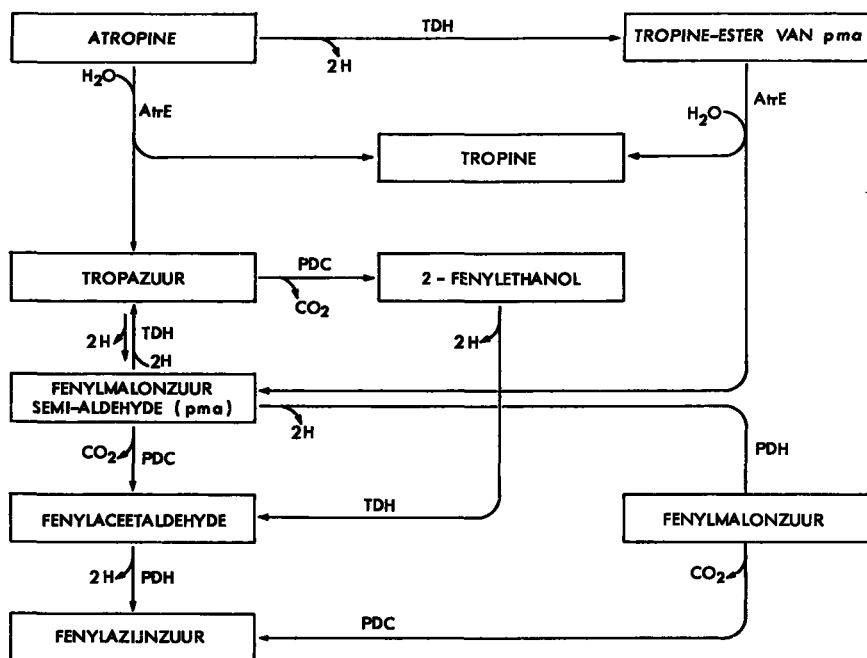


Fig. 9.1 Alternatieve mogelijkheden voor de afbraak van atropine tot fenylazijnzuur o.i.v. de tropazuur-enzymen.

Een tweede mogelijkheid, nl. dat de afbraak van tropazuur in fenylaceetaldehyde verloopt via 2-fenylethanol, kan eveneens worden uitgesloten. Bij een incubatie van tropazuur met PDC of met een extract van PMBL-1, gekweekt met tropazuur wordt geen CO₂ gevormd (7.2); bovendien is 2-fenylethanol geen substraat voor de enzymen TDH en PDH. Deze stof is evenmin geschikt als koolstofbron (4.2), terwijl in bacteriën, die worden gekweekt met een mengsel van barnsteenzuur en 2-fenylethanol, de tropazuur-enzymen niet worden geïnduceerd.

Een derde mogelijkheid is een omzetting van pma door PDH in fenylmalonzuur, gevolgd door een ontleding o.i.v. PDC. Deze laatste reactie verloopt echter niet; met dunnelaagchromatografie is gebleken dat PDC niet in staat is de omzetting van fenylmalonzuur in fenylazijnzuur te versnellen (7.5). Verder geeft groei van PMBL-1 in aanwezigheid van fenylmalonzuur geen aanleiding tot inductie van de tropazuur-enzymen (10.3). Ook kon worden aangetoond (8.5), dat het pma niet wordt gedehydrogeeneerd door het PDH.

Op grond van deze gegevens kan worden geconcludeerd, dat de afbraak van atropine onder invloed van de tropazuur-enzymen verloopt volgens het schema in bijlage I, en niet volgens een alternatieve stofwisselingsketen.

Tabel 9.2

Substraat	Tropazuur-dehydrogenase-activiteit (U/ml)	
	zonder Soman	0,2 mM Soman
Atropine	0,205	0,005
Methyl ester van tropazuur	0,120	0,000
Tropazuur	0,565	0,615

Atropine, de methyl ester van tropazuur en tropazuur als substraat voor TDH in aan- en afwezigheid van 0,2 mM Soman; TDH-activiteit bepaald volgens 2.9.3.

9.3 ANDERE ENZYMEN, DIE WELLICHT BETROKKEN ZIJN BIJ DE AFBRAAK VAN ATROPINE

9.3.1 *Afbraak van tropine*

Het ligt voor de hand te veronderstellen, dat ook tropine, dat bij de hydrolyse van atropine o.i.v. het AtrE ontstaat, door de bacterie zal worden benut. Een duidelijke aanwijzing hiervoor vormt het feit, dat tropine geschikt is als koolstofbron voor PMBL-1 en dat tropine niet wordt opgehoopt bij groei met atropine als koolstofbron, zoals bleek uit onderzoek van het medium met dunnelaagchromatografie.

Door Niemer en Bucherer (1961) werd gevonden dat in *Corynebacterium "belladonnae"* tropine wordt gedehydrogeneerd door een enzym, dat NAD^+ als waterstofacceptor gebruikt. Aangetoond werd dat ook PMBL-1, die gekweekt is met atropine, een tropine-dehydrogenase bevat dat echter de waterstof overdraagt aan de co-factor NADP^+ .

Dit enzym is echter afwezig in een extract van *Pseudomonas* PMBL-1, gekweekt met tropazuur als koolstofbron. De synthese van het enzym wordt blijkbaar onafhankelijk van de synthese van de tropazuur-enzymen gereguleerd en is daarom niet nader onderzocht.

9.3.2 *Opname van substraten uit het medium*

De opname van verbindingen uit het medium door bacteriën is vaak een actief proces; in een aantal gevallen zijn de hierbij betrokken transporteiwitten aangetoond o.a. voor de opname van sulfaat en van suikers. Voor een recent overzicht wordt verwezen naar Pardee (1968).

De aanwezigheid van een transportsysteem kan o.a. worden bestudeerd door de radioactief gemerkte verbinding aan de bacterie aan te bieden en de opname van radioactiviteit te meten. Dit is voor *Pseudomonas* uitgevoerd met ^3H -tropazuur, zoals in 2.8 beschreven is. Bacteriën van het wilde type PMBL-1, die gekweekt

Tabel 9.3
Opname van tritium door PMBL-1 en mutanten

Pseudomonas	Ontbrekend enzym	Medium	³ H-opname
PMBL-1	--	A	3090 dpm
PMBL-1	--	B	210 dpm
PMBL-1	--	A	3090 dpm
PMBL-174	TDH	A	0 dpm
PMBL-176	TDH	A	575 dpm
PMBL-194	PDC	A	137 dpm
PMBL-192	PDC	A	805 dpm

Bacteriën (1 ml; $A_{700} = 1,5$), gekweekt in synthetisch medium met 0,1% tropazuur + 0,1% fenylglyoxylzuur (A) of met 0,1% fenylazijnzuur (B), werden gedurende 60 min met $1,6 \times 10^5$ dpm ³H-tropazuur geïncubeerd. De opgenomen radioactiviteit is gecorrigeerd voor de opname door de niet-geïncubeerde cultuur (250–350 dpm) en is een gemiddelde van twee experimenten.

waren in aanwezigheid van tropazuur (Ps-tropazuur) of fenylazijnzuur (Ps-fenylazijnzuur), werden geïncubeerd met ³H-tropazuur; na 60 min werd de opgenomen radioactiviteit bepaald (tabel 9.3). Ps-tropazuur bleek tritium op te nemen; Ps-fenylazijnzuur niet. Dit zou kunnen betekenen, dat Ps-tropazuur in het bezit is van een transportsysteem voor tropazuur, maar het verschil zou ook verklaard kunnen worden uit het feit, dat Ps-tropazuur geadapteerd was aan tropazuur en deze stof derhalve kon opnemen en omzetten in andere producten, en dat daardoor de radioactiviteit werd opgehoopt.

Om dit te onderscheiden werd de opname van ³H-tropazuur gemeten in vier mutanten, waarin t.g.v. een mutagene behandeling geen TDH of PDC meer kon worden gesynthetiseerd (10.7). Omdat in deze mutanten slechts één van de tropazuur-enzymen ontbrak, was het redelijk te veronderstellen, dat de aangebrachte schade beperkt was en leek het onwaarschijnlijk dat in ieder van deze mutanten ook de informatie van het eventuele transporteiwit verloren was gegaan.

Deze mutanten werden gekweekt in synthetisch medium met 0,1% tropazuur en 0,1% fenylglyoxylzuur als koolstofbron en werden daarna geïncubeerd met ³H-tropazuur. Zoals uit tabel 9.3 blijkt, namen deze mutanten slechts 0–25% van de hoeveelheid tritium op die door het wilde type onder vergelijkbare omstandigheden werd opgenomen. Deze resultaten maken het onwaarschijnlijk, dat bij de opname van tropazuur in *Pseudomonas* een speciaal transportsysteem is betrokken. Aangezien de opname van tritium door het wilde type samengaat met een intacte stofwis-

selingsketen, is deze opname hoogstwaarschijnlijk een gevolg van het vermogen tropazuur te metaboliseren.

De mogelijkheid, dat de bacterie over een opnamesysteem voor atropine beschikt, is hiermee niet uitgesloten. Soortgelijke experimenten met ^3H -atropine konden echter niet worden uitgevoerd wegens de onvoldoende radio-chemische zuiverheid van het beschikbare ^3H -atropine-preparaat.

9.3.3 Racemase

Wanneer *Pseudomonas* met 0,05% ($\pm$) - atropine als enige koolstofbron wordt gekweekt, groeit de cultuur tot ongeveer dezelfde dichtheid als met 0,05% (–) - atropine. Kennelijk worden beide optische isomeren gemetaboliseerd. Aangezien het AtrE een sterke voorkeur vertoont voor (–) - atropine lijkt het niet onmogelijk dat een atropine-racemase betrokken is bij het metabolisme van de (+) - isomeer. Dit enzym zou dan aanwezig moeten zijn in een extract van Ps-atropine, maar niet meer in een vrijwel zuiver AtrE-preparaat. Men verwacht dan, dat de hydrolyse van (+) - atropine in aanwezigheid van het extract sneller verloopt dan o.i.v. het gezuiverde AtrE. Een dergelijk verschil wordt echter niet waargenomen, zodat het niet aannemelijk is, dat een racemiserend enzym bij de afbraak van de (+) - enantio-meer is betrokken.

Hoewel de bacterie zowel (–) - als (+) - tropazuur als enige koolstofbron kan benutten, lijkt het niet nodig de aanwezigheid van een tropazuur-racemase te veronderstellen, aangezien het TDH geen duidelijke voorkeur vertoont voor één van de stereo-isomeren van tropazuur. Dit is opmerkelijk, omdat het enzym overigens een grote substraat-specificiteit bezit (6.4).

Deze tegenstrijdigheid zou slechts schijnbaar zijn, indien tropazuur tijdens de enzymbepaling (bij pH 9,5) spontaan racemiseert. Dit werd onderzocht m.b.v. een polarimeter; de spontane racemisering blijkt echter zo langzaam te verlopen, dat deze reactie de dehydrogenering van (+) - tropazuur door een stereo-specifiek TDH niet kan verklaren. Het zou ook mogelijk zijn, dat er wel een tropazuur-racemase bestaat, waarvan nog een hoeveelheid in de gebruikte TDH-preparaten aanwezig is. Dit kon niet bij voorbaat worden uitgesloten, omdat het TDH volgens de beschreven procedure (6.3) niet volledig wordt gezuiverd. Daarom werd met een polarimeter onderzocht of de racemisering van (+) - en (–) - tropazuur wordt versneld door gezuiverd TDH; aanwijzingen hiervoor werden echter niet verkregen. Het is daarom onwaarschijnlijk, dat een racemase betrokken is bij de dehydrogenering van (+) - of (–) - tropazuur.

De discrepantie tussen de waargenomen substraat-specificiteit en het gebrek aan stereo-specificiteit blijft derhalve onverklaard.

9.4 AFBRAAK VAN ATROPINE IN ANDERE PSEUDOMONACEAE

Rörsch heeft behalve PMBL-1 nog een achttal micro-organismen uit grond

Tabel 9.4

Specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen in een aantal *Pseudomonas*-stammen

Stam	Geclassificeerd als:	AtrE	TDH	PDC	PDH
PMBL-1	putida biotype A	2,2	2,2	1,9	0,22
PMBL-2001	putida biotype A	± 0,6	± 1,0	0,77	± 0,3
PMBL-4001		3,6	0,73	0,57	0,09
PMBL-4501	putida biotype A	1,3	1,1	1,1	0,15
PMBL-5001		3,0	0,65	0,51	0,10
PMBL-5501	putida biotype B	± 1,6	0,35	0,25	0,07
PMBL-6001		3,0	0,67	0,50	0,13
PMBL-6501		± 1,1	0,51	0,75	0,07
PMBL-7001	fluorescens	2,3	0,82	1,0	± 0,4

De stammen werden gekweekt in synthetisch medium met 0,1% tropazuur en 0,1% barnsteen-zuur. De specifieke activiteit is bepaald in het extract volgens 2.10 en opgegeven als het aantal eenheden enzym per mg eiwit.

geïsoleerd, die in staat zijn atropine te metaboliseren. Deze stammen zijn in de verzameling van het Medisch Biologisch Laboratorium opgenomen onder de PMBL-nummers 2001, 4001, 4501, 5001, 5501, 6001, 6501 en 7001.

Vijf van deze stammen zijn door Wensinck (1969) geëclassificeerd als *Pseudomonas putida* of *fluorescens*, de overige stammen kunnen niet bij de bestaande typen worden ingedeeld, maar zijn wel *Pseudomonaceae*.

De stammen zijn gekweekt in synthetisch medium met tropazuur en onderzocht op de aanwezigheid van AtrE-, TDH-, PDC-, en PDH-activiteit. In de tabel 9.4 worden de specifieke activiteiten vermeld; de totale activiteiten lopen hiermee parallel.

De stammen PMBL-4001, PMBL-5001 en PMBL-6001 bevatten relatief veel AtrE-activiteit. Deze esterase-activiteit wordt, evenals die van de overige stammen, geremd door organofosfaten. De grootste TDH- en PDC-activiteit wordt gevonden in PMBL-1; bij de beoordeling hiervan dient men er echter rekening mee te houden, dat de reactie-omstandigheden van de enzymbepaling zijn uitgewerkt voor de enzymen van PMBL-1 en misschien sub-optimaal zijn voor de overeenkomstige enzymen uit de andere stammen. Het is daarom niet zeker dat PMBL-1 inderdaad de de grootste hoeveelheid of het meest actieve TDH en PDC bezit.

9.5 RELATIE MET DE AFBRAAK VAN AMANDELZUUR EN FENYLPYRO-DRUIVENZUUR

Door Stanier e.a. (1953) is een *Pseudomonas putida* biotype A (ATCC 12633) geïsoleerd, die in staat is te groeien met *amandelzuur* als enige koolstofbron. De afbraak van amandelzuur in deze bacterie is opgehelderd door Stanier (1953), Gunsalus (1953 a en b), Hegeman (1966), Kennedy (1968) en hun medewerkers. De stofwisselingsketen van amandelzuur en de daarbij betrokken amandelzuur—enzymen is weergegeven in fig. 9.5. Het afbraakpatroon vertoont een opvallende overeenkomst met het metabolisme van tropazuur in PMBL—1. Men kan zich afvragen of wellicht één of meer van de tropazuur—enzymen identiek zijn met overeenkomstige enzymen uit het amandelzuur—metabolisme.

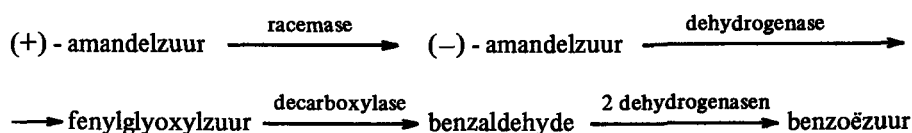


Fig. 9.5 Stofwisselingsketen van amandelzuur in *Pseudomonas* ATCC 12633

Dit is in een vergelijkend onderzoek nagegaan. *Pseudomonas* ATCC 12633 werd welwillend ter beschikking gesteld door Dr. G.D. Hegeman (Berkeley, Californië) en opgenomen in de MBL stammenverzameling onder nummer PA—20, welke notatie verder zal worden gebruikt.

De *Pseudomonaceae* PA—20 en PMBL—1 zijn niet identiek, omdat PA—20 niet groeit met tropazuur als enige koolstofbron en PMBL—1 amandelzuur niet kan metaboliseren (4.2). Bovendien is aangetoond, dat geen van de tropazuur—enzymen identiek is aan één van de amandelzuur—enzymen: amandelzuur, fenyglyoxylzuur en benzaldehyde worden niet omgezet door het gezuiverde TDH, PDC of PDH (zie hoofdstuk 6, 7 en 8). In een extract van *Ps*-tropazuur zijn de amandelzuur—enzymen afwezig, terwijl *Pseudomonas* PA—20, gekweekt met amandelzuur als enige koolstofbron, geen der tropazuur—enzymen bevat.

Het verschil tussen de stofwisselingsketen van amandelzuur en die van tropazuur betreft niet alleen de substraat—specificiteit van de betreffende enzymen. Zo is een equivalent voor het AtrE in het extract van PA—20 niet aanwezig; de hydrolyse van de methyl ester van amandelzuur wordt nl. door het extract niet versneld. In tegenstelling tot PMBL—1 bevat PA—20 wel een racemase. Het amandelzuur—dehydrogenase is stereo—specifiek voor (+) - amandelzuur en is aan een deeltjes—fractie gebonden, zodat het door centrifugeren kan worden neergeslagen. Het enzym gebruikt in vitro de kleurstof 2,6—dichloorfenol—indofenol als waterstof—acceptor en draagt de waterstof niet over op de co—factor NAD⁺. Het fenyglyoxylzuur—decarboxylase heeft thiaminepyrofosfaat als co—factor nodig, terwijl bij de dehydro-

genering van benzaldehyde in PA-20 twee dehydrogenases betrokken zijn met resp. NAD^+ en NADP^+ als co-factoren. Het is duidelijk dat PA-20 en PMBL-1 geheel verschillende enzym-systemen bezitten voor de afbraak van amandelzuur resp. tropazuur.

Hoewel PMBL-1 niet in staat is amandelzuur af te breken, wordt *fenylglyoxylzuur* wel gemetaboliseerd; in PMBL-1 verloopt deze afbraak analoog met de fenylglyoxylzuur-afbraak in PA-20; de verbinding wordt door decarboxylering en dehydrogenering omgezet in benzoëzuur (zie bijlage I). De vorming van benzaldehyde o.i.v. een extract van *Pseudomonas* gekweekt met fenylglyoxylzuur is aangetoond met dunnelaagchromatografie. Ook is in het extract het betreffende decarboxylase aangetoond. Dit enzym is niet identiek aan het PDC, want een mutatie, die het verlies van het PDC tot gevolg heeft, heeft geen effect op het vermogen fenylglyoxylzuur als koolstofbron te benutten (10.7). Omgekeerd blijkt PMBL-132, waarin het fenylglyoxylzuur-decarboxylase ontbreekt en die derhalve niet meer in staat is fenylglyoxylzuur te metaboliseren, nog in het bezit te zijn van PDC en ongestoord te kunnen groeien met tropazuur als enige koolstofbron.

In PMBL-1 wordt benzaldehyde omgezet in benzoëzuur o.i.v. een benzaldehyde-dehydrogenase, dat NADP^+ als waterstofacceptor nodig heeft en NAD^+ hiervoor niet kan gebruiken; dit enzym onderscheidt zich hierdoor van het PDH, dat uitsluitend NAD^+ als co-factor gebruikt. Uit de kinetiek van de volledige omzetting van benzaldehyde bij lage substraat-concentratie kan worden afgeleid, dat het enzym een zeer lage Michaelis constante heeft voor dit substraat; wat dit betreft lijkt het enzym op het PDH. Van de lage Michaelis constante is dankbaar gebruik gemaakt voor het uitwerken van een bepaling van het fenylglyoxylzuur-decarboxylase; door de grote affiniteit van het benzaldehyde-dehydrogenase voor benzaldehyde is dit enzym in staat kleine hoeveelheden benzaldehyde vrijwel volledig te dehydrogeneren onder productie van een stoichiometrische hoeveelheid NADH; deze enzymatische omzetting kan daardoor gebruikt worden voor de kwantitatieve bepaling van het benzaldehyde, dat uit fenylglyoxylzuur o.i.v. het fenylglyoxylzuur-decarboxylase wordt geproduceerd.

Zoals door Seidenberg (1962) en Asahawa (1968) is aangetoond, wordt in *Achromobacter eurydice* *fenylpyrodruivenzuur* gedecarboxyleerd tot fenylaceetaldehyde en vervolgens geoxydeerd tot fenylazijnzuur. Het decarboxylase heeft thiaminepyrofosfaat en Mg^{2+} nodig als co-factoren. Dit enzym is betrekkelijk a-specifiek en verzorgt ook de decarboxylering van indool-derivaten. De dehydrogenering van fenylaceetaldehyde naar fenylazijnzuur is door deze auteurs niet verder onderzocht.

Aangezien in dit organisme, evenals in PMBL-1, fenylaceetaldehyde ontstaat door een enzymatische decarboxylering, is nagegaan of er in PMBL-1 een relatie bestaat tussen de afbraak van fenylpyrodruivenzuur en de omzetting van tropazuur.

Fenylpyrodruivenzuur wordt echter niet door PDC gedecarboxyleerd (7.5); bovendien blijkt, dat in mutanten van PMBL-1, waarin het PDC ontbreekt, het metabolisme van fenylpyrodruivenzuur niet is gestoord. Kennelijk is het PDC niet bij het metabolisme van fenylpyrodruivenzuur betrokken.

Uit deze gegevens blijkt, dat PMBL-1 beschikt over verschillende enzymen voor de afbraak van tropazuur, fenylglyoxylzuur en fenylpyrodruivenzuur. Deze gegevens, vooral met betrekking tot de enzymen fenylglyoxylzuur-decarboxylase en het benzaldehyde-dehydrogenase zijn van groot nut geweest bij de bestudering van de regulering van de synthese van de tropazuur-enzymen die in het volgende hoofdstuk zal worden beschreven.

HOOFDSTUK 10

REGULERING VAN DE SYNTHESE VAN DE TROPАЗUUR-ENZYMEN

10.1 INLEIDING

In de inleiding van dit proefschrift is de verwachting uitgesproken, dat de enzymen die in *Pseudomonas* speciaal betrokken zijn bij het metabolisme van tropazuur, wellicht gebruikt zouden kunnen worden voor de bestudering van de regulering van de eiwit- en enzym synthese. Als eerste voorwaarde voor een dergelijke studie werd aan deze enzymen gesteld dat zij — evenals het atropine-esterase — zouden worden gereguleerd door inductie.

Vrijwel tegelijk met het verkrijgen van de eerste aanwijzingen voor de enzymen TDH, PDC en PDH werd het duidelijk, dat deze enzymen inderdaad aan de gestelde voorwaarden voldeden. Evenals het AtrE waren ook deze enzymen aanwezig in PMBL-1, gekweekt met atropine of tropazuur en afwezig in PMBL-1 gekweekt met tropine of fenylazijnzuur als koolstofbron. Om deze reden zijn de enzymen, betrokken bij de afbraak van tropine en fenylazijnzuur in dit verband niet interessant en is het onderzoek tot de enzymologie en inductie van de vier tropazuur-enzymen beperkt.

In het algemeen spreekt men van een induceerbaar enzym, wanneer de synthese van dat enzym bepaald wordt door de aanwezigheid van (een) bepaalde verbinding(en) in het medium. Zo'n verbinding wordt inductor (Eng. inducer) genoemd. In afwezigheid van de inductor wordt zeer weinig van het betreffende enzym gesynthetiseerd en slechts het zgn. „basale enzym-niveau” in stand gehouden. Bacteriën, gekweekt in aanwezigheid van een inductor bevatten een „geïnduceerd niveau” van het enzym, dat wel 2000—4000 maal hoger kan zijn dan het basale enzym-niveau.

Afhankelijk van de relatie tussen de inductor en het geïnduceerde enzym onderscheidt men:

- a. inductie door het substraat of door een verbinding, waaruit in de stofwisselingsketen het substraat van het enzym ontstaat;
- b. inductie door het product van de enzym-reactie of door een stof die uit dit product gevormd wordt. Deze inductie komt tot stand doordat een kleine hoeveelheid substraat o.i.v. het basale niveau in het product wordt omgezet. Omdat voor de omzetting van de inductor het geïnduceerde enzym niet noodzakelijk is, noemt men deze inductie *gratuit*;
- c. inductie door een verbinding die niet in de betreffende stofwisselingsketen voorkomt of in het geheel niet kan worden gemetaboliseerd. Ook dit wordt aangeduid met *gratuite* inductie.

Bij een regulering van enzym-synthese door inductie komt het gedeelte van het bacterie-chromosoom, dat de informatie voor het betreffende enzym draagt, het zgn. structurele gen, in afwezigheid van de inductor niet tot expressie. Men stelt zich voor dat de cel voor deze regulering gebruik maakt van een eiwit, de zgn. repressor, die een speciale affiniteit heeft voor het gedeelte van het chromosoom, dat nauw verbonden is met het structurele gen en dat operator wordt genoemd. In afwezigheid van de inductor hecht de repressor zich aan de operator, waardoor het structurele gen niet tot expressie kan komen. In aanwezigheid van de inductor wordt een complex gevormd tussen de inductor en de repressor. Hierdoor wordt de repressor zodanig veranderd dat deze niet meer door de operator wordt gebonden en de blokkade voor de enzym-synthese wordt opgeheven.

Voor de inductie van meer dan één enzym kan men de volgende inductiepatronen onderscheiden:

Gecoördineerde inductie

Hierbij induceert één verbinding door déblokkade van één operator de synthese van meer dan één enzym. Dit is slechts mogelijk, indien de operator en de structurele genen voor de betreffende enzymen aaneengesloten op het chromosoom zijn gelegen en een zgn. operon vormen.

Parallel-inductie

Hierbij induceert één verbinding door déblokkade van meer dan één operator de synthese van meer dan één enzym. Ieder structureel gen heeft hierbij een eigen operator. Deze vorm van regulering komt ook voor bij structurele genen, die op het chromosoom zeer dicht bij elkaar gelegen zijn en is dan experimenteel moeilijk te onderscheiden van gecoördineerde inductie.

Opeenvolgende inductie

Bij een opeenvolgende inductie induceert één verbinding slechts één enzym en wel het enzym dat de omzetting van deze stof katalyseert. Men spreekt van opeenvolgend geïnduceerde enzymen als het volgende enzym wordt geïnduceerd door het product van het voorafgaande enzym.

Omtrent de aanduiding van de verschillende inductie-typen bestaat in de literatuur enige verwarring. Vaak wordt het onderscheid tussen parallel-inductie en gecoördineerde inductie niet gemaakt; met 'sequential induction' wordt ook wel het snel na elkaar verschijnen van de producten van één operon aangeduid. Deze termen zullen uitsluitend in de boven beschreven betekenis worden gebruikt.

In dit hoofdstuk wordt een studie beschreven van de regulering van de synthese van de tropazuur-enzymen. Hierin wordt getracht de achtergronden van het inductie-proces, de inductie-specificiteit en de aard van de werkelijke inductor(en) op te helderen. Allereerst wordt aangetoond, dat aan het verschijnen van de enzym-activiteit in de bacteriën *de novo* eiwitsynthese ten grondslag ligt en niet de activering van inactieve voorstadia.

Vervolgens wordt een onderzoek besproken, waarin voor een aantal verbindingen

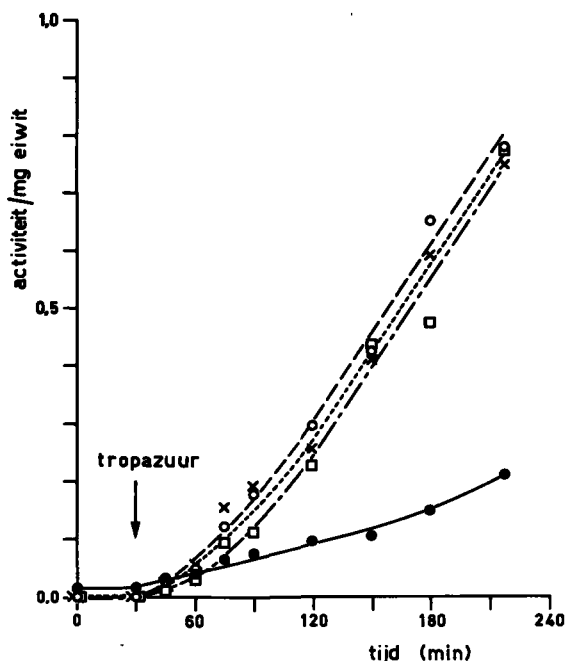
is nagegaan of de aanwezigheid in het kweekmedium de synthese van de tropazuur—enzymen tot gevolg heeft. Uit de resultaten mag worden afgeleid dat de enzymen niet opeenvolgend worden geïnduceerd. Hierna worden de experimenten besproken, waarin de enzym—productie in PMBL—1 en in een aantal PMBL—mutanten is vergeleken. Deze hebben geleid tot de conclusie dat atropine en tropazuur niet als zodanig door het regulerend systeem worden herkend, maar eerst moeten worden omgezet in fenylacetaldehyde.

Het hoofdstuk wordt besloten met een discussie, waarin dieper op verschillende aspecten van de inductie van de tropazuur—enzymen wordt ingegaan.

10.2 KINETIEK VAN DE INDUCTIE; HET EFFECT VAN CHLOOR-AMFENICOL

De kinetiek van de inductie van de tropazuur—enzymen is bestudeerd door tropazuur toe te voegen aan een niet—geïnduceerde cultuur van *Pseudomonas* en

fig. 10.1 Inductie van de tropazuur—enzymen in PMBL—1



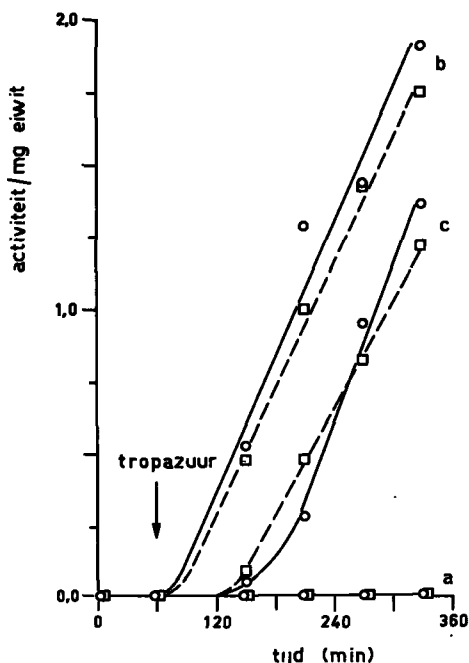
Tropazuur werd op tijd $t = 30$ min toegevoegd aan een niet—geïnduceerde cultuur in de logaritmische groeifase. Op verschillende tijden werden monsters genomen en in het extract de specifieke activiteit (U/mg eiwit) bepaald van het AtrE (x - x), TDH (o - o), PDC (□ - □) en en PDH (● - ●).

hierna het enzymgehalte als een functie van de tijd te meten. Als maat voor het enzymgehalte werd de specifieke activiteit in het bacterie-extract gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in fig. 10.1. Het blijkt dat na toevoegen van tropazuur de specifieke activiteit van de vier enzymen gedurende 3½ uur voortdurend toeneemt. De relatieve toename van de PDH-activiteit gedurende deze periode is aanzienlijk minder dan die van de overige drie enzymen, maar er blijken geen duidelijke verschillen te bestaan in het tijdstip, waarop de specifieke activiteit van de enzymen begint toe te nemen.

Chlooramfenicol is een veel gebruikte reversibele remmer van de eiwitsynthese in bacteriën. Teneinde na te gaan of voor de inductie van de tropazuur-enzymen eiwitsynthese noodzakelijk is, werd het effect van dit antibioticum op de kinetiek van de inductie bestudeerd.

Aan een niet-geïnduceerde *Pseudomonas*-cultuur in de logaritmische groeifase werd op het aangegeven tijdstip tropazuur en chlooramfenicol toegevoegd; vervol-

fig. 10.2 Effect van chlooramfenicol op de inductie van TDH en PDC



Aan drie identieke culturen (a, b en c) van PMBL-1, die werden gekweekt met 0,2% barnsteenzuur, werd op tijd $t = 60$ 0,1% tropazuur toegevoegd (cultuur b) of 0,1% tropazuur + 10^{-4} M chlooramfenicol (a en c). Op tijd $t = 120$ werd uit cultuur c het chlooramfenicol verwijderd. TDH (o - o); PDC ($\square$ - $\square$).

gens werd de inductie van het TDH en PDC bepaald. Als controle diende een identieke cultuur, waaraan uitsluitend tropazuur werd toegevoegd. De resultaten zijn weergegeven in fig. 10.2. Hieruit blijkt, dat in aanwezigheid van chlooramfenicol de enzymen niet worden geïnduceerd. Verwijdert men na één uur het chlooramfenicol door de cultuur te centrifugeren en de cellen op te nemen in een medium met tropazuur maar zonder chlooramfenicol, dan treedt alsnog inductie op. In dezelfde proefopstelling werd ook de inductie van het AtrE en het PDH bestudeerd, waarbij soortgelijke resultaten werden verkregen. Blijkbaar wordt de inductie van de tropazuur-enzymen geremd door chlooramfenicol en is deze remming reversibel. Hieruit kan worden geconcludeerd, dat voor de inductie *de novo* eiwitsynthese noodzakelijk is en dat de verhoging van de specifieke activiteit geen gevolg is van de activering van reeds aanwezige inactieve voorstadia.

10.3 DE SPECIFICITEIT VAN INDUCTIE VAN DE TROPAZUUR-ENZYMEN

Van een aantal stoffen is de geschiktheid onderzocht om de inductie van de tropazuur-enzymen in PMBL-1 te bewerkstelligen. Hiervoor werden de bacteriën gekweekt in synthetisch medium met 0,1% barnsteenzuur als koolstofbron, waaraan 0,025% van één van de betreffende verbindingen was toegevoegd. Ook hier werd als maat voor het inducerend vermogen van deze stoffen de specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen in het extract gebruikt. Als algemene koolstofbron werd barnsteenzuur gekozen, nadat bij inleidende experimenten was gebleken, dat de inductie van de enzymen door 0,2% barnsteenzuur niet wordt onderdrukt. Dit medium heeft het voordeel dat hiermee ook het inducerend vermogen kan worden getest van verbindingen, die door *Pseudomonas* niet als koolstofbron kunnen worden gebruikt. Met 0,025% van de verschillende verbindingen, is de inductie waar deze optreedt, niet maximaal. Deze lage concentratie werd echter gebruikt, omdat hierbij ook de inductie door verbindingen kon worden onderzocht, die in hoge concentraties toxisch zijn, zoals bijv. fenylaceetaldehyde en benzaldehyde. De resultaten zijn weergegeven in tabel 10.3. Van de verbindingen die als koolstofbron kunnen worden gebruikt, geeft behalve atropine en tropazuur ook fenylglyoxylzuur aanleiding tot de inductie van de tropazuur-enzymen. Fenylaceetaldehyde en benzaldehyde doen dit in mindere mate.

Van de verbindingen die niet als enige koolstofbron kunnen fungeren, induceren 2-fenylpropanal en p-dimethylamino-benzaldehyde; een zeer zwakke inductie treedt op met 2-fenylpropionzuur, 3-fenylmelkzuur. 3-fenyl-allyl alcohol, benzyl alcohol en epoxystyrol. De overige verbindingen induceren niet. In tabel 10.3 ontbreekt pma; deze verbinding is wel onderzocht, bleek te voldoen als koolstofbron en aanleiding te geven tot inductie van de tropazuur-enzymen. Wegens de instabiliteit van deze stof (zie 6.7) is het echter niet mogelijk na te gaan of dit aan het pma zelf moet worden toegeschreven of aan het decarboxyleringsproduct fenylaceetaldehyde.

Inductie- specificiteit van de tropazuur-enzymen

Verbinding (0,025%)	*	Tabel 10.3 0,1% barnsteenzuur				Tabel 10.4 0,005% barnsteenzuur			
		AtrE	TDH	PDC	PDH	AtrE	TDH	PDC	PDH
atropine	*	1,61	0,64	0,45	0,22	2,14	0,90	1,17	0,34
tropine	*	0,01	0,01	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,01
tropazuur	*	1,67	0,71	0,59	0,35	2,03	0,78	0,72	0,31
fenylacetaldehyde	*	0,31	0,55	0,54	0,20	1,47	0,32	0,68	0,22
fenylmalonzuur	*	0,05	0,01	0,01	0,02	0,10	0,02	0,00	0,02
fenylazijnzuur	*	0,04	0,01	0,02	0,03	0,06	0,02	0,03	0,03
homatropine	*	0,07	0,00	0,00	0,01	0,12	0,00	0,00	0,01
amandelzuur	*	0,04	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
fenylglyoxylzuur	*	1,09	0,34	0,39	0,16	2,15	0,60	0,50	0,45
benzaldehyde	*	0,30	0,16	0,18	0,05	2,35	0,48	0,74	0,29
benzoëzuur	*	0,01	0,00	0,00	0,01	0,10	0,00	0,01	0,01
2-fenylacrylzuur		0,01	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
2-hydroxy-2-fenyl- propionzuur		0,07	0,00	0,01	0,00	—	—	—	—
2-fenylpropionzuur		0,20	0,03	0,06	0,03	—	—	—	—
3-fenylmelkzuur		0,29	0,06	0,07	0,03	—	—	—	—
fenylpyrroldruivenzuur	*	0,14	0,02	0,02	0,03	0,62	0,11	0,10	0,06
3-fenylacrylzuur		0,00	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
3-fenoxypionzuur		0,05	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
fenoxiazijnzuur		0,03	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
o-hydroxyfenylazijnzuur	*	0,03	0,00	0,00	0,01	—	0,01	—	0,01
m-hydroxyfenylazijnzuur	*	0,02	0,00	0,00	0,01	0,03	0,00	0,00	0,01
p-hydroxyfenylazijnzuur	*	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
3,4-dihydroxyfenyl- azijnzuur		0,05	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
2-fenylpropanal		1,20	0,34	0,67	0,13	—	—	—	—
3-fenylpropanal		—	—	—	—	—	—	—	—
o-chloorbenzaldehyde		—	—	—	—	—	—	—	—
m-hydroxybenzaldehyde		—	—	—	—	—	—	—	—
p-nitrobenzaldehyde		—	—	—	—	—	—	—	—
p-dimethylamino- benzaldehyde		2,07	0,98	2,23	0,18	—	—	—	—
3-methoxy-4-hydroxy- benzaldehyde	*	0,07	0,01	0,01	0,01	0,26	0,02	0,03	0,03
3-hydroxy-4-methoxy- benzaldehyde		0,04	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
2-fenylpropanol		0,01	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
3-fenylallyl-alcohol		0,21	0,07	0,08	0,04	—	—	—	—
2-fenylethanol		0,08	0,01	0,01	0,01	—	—	—	—
benzylalcohol		0,31	0,05	0,08	0,04	—	—	—	—
epoxystyrol		0,37	0,05	0,14	0,05	—	—	—	—
p-isopropyl-tolueen		0,01	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—
fenylalanine	*	0,08	0,00	0,00	0,02	0,20	0,02	0,00	0,06
tyrosine	*	0,02	0,00	0,00	0,02	—	0,00	0,00	0,04
valine	*	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,01
wijnsteenzuur		0,01	0,00	0,00	0,01	—	—	—	—

De specifieke activiteit (U/mg eiwit) van de tropazuur-enzymen in het extract van bacteriën, gekweekt met 0,025% van de betreffende verbinding + 0,1% barnsteenzuur, resp. 0,005% barnsteenzuur.

* Deze verbindingen zijn geschikt als enige koolstofbron te fungeren.

— = geen groei na 40 uur.

Van de verbindingen die als koolstofbron kunnen worden gebruikt, is de inductie onderzocht in synthetisch medium met 0,025% van deze verbindingen en 0,005% barnsteenzuur (tabel 10.4). Onder deze omstandigheden wordt in het algemeen een sterkere inductie waargenomen, speciaal bij culturen met benzaldehyde. Ook fenylpyrodruivenzuur blijkt nu enige inductie teweeg te brengen. De overige verbindingen die in het vorige experiment geen inductie veroorzaakten, blijken ook in dit experiment de tropazuur-enzymen niet te induceren.

De inductie van de enzymen is ook onderzocht in een synthetisch medium met 0,2% atropine, tropazuur, tropine of benzoëzuur (tabel 10.5). In de cultuur met atropine en tropazuur leidt dit tot een hoger enzymgehalte dan met lagere concentraties van deze verbindingen wordt bereikt. Bij vergelijking van de enzym-niveau's in de geïnduceerde bacteriën met die in de niet-geïnduceerde bacteriën blijkt, dat de specifieke activiteit van het AtrE, TDH en PDC t.g.v. inductie met een factor 150-400 toeneemt, terwijl de inductie slechts tot een 20 maal hogere enzymatische dehydrogenering van fenylaceetaldehyde leidt.

Tabel 10.5
Inductie van de tropazuur-enzymen in PMBL-1

KOOLSTOFBRON	SPECIFIEKE ACTIVITEIT			
	AtrE	TDH	PDC	PDH
atropine	3,40	1,10	1,80	0.355
tropazuur	2,85	1,10	1,50	0,345
benzoëzuur	0,03	0,004	0,005	0,020
tropine	0,01	0,004	0,003	0,019

Specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen (U/mg eiwit) in het extract van PMBL-1, gekweekt in synthetisch medium met 0,2% koolstofbron.

10.4 GRATUITE INDUCTIE DOOR TROPAZUUR EN FENYLACEET-ALDEHYDE

Gezien het uiteenlopende karakter van de stoffen die in staat zijn de cel tot productie van de tropazuur-enzymen aan te zetten, lijkt het inductie-proces minder specifiek dan aanvankelijk werd vermoed. Het is zelfs moeilijk een structurele overeenkomst in deze verbindingen aan te geven, die begrijpelijk kan maken dat juist deze stoffen uit tabel 10.3 inductie veroorzaken, terwijl de vele andere - op tropazuur gelijkende - verbindingen daartoe niet in staat zijn.

In dit gebrek aan verwantschap tussen de stoffen, die wel tot inductie aanleiding geven, zou men een aanwijzing kunnen zien, dat sommige inducerende verbindingen

niet als zodanig de inductie verzorgen, maar hiertoe eerst moeten worden omgezet in een van de andere inducerende verbindingen. Hierdoor zou het aantal werkelijk inducerende verbindingen veel kleiner zijn en de onderlinge overeenkomst wellicht groter dan de gegevens uit tabel 10.3 suggereren.

Een dergelijk mechanisme zou de verklaring kunnen zijn voor de gratuite inductie van de tropazuur—enzymen, die met sommige afbraakproducten van atropine is waargenomen. Zoals blijkt uit tabel 10.3 geeft de aanwezigheid van tropazuur in het medium aanleiding tot de inductie van het AtrE. Deze inductie is gratuiet, aangezien AtrE niet betrokken is bij het metabolisme van tropazuur. Dit volgt uit de waarneming dat de mutant PMBL—33, waarin het AtrE door een mutatie is verloren gegaan, normaal kan groeien met tropazuur als koolstofbron.

Nog opvallender is het feit dat met fenylaceetaldehyde de synthese van AtrE, TDH en PDC kan worden geïnduceerd, terwijl geen van deze enzymen nodig is voor de afbraak van deze stof. Dit blijkt uit de afwezigheid van deze enzymen in een extract van PMBL—1, gekweekt met fenylazijnzuur, het directe omzettingsproduct van fenylaceetaldehyde in de stofwisselingsketen; voor deze omzetting is uitsluitend het PDH nodig. Bovendien is waargenomen dat mutanten, waarin het AtrE, het TDH of het PDC afwezig zijn, nog in staat zijn fenylaceetaldehyde te metaboliseren. Deze resultaten zouden er op kunnen wijzen dat de inductie in de cultuur met atropine of tropazuur als koolstofbron niet door deze stoffen zelf wordt teweeggebracht, maar door een van de afbraakproducten van tropazuur, bijv. fenylaceetaldehyde.

Uit het feit, dat fenylaceetaldehyde in staat is drie enzymen gratuiet te induceren, kunnen conclusies worden getrokken met betrekking tot het inductie—patroon. Indien nl. onder invloed van een gratuite inductor meer dan één enzym wordt geïnduceerd — terwijl de omzettingsproducten van deze verbinding niet tot inductie in staat zijn — kan dit proces niet op opeenvolgende inductie berusten.

De inductie door fenylaceetaldehyde zal dus parallel of gecoördineerd moeten verlopen.

10.5 GRATUITE INDUCTIE DOOR FENYLGLYOXYLZUUR EN BENZALDEHYDE

Fenylglyoxylzuur en benzaldehyde voldoen beide als koolstofbron voor *Pseudomonas* PMBL—1 en induceren daarbij de tropazuur—enzymen. Hierbij rijst de vraag of deze enzymen worden geïnduceerd ten behoeve van de afbraak van deze verbindingen of dat ook deze inductie gratuiet is. De volgende argumenten pleiten voor gratuite inductie:

1. De enzymen PDC en PDH zijn niet in staat fenylglyoxylzuur resp. benzaldehyde om te zetten. Dit is gebleken bij het onderzoek naar de substraat—specificiteit van deze enzymen (7.5 en 8.4).
2. In extracten van PMBL—1, gekweekt met fenylglyoxylzuur als koolstofbron kan

een fenylglyoxylzuur-decarboxylase worden aangetoond en een NADP^+ – afhankelijk benzaldehyde-dehydrogenase (9.5). Deze enzymen zijn afwezig in PMBL–1, gekweekt met tropazuur als koolstofbron.

Uit deze gegevens blijkt dat fenylglyoxylzuur en benzaldehyde niet door de tropazuur-enzymen worden omgezet, maar dat deze afbraak geschiedt d.m.v. enzymen die speciaal ten behoeve hiervan in PMBL–1 worden geïnduceerd. Op grond hiervan mag worden aangenomen, dat de inductie van de tropazuur-enzymen ook in dit geval gratis is. Dit bevestigt de conclusie dat de synthese van deze enzymen niet d.m.v. opeenvolgende inductie wordt gereguleerd.

10.6 INDUCTIE IN MUTANTEN VAN PMBL–1

Zoals in 10.4 werd besproken, leek het niet onmogelijk dat atropine en tropazuur niet als zodanig in staat zijn de tropazuur-enzymen te induceren, maar dat de eigenlijke inductie geschiedt door een omzettingsproduct van tropazuur. Daarom is getracht meer informatie te verkrijgen over de aard van de werkelijke inductor door de inductie te onderzoeken in mutanten, waarin atropine niet meer tot fenylazijnzuur kon worden afgebroken en waarvan precies bekend was welke omzetting in het atropine-metabolisme was gestoord.

Mutanten met een storing in het metabolisme van atropine tot fenylazijnzuur werden verkregen m.b.v. de methode beschreven in 2.5; hierbij werd geselecteerd voor mutanten met het fenotype $\text{Atr}^- \text{Tro}^+ \text{Pac}^+$ of $\text{Atr}^- \text{Tro}^- \text{Tpn}^+ \text{Pac}^+$. Op de volgende manieren is onderzocht door welk enzym-defect deze mutanten niet meer in staat waren atropine af te breken.

De mutanten met het fenotype $\text{Atr}^- \text{Tro}^+ \text{Tpn}^+$ werden gekweekt in synthetisch medium met 0,2% tropazuur als koolstofbron. In extracten van deze bacteriën bleek het AtrE afwezig, terwijl het TDH, PDC en PDH hierin wel konden worden aangetoond. Dit is in overeenstemming met het fenotype.

De mutanten met het fenotype $\text{Atr}^- \text{Tro}^- \text{Tpn}^+ \text{Pac}^+$ werden gekweekt in synthetisch medium met 0,2% barnsteenzuur (als koolstofbron) en 0,1% tropazuur. In de 33 mutanten van dit type, die werden onderzocht, bleek het niveau van de vier tropazuur-enzymen minder dan 10% te bedragen van het niveau in PMBL–1, die onder dezelfde omstandigheden was gekweekt. Dit zou het gevolg kunnen zijn van een storing in het inductie-mechanisme, maar ook van het verlies van de genetische informatie voor de tropazuur-enzymen in ieder van deze mutanten. De mogelijkheid dat dit resultaat veroorzaakt zou worden door een storing in het vermogen tropazuur op te nemen, leek zeer onwaarschijnlijk aangezien deze verbinding niet actief wordt opgenomen (9.3). Door gebruik te maken van het gratis karakter van de inductie door fenylglyoxylzuur was het mogelijk de inductie in deze mutanten te bepalen in een medium, waarin de inductor tevens koolstofbron was. Dit experiment, waarin de 33 mutanten werden gekweekt met 0,2% fenylglyoxylzuur en vervolgens het niveau van de tropazuur-enzymen werd bepaald, had een verrassend resultaat.

Terwijl met tropazuur in alle mutanten de inductie van de vier enzymen vrijwel geheel achterwege bleef, bleek met fenylglyoxylzuur in meer dan de helft van de mutanten de inductie van drie van de vier enzymen even goed te verlopen als in het wilde type. In deze mutanten was slechts het TDH of het PDC afwezig; mutanten waarin uitsluitend het PDH ontbrak, werden bij dit onderzoek niet gevonden.

Om het verschil van inductie in een medium met tropazuur of met fenylglyoxylzuur nader te onderzoeken is in een aantal van deze mutanten de inductie o.i.v. atropine, tropazuur, fenylaceetaldehyde, fenylglyoxylzuur of benzaldehyde vergeleken met de inductie door deze stoffen in het wilde type onder vergelijkbare omstandigheden. Hiertoe werden de bacteriën gekweekt in een synthetisch medium met 0,05% barnsteenzuur, waaraan 0,025% van de betreffende verbinding was toegevoegd. De inductie in deze culturen is weergegeven in tabel 10.6.

In het wilde type geven al deze verbindingen aanleiding tot inductie. In de mutant waarin het AtrE ontbreekt, blijkt atropine vrijwel niet meer te induceren, maar met tropazuur en fenylaceetaldehyde worden de overige enzymen normaal geïnduceerd. Een soortgelijk resultaat werd verkregen met twee andere mutanten, waarin het AtrE ontbrak.

Tabel 10.6
Inductie in PMBL-1 en mutanten

	PMBL-1 (wilde type)				PMBL-42 (AtrE ⁻)			
	AtrE	TDH	PDC	PDH	AtrE	TDH	PDC	PDH
atropine	0,89	1,38	1,28	0,38	0,00	0,09	0,21	0,03
tropazuur	0,88	1,59	1,55	0,41	0,00	1,02	1,91	0,06
fenylaceetaldehyde	0,45	0,44	0,42	0,13	0,00	0,57	1,27	0,05
fenylglyoxylzuur	1,59	0,85	0,69	0,23	—	—	—	—
benzaldehyde	0,51	1,00	1,18	0,32	—	—	—	—
	PMBL-174 (TDH ⁻)				PMBL-194 (PDC ⁻)			
	AtrE	TDH	PDC	PDH	AtrE	TDH	PDC	PDH
atropine	0,00	0,00	0,00	0,01	0,12	0,05	0,00	0,04
tropazuur	0,00	0,00	0,00	0,01	0,21	0,08	0,00	0,05
fenylaceetaldehyde	0,30	0,00	0,22	0,11	0,71	1,28	0,00	0,37
fenylglyoxylzuur	0,37	0,00	0,37	0,10	1,75	0,44	0,00	0,24
benzaldehyde	0,74	0,00	0,48	0,17	1,17	0,97	0,00	0,25

Specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen (U/mg eiwit) in het extract van PMBL-1 en PMBL-mutanten, gekweekt in synthetisch medium met 0,05% barnsteenzuur en 0,025% van de onderzochte verbinding.

AtrE⁻ = mutant waarin het AtrE ontbreekt etc.

Hieruit mag men concluderen dat niet atropine, maar tropazuur of één van de afbraakproducten van tropazuur de werkelijke inductor is. In de mutanten waarin het TDH of het PDC ontbreekt, blijken zowel atropine als tropazuur niet of nauwelijks in staat inductie van de tropazuur-enzymen teweeg te brengen. Met fenylaceetaldehyde daarentegen worden de enzymen normaal geïnduceerd, uiteraard met uitzondering van het enzym dat in de betreffende mutant afwezig is. Met een aantal andere mutanten van dit type werden geheel vergelijkbare resultaten verkregen. Bovendien werd het verschil in inductie door tropazuur met de inductie door fenylglyoxylzuur reeds waargenomen bij het hierboven beschreven onderzoek van de Tro⁻ mutanten. Blijkbaar is de inductie door atropine of tropazuur afhankelijk van een intacte stofwisselingsketen tot fenylaceetaldehyde. Omdat fenylaceetaldehyde in PMBL-1 wordt omgezet in fenylazijnzuur, waarvan bekend is dat het de tropazuur-enzymen niet induceert (10.3), komt men tot de conclusie dat fenylaceetaldehyde de werkelijke inductor van de tropazuurenzymen is en dat atropine, tropazuur en pma slechts induceren indien deze verbindingen kunnen worden afgebroken tot fenylaceetaldehyde. Hoewel pma niet rechtstreeks als inductor kon worden onderzocht is deze conclusie ook wat het pma betreft gerechtvaardigd, gezien het feit dat tropazuur niet tot inductie in staat is in een mutant, waarin het PDC ontbreekt.

Een soortgelijk onderzoek van de gratuite inductie door fenylglyoxylzuur en benzaldehyde bracht aan het licht dat alleen benzaldehyde werkzaam is als inductor en fenylglyoxylzuur slechts induceert, indien het wordt omgezet in benzaldehyde. Dit werd aangetoond in een onderzoek waarin de inductie van de tropazuur-enzymen door fenylglyoxylzuur en benzaldehyde in PMBL-1 werd vergeleken met die in de mutant PMBL-132. Deze mutant is niet in staat te groeien met fenylglyoxylzuur, maar wel met benzaldehyde of benzoëzuur als koolstofbron. Enzymologisch onderzoek heeft uitgewezen dat in PMBL-132 het fenylglyoxylzuur-decarboxylase ontbreekt. De resultaten van dit experiment zijn weergegeven in tabel 10.7. In het wilde type worden de tropazuur-enzymen zowel door fenyl-

Tabel 10.7
Inductie in PMBL-1 en PMBL-132

	PMBL-1				PMBL-132			
	AtrE	TDH	PDC	PDH	AtrE	TDH	PDC	PDH
fenylglyoxylzuur	1,09	0,34	0,39	0,16	0,00	0,01	0,00	0,01
benzaldehyde	0,30	0,16	0,18	0,05	0,19	0,08	0,05	0,03

Specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen (U/mg eiwit) in het extract van PMBL-1 en PMBL-132, gekweekt in synthetisch medium met 0,1% barnsteen zuur en 0,025% fenylglyoxylzuur of benzaldehyde. In PMBL-132 ontbreekt het fenylglyoxylzuur-decarboxylase.

glyoxylzuur als door benzaldehyde geïnduceerd; in de mutant induceert slechts benzaldehyde. Hieruit blijkt dat fenylglyoxylzuur zelf niet tot inductie in staat is. Aangezien benzoëzuur — het omzettingsproduct van benzaldehyde — evenmin induceert, is in dit geval benzaldehyde de werkelijke inductor van de tropazuur-enzymen.

Uit de resultaten van dit onderzoek blijkt dat slechts twee van de verbindingen, die door PMBL-1 als koolstofbron kunnen worden gebruikt en die aanleiding geven tot de inductie van deze enzymen, met zekerheid als inductor kunnen worden geïdentificeerd nl. fenylaceetaldehyde en benzaldehyde. Van vier andere verbindingen atropine, tropazuur, pma en fenylglyoxylzuur, kon worden aangetoond dat zij niet zelf als inductor kunnen fungeren, maar slechts inductie teweeg kunnen brengen nadat zij zijn omgezet in fenylaceetaldehyde resp. benzaldehyde. Het is niet onmogelijk dat ook de geringe inductie die met fenylpyrodruivenzuur is gevonden, niet aan de koolstofbron zelf moet worden toegeschreven, maar veroorzaakt wordt door een omzetting in fenylaceetaldehyde. Aangezien er geen mutanten zijn gevonden, die gestoord zijn in het metabolisme van fenylpyrodruivenzuur, kon dit niet nader worden onderzocht.

10.7 OVERZICHT VAN DE GEBRUIKTE MUTANTEN VAN PMBL-1

Mutanten van *Pseudomonas* PMBL-1, waarin t.g.v. de mutagene behandeling slechts één van de tropazuur-enzymen ontbreekt, zijn van groot nut geweest bij het onderzoek naar de stofwisselingsketen en hebben de opheldering van de regulering door product-inductie mogelijk gemaakt. Verschillende van deze mutanten

Tabel 10.8

Inductie van de tropazuur-enzymen in PMBL-1 en mutanten

PMBL	type	AtrE	TDH	PDC	PDH
1	wild	1,10	0,360	0,535	0,200
33	AtrE ⁻	0,00	0,535	0,260	0,155
42	AtrE ⁻	0,00	0,785	1,47	0,060
174	TDH ⁻	1,60	0,000	0,610	0,255
176	TDH ⁻	1,05	0,000	0,390	0,085
192	PDC ⁻	0,55	0,355	0,001	0,150
194	PDC ⁻	1,05	1,19	0,000	0,285

De specifieke activiteit van de tropazuur-enzymen (U/mg eiwit) in extracten van PMBL-1 en mutanten, gekweekt in synthetisch medium met 0,2% fenylglyoxylzuur als koolstofbron en geoogst volgens 2.10.

AtrE⁻ = mutant waarin AtrE ontbreekt.

waren reeds in het begin van dit onderzoek geïsoleerd, maar werden pas als zodanig herkend toen de *gratuïte* inductie door fenylglyoxylzuur werd ontdekt.

Omdat de inductie door fenylglyoxylzuur niet wordt belemmerd door een eventuele storing in het atropine-metabolisme is deze verbinding bijzonder geschikt voor de bestudering van mutanten. Met fenylglyoxylzuur wordt een duidelijke expressie op enzym-niveau verkregen van de genotypische verandering, die in *Pseudomonas*-mutanten ten grondslag ligt aan de verstoring van de afbraak van atropine tot fenylazijnzuur.

In tabel 10.8 is de specifieke activiteit opgenomen van de mutanten, die bij het onderzoek zijn gebruikt. De mutanten werden geïsoleerd zoals beschreven is in 2.5; de bacteriën werden gekweekt volgens 2.10. In verband met de betrèkkelijk hoge frequentie van terug-mutatie voor enkele mutanten ($\pm 1 : 10^7$) werd bij de bepaling van de specifieke activiteit uitgegaan van een cultuur, gekweekt uit een enkele kolonie.

10.8 DISCUSSIE

Uit het inductie-patroon van mutanten van *Pseudomonas* kan worden afgeleid, dat atropine, tropazuur en fenylglyoxylzuur niet als zodanig worden herkend door het reguleringsmechanisme, maar slechts tot inductie aanleiding geven, indien hieruit fenylaceetaldehyde resp. benzaldehyde kan worden gevormd. Dit betekent dat het reguleringsmechanisme van de tropazuur-enzymen een veel grotere specificiteit bezit dan op grond van tabel 10.3 werd verwacht.

Van de onderzochte koolstofbronnen blijken de aromatische aldehyden fenylaceetaldehyde en benzaldehyde te induceren; verder induceren de niet-metaboliseerbare verbindingen 2-fenylpropanal en p-dimethylamino-benzaldehyde. Van de andere derivaten van benzaldehyde, die werden onderzocht, bleek er geen tot inductie in staat. Het probleem dat een aantal structureel zeer verschillende verbindingen de enzymen wel induceren en een grote groep structureel verwante verbindingen niet, is hiermee opgelost.

Zoals in 10.4 reeds is geargumenteed, kan de *gratuïte* inductie door fenylaceetaldehyde van de enzymen AtrE, TDH en PDC niet tot stand komen door opeenvolgende inductie. Derhalve verloopt de inductie van deze enzymen gecoördineerd, parallel of door een combinatie van beide inductiepatronen. Op grond van de beschikbare gegevens kan geen verder onderscheid worden gemaakt.

De inductie door het derde product uit de stofwisselingsketen werpt een licht op het bizarre mechanisme, dat in *Pseudomonas* wordt gebruikt voor de regulering van deze enzymen. Men zou niet bepaald verwachten dat fenylaceetaldehyde de inductor is van o.a. het AtrE en dat atropine noch tropazuur hiertoe in staat zijn. Toch zijn in micro-organismen meer gevallen van inductie door het product aange-toond.

Het is gebleken dat in *Escherichia coli* lactose als zodanig niet in staat is de lactose-enzymen te induceren, maar hiertoe eerst moet worden omgezet in een ander, nog niet geïdentificeerd β -galactoside (Müller-Hill e.a. 1964). In *Aerobacter aerogenes* worden de vier enzymen, betrokken bij de afbraak van L-histidine, geïnduceerd door het product van het eerste enzym (Schlesinger 1965 a en b). In *Pseudomonas putida* geschiedt de inductie van het catechol-oxygenase door het product van dit enzym, terwijl de drie enzymen, die betrokken zijn bij de afbraak van β -carboxy-muconzuur door het eindproduct β -keto-adipinezuur worden geïnduceerd (Ornston 1966).

In een discussie over product-inductie in bacteriën heeft Ornston (1966) deze vorm van inductie vergeleken met de inductie door het substraat. Bij de inductie van een enzym door het substraat wordt de specificiteit van de inductie bepaald door de nauwkeurigheid, waarmee de repressor het inductor-molecuul herkent. Het is hierbij niet uitgesloten, dat een substraat-analoon, dat niet door het betreffende enzym kan worden omgezet, wel een complex kan vormen met de repressor en zo aanleiding geeft tot een doelloze inductie van het enzym. Bij inductie van een enzym door het product wordt de specificiteit van de inductie behalve door de specificiteit van de repressor ook bepaald door de specificiteit van het te induceren enzym, omdat o.i.v. het basaal niveau van dit enzym het product uit het substraat moet worden gevormd. Het substraat-analoon dat niet door het enzym kan worden omgezet, geeft hierbij geen aanleiding tot inductie (ook al zou het product, dat gevormd zou worden indien het substraat-analoon wel zou kunnen worden omgezet, door de repressor worden herkend). Ornston kwam tot de conclusie, dat inductie door het product een meer specifiek proces is dan de inductie door het substraat.

Bij de product-inductie van de tropazuur-enzymen zal een analoon van atropine slechts aanleiding geven tot inductie, indien dit analoon door het AtrE, TDH en PDC kan worden omgezet in fenylacetaldehyde of in een stof die door de repressor voor fenylacetaldehyde wordt aangezien. Hierbij moet worden voldaan aan de specificiteits-voorwaarden van de repressor en van drie specifieke enzymen. Het bizarre regelmechanisme krijgt dan een betekenis: het is een extra voorzorg voor een economische beleidsvoering, waardoor het substraat vooraf door enzymen wordt gecontroleerd, zodat de zekerheid bestaat, dat na de inductie het substraat ook door de geïnduceerde enzymen kan worden afgebroken. Wel dient de product-inductor specifiek tot de betreffende stofwisselingsketen te behoren, omdat anders de enzymen ook worden geïnduceerd als het product langs een andere weg ontstaat.

Inductie door het product kan ook om andere redenen economischer zijn dan inductie door het substraat. Uit tabel 10.5 blijkt, dat de basale dehydrogenering van fenylacetaldehyde duidelijk groter is dan de basale activiteit van de enzymen AtrE, TDH en PDC. Indien dit ook de situatie in vivo reflecteert, kan nog een voordeel van product-inductie boven substraat-inductie worden beredeneerd.

Als door milieu-omstandigheden de omzetting van atropine in fenylacetaldehyde slechts langzaam kan verlopen, is een volledig geïnduceerd niveau van de tropazuur-

enzymen zinloos. Bij inductie door substraat zou aanbod van een relatief hoge concentratie atropine aan niet-geïnduceerde bacteriën aanleiding geven tot een volledig geïnduceerd doch nutteloos hoog niveau van de tropazuur-enzymen. Bij inductie door het product worden onder deze omstandigheden de enzymen echter niet geïnduceerd, aangezien de geringe productie van fenylaceetaldehyde o.i.v. het basaal niveau van het AtrE, TDH en PDC wordt overtroffen door de relatief hoge basale omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur. Dit is een aantrekkelijk mechanisme: onder omstandigheden, waaronder atropine in aanwezigheid van een geïnduceerd niveau van de tropazuur-enzymen toch niet of nauwelijks sneller dan door het basale niveau in fenylaceetaldehyde kan worden omgezet, geeft zelfs een grote hoeveelheid atropine geen aanleiding tot de inductie van de tropazuur-enzymen. Bij de product-inductie wordt daarom niet alleen het substraat vooraf door de enzymen van de stofwisselingsketen gecontroleerd, maar wordt zelfs nagegaan of de snelheid waarmee het substraat kan worden omgezet inductie zinvol maakt. Onafhankelijk van de hoeveelheid substraat, die wordt aangeboden, regelt hier de snelheidsbepalende stap in de omzetting tot de inductor het niveau van inductie. Vanuit regulatorisch standpunt is dit een bijzonder fraai mechanisme.

Uit tabel 10.5 blijkt dat bij de inductie, de toename van de enzym-activiteit t.o.v. het basale niveau veel groter is bij het AtrE, TDH en PDC dan bij het PDH. Als men aanneemt, dat ook dit representatief is voor de verhoudingen tussen de geïnduceerde en niet-geïnduceerde niveaus in vivo, zou de inductie onder niet-beperkte omstandigheden als volgt kunnen verlopen: door het aanbod van atropine aan niet-geïnduceerde bacteriën wordt fenylaceetaldehyde geproduceerd o.i.v. het basale enzymniveau van de drie enzymen. Omdat de PDH-activiteit waarschijnlijk op bepaalde plaatsen in de cel gelocaliseerd is, zal ondanks de hoge basale dehydrogenering van fenylaceetaldehyde de concentratie fenylaceetaldehyde elders in de cel zover toenemen, dat de inductie van de tropazuur-enzymen op gang komt.

Vanwege de verhoudingen tussen de geïnduceerde en niet-geïnduceerde niveaus van de tropazuur-enzymen, wordt de fenylaceetaldehyde-productie t.g.v. de inductie meer vergroot dan de omzetting van fenylaceetaldehyde in fenylazijnzuur, zodat de fenylaceetaldehyde-concentratie stijgt. Dit heeft weer een grotere inductie tot gevolg. Het proces zal auto-katalytisch verlopen zolang andere factoren de inductie of de omzetting van atropine in fenylaceetaldehyde niet beperken. Wellicht vormt het auto-katalytisch effect de verklaring van de vorm van de inductie-curve (fig. 10.1); ondanks speciale voorzorg voor een logaritmisch groeiende cultuur is de curve enigszins concaaf. Een intracellulair toenemende fenylaceetaldehyde-concentratie zou hiervoor verantwoordelijk kunnen zijn.

Vanwege de inductie door het product kan nu ook worden begrepen, waarom Tro⁻ mutanten met een intacte tropine-stofwisseling, waarin na groei in aanwezigheid van fenylglyoxylnzuur het AtrE kan worden aangetoond, niet in staat zijn te

groeien met atropine als enige koolstofbron. Ook in deze mutanten is de inductie van het AtrE gestoord, waardoor de mutanten fenotypisch Atr⁻ zijn.

Samenvattend biedt de inductie door het product de verklaring voor het inductiepatroon in mutanten van PMBL-1 met een storing in het atropine-metabolisme en de verklaring voor de hierboven genoemde waarnemingen. Op theoretische gronden biedt inductie door het product aanzienlijke voordelen boven inductie door het substraat, door een grotere specificiteit van inductie en een controle vooraf of inductie onder de gegeven omstandigheden ook tot grotere omzettingssnelheid zal leiden. Op deze manier biedt inductie door product de mogelijkheid tot een fijnregeling, die met inductie door het substraat niet mogelijk is. Het zou niet verwonderlijk zijn, indien de onderlinge verhouding van de enzym-activiteiten van enzymen, die door dezelfde inductor worden geïnduceerd, in het algemeen een belangrijke rol speelt in een efficiënte regeling van de enzymsynthese.

SAMENVATTING EN NABESCHOUWING

In dit proefschrift is een onderzoek beschreven naar de stofwisselingsketen van atropine in *Pseudomonas PMBL-1*, naar de enzymen die hierbij betrokken zijn en naar de wijze waarop de synthese van deze enzymen wordt gereguleerd. Atropine wordt in de bacterie afgebroken volgens het schema weergegeven in bijlage I. Na hydrolyse van atropine in tropazuur en tropine wordt tropazuur via 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (pma) en fenylaceetaldehyde tot fenylazijnzuur afgebroken.

De rol van fenylazijnzuur in dit metabolisme blijkt ondermeer uit het feit dat PMBL-1 gekweekt met atropine of tropazuur geadapteerd is aan fenylazijnzuur. Bovendien blijken mutanten met een storing in het metabolisme van fenylazijnzuur ook gestoord te zijn in de groei met tropazuur als enige koolstofbron; sommige mutanten zijn echter nog wel in staat tropazuur gedeeltelijk af te breken en een intermediaire verbinding in het medium uit te scheiden, die als fenylazijnzuur is geïdentificeerd.

Bij deze afbraak blijken de volgende enzymen betrokken te zijn: atropine-esterase (AtrE), tropazuur-dehydrogenase (TDH), 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC) en fenylaceetaldehyde-dehydrogenase (PDH); deze enzymen worden de tropazuur-enzymen genoemd.

De hydrolyse van atropine wordt gekatalyseerd door het atropine-esterase; de werking van het esterase is bewezen door het aantonen van de reactie-producten tropine en tropazuur. Er is een methode uitgewerkt waarmee het enzym vrijwel volledig wordt gezuiverd (> 90%). Het enzym blijkt specifiek te zijn voor (–)-atropine en enkele hiermee nauw verwante verbindingen en wordt geremd door organosfosfaten, bv. diisopropyl-fosforofluoridaat (DFP).

De afbraak van tropazuur blijkt te verlopen o.i.v. een NAD^+ -afhankelijk dehydrogenase. Het dehydrogenase is zeer specifiek voor tropazuur. Tijdens de zuivering van het enzym zijn aanwijzingen verkregen, dat de door het enzym gekatalyseerde omzetting in 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde (pma) een evenwichtsreactie is:



De instelling van het evenwicht is zowel door een NAD^+ -afhankelijke dehydrogenering van tropazuur als door een NADH -afhankelijke hydrogenering van pma aangetoond. De evenwichts-constante is bepaald op $\pm 0,30 \times 10^{-12}$ M; het evenwicht ligt sterk aan de kant van tropazuur. Na instelling van het evenwicht wordt een langzame NADH -productie waargenomen, die veroorzaakt wordt door een spontane ontleding van pma.

Terwijl het effect van variatie van de tropazuur-, NAD^+ - en NADH -concentratie op de enzymatische dehydrogenering hiermee kwantitatief kon worden verklaard, was het effect van pma op de instelling van het evenwicht veel geringer dan op grond van de toegevoegde hoeveelheid werd verwacht.

Dit was de aanleiding de keto-enol tautomerie van pma nader te onderzoeken. Hierbij kon door combinatie van infrarood-spectroscopie en enzymologisch onderzoek worden aangetoond, dat het tropazuur-dehydrogenase specifiek is voor de keto-vorm van pma. Bij de hydrogenering van een mengsel van keto- en enol-pma wordt in de initiële fase van de reactie de keto-vorm gehydrogeneerd, waarna de snelheid van de hydrogenering wordt bepaald door de tautomere omlegging van enol-pma in keto-pma.

De verklaring dat de langzame NADH -productie na instelling van het evenwicht o.i.v. het tropazuur-dehydrogenase wordt veroorzaakt door de snelheid, waarmee het gevormd pma ontleeft, is geverifieerd door bepaling van de stabiliteit van keto- en enol-pma onder reactie-omstandigheden. Hierbij bleek dat de snelheid van ontleding van keto-pma - in tegenstelling tot die van enol-pma - overeenstemt met de snelheids-constante van de reactie die aan de NADH -productie ten grondslag ligt.

Met een niet-gezuiverd TDH-preparaat werd bij neutrale pH de evenwichts-instelling niet waargenomen. Dit wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van het pma-decarboxylase (PDC), dat een groot effect heeft op de stabiliteit van keto-pma. Bij de enzymatische dehydrogenering van tropazuur in aanwezigheid van dit enzym, wordt pma zo snel gedecarboxyleerd dat het evenwicht niet wordt ingesteld. Dit heeft een sterke toename in de productie van NADH , CO_2 en fenylaceetaldehyde tot gevolg.

Fenylaceetaldehyde wordt o.i.v. een NAD^+ -afhankelijke dehydrogenase omgezet in fenylazijnzuur. Ook dit enzym is zeer specifiek. Terwijl de drie eerder genoemde enzymen stabiel zijn, blijkt het PDH te worden geïnactiveerd tijdens dialyse en bij bewaren in minder geconcentreerde oplossingen. Deze inactivering kan worden voorkomen door een hoge concentratie kalium-ionen en door toevoegen van mercapto-ethanol, EDTA, natrium-laurylsulfaat en het substraat fenylaceetaldehyde.

De tropazuur-enzymen blijken alle in PMBL-1 te worden geïnduceerd, wanneer de bacterie wordt gekweekt in een medium met atropine, tropazuur, fenylaceetaldehyde, fenylglyoxylzuur of benzaldehyde. Tropine en fenylazijnzuur induceren deze enzymen niet. Uit het onderzoek van mutanten van PMBL-1, waarin de genetische informatie van één of meer van de tropazuur-enzymen verloren is gegaan, is geconcludeerd dat atropine en tropazuur niet als zodanig tot inductie aanleiding geven, maar eerst o.i.v. het basaal niveau van de tropazuur-enzymen moeten worden omgezet in fenylaceetaldehyde. Hetzelfde geldt voor fenylglyoxylzuur; slechts wanneer deze verbinding kan worden gedecarboxyleerd tot benzaldehyde wordt inductie waargenomen. Blijkbaar zijn fenylaceetaldehyde en benzaldehyde de werkelijk inducerende verbindingen.

Men kan zich afvragen of atropine in PMBL-1 uitsluitend o.i.v. de hier beschreven enzymen wordt afgebroken of dat de bacterie nog over een andere mogelijkheid beschikt om het alkaloïde te metaboliseren. Bij het onderzoek van mutanten, die gestoord waren in de afbraak van atropine en tropazuur, maar niet in het metabolisme van fenylazijnzuur, is echter gebleken dat in elk van deze mutanten één of meer van de tropazuur-enzymen afwezig was. Dit maakt het zeer onwaarschijnlijk dat PMBL-1 over een alternatieve mogelijkheid voor de afbraak van atropine en tropazuur beschikt. In dit verband kan worden opgemerkt, dat het aantal moleculen substraat, dat door de tropazuur-enzymen in vitro per tijdseenheid kan worden omgezet, aanmerkelijk groter is dan vereist is voor de waargenomen groeisnelheid van PMBL-1 in een medium met tropazuur als enige koolstofbron, zodat de capaciteit van deze stofwisselingsketen geen belemmerende factor voor de groei behoeft te zijn.

Hiernaast kan men zich afvragen of de tropazuur-enzymen uitsluitend bij de afbraak van atropine zijn betrokken. Het lijkt op het eerste gezicht verwonderlijk dat *Pseudomonas* over een groep enzymen beschikt, die speciaal voor de afbraak van atropine en tropazuur dienen. Het ligt voor de hand te veronderstellen dat deze enzymen in de cel een andere, meer belangrijke functie bezitten. Hiertegen pleit echter de grote substraat-specificiteit van deze enzymen en de specificiteit van het inductie-mechanisme. Op grond hiervan kan een functie bij de stofwisseling van andere aromatische verbindingen zoals fenylalanine en fenylmelkzuur worden uitgesloten. Ook de waarneming dat *Pseudomonas*-mutanten, waarin de genetische informatie voor één of meer van de tropazuur-enzymen verloren is gegaan, ongestoord kunnen groeien in een medium met fenylazijnzuur als enige koolstofbron, duidt op een niet-essentiële functie van deze enzymen.

Indien men aanneemt, dat bij micro-organismen een zekere economie bestaat wat betreft het ontwikkelen van enzymsystemen, die de cel ter beschikking staan, zou de uitgesproken specificiteit van de tropazuur-enzymen er op kunnen duiden, dat atropine en tropazuur in de natuur een veel belangrijkere rol spelen dan op grond van de spaarzame gegevens over het metabolisme van deze stoffen wordt verwacht. Het zou b.v. mogelijk zijn dat tropazuur in vivo wordt gevormd bij de afbraak van 3-benzofuraan- en 3-indool-derivaten of dat tropazuur-derivaten ontstaan bij de afbraak van lignine, een polymeer van fenylpropeen-derivaten, dat in grote hoeveelheden in houtweefsels wordt aangetroffen. De afbraak van lignine zou kunnen verlopen via een afsplitsing van fenylisopropen-derivaten, waaruit door oxydatie tropazuur-derivaten kunnen ontstaan. Een andere mogelijkheid is dat de synthese van atropine en tropazuur in de natuur meer algemeen voorkomt dan men zich realiseert. Hiervoor pleit de belangrijke plaats die de natuurlijke producenten van atropine, de Solanaceae, in de plantenwereld innemen.

Aan de bestudering van het werkings-mechanisme van het atropine-esterase en het gebruik van dit enzym als beperkt model voor de atropine-gevoelige receptor

(zie inleiding) is in dit onderzoek een bijdrage geleverd door de uitwerking van de zuiverings—procedure voor het esterase. Bij de bestudering van de regulering van de tropazuur—enzymen bleek dat het atropine—esterase ook door benzaldehyde en benzaldehyde—derivaten wordt geïnduceerd. Hiermee is een goedkope inductor ter beschikking gekomen, die gebruikt kan worden bij de productie van grote hoeveelheden atropine—esterase, die nodig zijn voor het onderzoek van het katalytisch centrum van het enzym.

Het onderzoek van de stofwisselingsketen heeft het mogelijk gemaakt bij mutanten gestoord in het metabolisme van atropine, een onderscheid te maken tussen de mutanten, waarin alleen de atropine—esterase—activiteit verlaagd is en mutanten, waarin het niveau van alle vier de enzymen is veranderd. Op deze wijze kunnen uit de Atr⁻—mutanten — voorafgaande aan het meer bewerkelijke enzymologisch onderzoek — die mutanten worden geselecteerd, waarin de kans op een gemodificeerd esterase het grootst is.

Voor een verder onderzoek naar de regulering van eiwit—synthese en voor de bestudering van ioniserende en exciterende straling hierop, lijken de tropazuur—enzymen zeer geschikt. De enzymen kunnen snel en kwantitatief worden geëxtraheerd en bepaald, ze hebben een laag moleculair gewicht, zijn specifiek voor hun natuurlijke substraten en worden uitsluitend geïnduceerd door enkele aromatische aldehyden.

Ook het feit dat hun functie niet essentieel is voor het normale cel—metabolisme, maakt de tropazuur—enzymen tot een geschikt object voor een dergelijke studie. Bij de bestudering van de regulering van de eiwit— en enzym—synthese maakt men nl. meestal gebruik van mutanten, waarin de informatie voor één of meer van de betreffende enzymen verloren is gegaan. Bij vele andere enzym—systemen leiden deze mutaties tot een verstoring van het normale cel—metabolisme. In PMBL—1 is het echter mogelijk het effect van mutaties op de regulering van de synthese van de tropazuur—enzymen te onderzoeken zonder dat deze mutaties het cel—metabolisme verstoren en daardoor het regulerings—proces beïnvloeden. Hierbij kan een nuttig gebruik worden gemaakt van de gratuïte inductie door fenylglyoxylzuur; in aanwezigheid van deze verbinding worden de tropazuur—enzymen geïnduceerd, terwijl de groei geheel onafhankelijk verloopt van het intact zijn van de tropazuur—stofwisseling.

Bij het gebruik maken van mutanten voor het onderzoek van de regulering van enzym—synthese is het vereist de aard van de aanwezige mutaties te kennen. *Pseudomonas putida* is in dit opzicht echter minder aantrekkelijk, omdat de mogelijkheden voor genetisch onderzoek in deze bacterie tot op heden zeer beperkt zijn. Onlangs zijn door Holloway en van der Putte (1968) enkele bacteriofagen geïsoleerd, waarmee in *Pseudomonas putida* PMBL—1 overdracht van genetische kenmerken kan worden aangetoond. Hoewel deze overdracht tot nu toe alleen is gevonden voor enkele auxotrofe kenmerken, zal het wellicht specifiek ook voor het atropine—ken-

merk mogelijk zijn. Een verdere bestudering van de regulering van eiwit- en enzym-synthese in *Pseudomonas putida* zal dan mogelijk worden door een genetische analyse van het atropine-locus gecombineerd met biochemisch onderzoek van de gen-producten, de tropazuur-enzymen.

SUMMARY

From soil from between the roots of *Atropa belladonna* L. Rörsch and Berends isolated a *Pseudomonas putida* (PMBL-1), which is able to grow with the alkaloid atropine as sole carbon source. It has been shown that the breakdown of atropine in this micro-organism proceeds according to the scheme facing the last page. Atropine is hydrolysed, tropine and tropic acid are formed. The latter compound is broken down via 2-phenylmalonic-semi-aldehyde (pma) and phenylacetaldehyde to phenylacetic acid, a common carbon source to many *Pseudomonas* strains.

The role of phenylacetic acid as an intermediate in the metabolism of atropine and tropic acid was deduced from the observations that PMBL-1 grown with atropine or tropic acid, is adapted to phenylacetic acid (fig. 4.2) and that all mutants isolated for the inability to metabolize phenylacetic acid fail to grow with atropine or tropic acid as carbon source. Moreover, phenylacetic acid was isolated from the growth-medium of several of these mutants grown in a tropic acid containing medium (fig. 4.4).

The hydrolysis of atropine is catalyzed by the enzyme atropine-esterase (AtrE). The action of this esterase has been demonstrated by identification of the reaction-products tropine and tropic acid (fig. 5.2). This fairly stable enzyme has been purified extensively: estimated purity over 90% (table 5.1). It is specific for (-) - atropine and closely related compounds (table 5.6) and is inhibited by organophosphates like diisopropyl phosphorofluoridate (DFP).

The second enzyme playing a role in the metabolic pathway is the NAD^+ - dependent tropic acid dehydrogenase (TDH), the third is the 2-phenylmalonic-semi-aldehyde-decarboxylase (PDC). The combined action of the two enzymes on tropic acid in the presence of NAD^+ results in the formation of NADH (fig. 6.3), phenylacetaldehyde (fig. 7.4) and CO_2 (table 7.5). The last step is catalyzed by the phenylacetaldehyde-dehydrogenase (PDH), also NAD^+ -dependent. It was shown that phenylacetic acid is the product of this reaction (fig. 8.4). The TDH, PDC and PDH have been purified partially (tables 6.2; 7.6; 8.3). For each enzyme a reliable determination of enzyme-activity has been developed (fig. 2.2). The enzymes were found to be very specific for the appropriate substrates (table 6.5.1 and 6.5.2).

When the dehydrogenation of tropic acid was studied in the presence of NAD^+ and purified TDH at neutral pH, a fast initial NADH-production was observed, followed by an abrupt slowing down (fig. 6.6). This phenomenon was explained on the assumption that the enzyme catalyzes an equilibrium process:



the NADH-concentration increases rapidly while the equilibrium is established;

the slow NADH-production thereafter is caused by spontaneous decomposition of pma, resulting in a shift of the equilibrium to the right. Variation of the concentrations of tropic acid and NAD^+ , variation of the pH and the addition of NADH or pma all had the expected influence on the course of the reaction. The equilibrium was obtained either by dehydrogenation of tropic acid or by hydrogenation of pma (fig. 6.9). From the results the equilibrium constant K_{eq} was calculated approximately to amount to 0.30×10^{-12} M (table 6.17); this means that the hydrogenation is favoured.

The pma required for these experiments has been synthesized according to the only procedure described in literature (Strukov 1952). The melting point of the synthesized product was not the same as the one cited. The compound, however, was identified unquestionably as pma in its enol-form by means of chemical analysis and infrared-spectroscopy (3.4).

The reaction of enol-pma with NADH in the presence of TDH also shows biphasic kinetics (fig. 6.11.a). Evidence is presented that keto-pma is the proper substrate for the TDH; the initial rapid conversion of NADH into NAD^+ was found to correspond with the amount of keto-pma initially present. The slower phase of the reaction was attributed to a rate-limiting tautomeric conversion of enol-pma into keto-pma.

The rate of decomposition of enol-pma and keto-pma was measured (fig. 6.15). These values were compared with the rate of the reaction governing the NADH-production after establishment of the equilibrium. From these results can be concluded that keto-pma is the product formed during the enzymatic dehydrogenation of tropic acid.

When non-purified TDH-preparations are used for the dehydrogenation of tropic acid the equilibrium is not reached. This is shown to be the consequence of the pma-decarboxylase present in these preparations. The decarboxylase has a great effect on the stability of keto-pma. This enzyme can also be demonstrated by its great effect on the amounts of NADH (fig. 7.2), phenylacetaldehyde and CO_2 formed after establishment of the equilibrium during enzymatic dehydrogenation of tropic acid at neutral pH. The effect on the NADH-production is used for a quantitative assay for the decarboxylase. During purification this enzyme is separated from TDH (fig. 7.1).

The phenylacetaldehyde-dehydrogenase is less stable than the other enzymes. Much activity is lost during dialysis (table 8.1) and during storage of preparations with rather low protein-content (table 8.2). In a phosphatebuffer (0.05 M) containing mercapto-ethanol, EDTA, sodium-dodecylsulphate and phenylacetaldehyde the enzyme can be handled without serious loss of activity.

The pathway from atropine to phenylacetic acid as given in the scheme, is owing to the substrate specificity of the four enzymes, the only possible route mediated by these enzymes. A quite different pathway seems unlikely since all mutants unable to grow with atropine as sole carbon source lack one or more of

these enzymes. Indications that PMBL-1 contains a permease or a racemase for atropine or tropic acid have not been found. The enzymes involved in the breakdown of atropine in PMBL-1 are different from the enzymes in *Pseudomonas* ATCC 12633, which are concerned with the metabolism of the structurally related mandelic acid (Hegeman 1966).

The AtrE, TDH, PDC en PDH are inducible enzymes. Growth in atropine and tropic acid containing media results in the induction of all four enzymes. Also phenylacetaldehyde, phenylglyoxylic acid and benzaldehyde act as inducers (table 10.3 and 10.4). From studies of mutants of PMBL-1, with a mutation in only one of the genes for these enzymes, it was concluded that atropine and tropic acid themselves are unable to induce the 'tropic enzymes', but have to be converted into the actual inducer phenylacetaldehyde (table 10.6). The same holds for the induction observed in phenylglyoxylic acid containing media; this compound is not a real inducer but must be converted into benzaldehyde by a decarboxylase present in PMBL-1 (table 10.7).

The advantages of induction of the enzymes by an intermediate product are discussed. This mode of induction is more specific than induction by the substrate (Ornston 1966): the compound has to be recognized by three specific enzymes before it can give rise to induction. Moreover, because of the relatively high basic activity of PDH the induction will only take place if atropine can be converted into phenylacetaldehyde in a really fast process. This enables the cell to check beforehand whether induction will be of advantage or not. This is very attractive from a regulatory point of view.

In the final discussion it is concluded that these enzymes are present in PMBL-1 with the exclusive function to catalyze the breakdown of atropine into phenylacetaldehyde. These enzymes therefore are considered as a very promising object for a study of the regulation of protein-synthesis in micro-organisms.

LITERATUUR—REFERENTIES

- ADELBERG, E.A., *Bact. Rev.*, 17 (1953) 253.
- AMMON, R. en W. SAVELSBERG, *Z. Physiol. Chem.*, 284 (1949) 135.
- ASAKAWA, T., H. WADA en T. YAMANO, *Biochim. Biophys. Acta*, 170 (1968), 375.
- BÄCKLIN, K.I., *Acta Chem. Scand.*, 12 (1958) 1279.
- BERENDS, F., persoonlijke mededeling (1965).
- BERENDS, F., A. RÖRSCH en W.F. STEVENS, in: *Proc. Conf. on Structure and Reactions of DFP-sensitive enzymes*, ed. E. Heilbronn, Försvarets Forskningsanstalt Stockholm 1967 p. 45.
- BERENDS, F., A. RÖRSCH, W.F. STEVENS, R.A. OOSTERBAAN en J.A. COHEN, 1969, in voorbereiding.
- BERNHEIM, F., *The Interaction of Drugs and Cell Catalysts*, Burgess Publish Co., Minneapolis, 1948.
- BERNHEIM, F. en M.L.C. BERNHEIM, *J. Pharmacol.*, 64 (1938) 209.
- CALLAHAN, J.W. en G.W. KOSICHI, *Can. J. Biochem.*, 45 (1967) 839.
- CHAMBERLAIN, E.M. en S. DAGLEY, *Biochem. J.*, 110 (1968) 755.
- CHAPMAN, P.J. en D.J. HOPPER, *Biochem. J.*, 110 (1968) 491.
- CHILSON, O.P., G.B. KITTO en N.O. KAPLAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 53 (1965) 1006.
- CIOTTI, M.N. en N.O. KAPLAN, in: *Methods in Enzymology Vol. III*, ed. S.P. Colowick en N.O. Kaplan, Acad. Press Inc., New York, 1957, p. 890.
- COHEN, J.A., R.A. OOSTERBAAN, H.S. JANSZ en F. BERENDS, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 54, Suppl. 1 (1959) 231.
- COHEN—BAZIRE, G., W.R. SISTROM en R.Y. STANIER, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 49 (1957) 25.
- COMMISSION OF ENZYMES. *Report of the International Union of Biochemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1961 p. 7.
- COZZARELLI, N., S. HAYAISHI en E.C.C. LIN, *Federation Proc.*, 24 (1965) 417.
- DAGLEY, S., L.N. ORNSTON en S.C. RITTENBERG, in: *Pseudomonas Workshop*, Cold Spr. Harb. Lab. Quant. Biol., New York, 1964, p. 7.
- DAVIES, M. en W.J. ORVILLE—THOMAS, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2858.
- FLEISCHMANN, P., *Berl. Klin. Wschr.*, 48 (1910) 135.
- FLODIN, P. en D.W. KUPLIE, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 368.
- FLUCK, H., *Pharm. Weekblad*, 100 (1965) 1361.
- FRIEDMAN, C.A. en J.M.Z. GLADYCH, *J. Chem. Soc.*, (1956) 310.

- GABOUREL, J.D. en R.E. GOSSELIN, Arch. Intern. Pharmacodyn., 115 (1958) 416.
- GIBSON, C.A. en H.W. YOUNGKEN, J. Pharm. Sci., 56 (1967) 854.
- GIBSON, D.T., Science, 161 (1968) 1093.
- GLICK, D., J. Biol. Chem., 134 (1940) 617.
- GUNSALUS, C.F., R.Y. STANIER en I.C. GUNSALUS, J. Bacteriol., 66 (1953 a) 548.
- GUNSALUS, I.C., C.F. GUNSALUS en R.Y. STANIER, J. Bacteriol., 66 (1953 b) 538.
- HEGEMAN, G.D., J. Bacteriol., 91 (1966) 1140.
- HOLLOWAY, B., P. van de PUTTE, Nature, 217 (1968) 459.
- HOUBEN-WEIJL, Methoden der Organischen Chemie, Bd. II, G. Thieme Verlag, Stuttgart, 1953, p. 385.
- JANSON, J., J. Chromat., 28 (1967) 12.
- JINDRA, A. en A. Čihák, Abh. Deutsch. Akad. Wiss., Klasse Chemie Geologie und Biologie, Berlin, 1963 no. 4.
- KACZKOWSKI, J., Acta Soc. Botan. Polon., 28 (1959) 677.
- KACZKOWSKI, J., Bull. Acad. Polon. Sci. Ser. Sci. Biol., 12 (1964) 375.
- KALSER, S.C., J.H. WILLS, J.D. GABOUREL, R.E. GOSSELIN en C.P. EPES, J. Pharmacol. Exp. Therap., 121 (1957) 449.
- KAUFMAN, H.P. en E. RICHTER, Chem. Ber., 58 (1925) 222.
- KEDZIA, W., J. LEWON en T. WISNIEUWSKI, J. Pharm. Pharmacol., 13 (1961) 614
- KENNEDY, S.I.T. en C.A. FEWSON, Biochem. J., 107 (1968) 497.
- KOHN, L.D. en W.B. JACOBY, J. Biol. Chem., 243 (1968) 2465.
- KRUPKA, R.M., Biochemistry, 2 (1963) 76.
- KUBOWITZ, F. en P. OTT, Biochem. Z., 314 (1943) 94.
- LAYNE, E., in: Methods in Enzymology Vol. III, ed. S.P. Colowick en N.O. Kaplan, Acad. Press Inc., New York, 1957, p. 447.
- LEDERBERG, J. en E.M. LEDERBERG, J. Bacteriol., 63 (1952) 399.
- LINDEN, A.C. van der en G.J.E. Thijsse, Advances in Enzymology, 27 (1965) 469.
- LINEWEAVER, H. en D. BURK, J. Amer. Chem. Soc., 56 (1934) 658.
- LINN, S. en I.R. LEMAN, J. Biol. Chem., 240 (1965) 1287.
- LOEWUS, F.A., T.T. Chen en B. Vennesland, J. Biol. Chem., 212 (1955) 787.
- LOWRY, O.H., N.L. ROSEBROUGH, A.L. FARR en R.J. RANDALL, J. Biol. Chem., 193 (1951) 265.

- MARGOLIS, F. en P. FEIGELSON, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2620.
- MARGOLIS, F. en P. FEIGELSON, *Biochim. Biophys. Acta*, 90 (1964) 117.
- MATSUDA, K., *Niigata Igakkai Zasshi*, 80 (1966) 53.
- METZNER, R., *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 68 (1912) 110.
- MOORE, C.L., *Arch. Biochem. Biophys.*, 128 (1968) 734.
- MÜLLER-HILL, B., H. Rickenberg en K. Wallenfels, *J. Mol. Biol.*, 10 (1964) 303.
- NEUMANN, D. en K.H. TSCHÖPE, *Flora Jena*, 156 (1966) 521.
- NIEMER, H., H. BUCHERER en A. KOHLER, *Z. Physiol. Chem.*, 317 (1959) 238.
- NIEMER, H. en H. BUCHERER, *Z. Physiol. Chem.*, 326 (1961) 9.
- ORNSTON, L.N., *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 3800.
- OTORII, T., *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 61 (1965) 462.
- PARDEE, A.B., *Science*, 162 (1968) 632.
- QUINTON, R.M., *J. Pharm. Pharmacol.*, 18 (1966) 579.
- RODD, E.H. (ed.), *Chem. of Carbon Compounds Vol. III B*, Elsevier, Amsterdam, 1956, p. 927.
- SAWIN, P.S. en D. GLICK, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 29 (1943) 55.
- SCHACHMAN, H.K., *Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol.*, 28 (1963) 409.
- SCHLESINGER, S. en B. MAGASANIK, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965 a) 4325.
- SCHLESINGER, S., P. Scotto en B. Magasanik, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965 b) 4331.
- SCHROFF, Z., *Z. Ges. Ärzte Wien*, 3 (1852) 211.
- SEIDENBERG, M., R.J. Martinez, R. GUTHRIE, H. MINNEMEYER en H. TIECKELMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 97 (1962) 470.
- STACHOW, C.S., I.L. STEVENSON en D. DAY, *J. Biol. Chem.*, 242 (1957) 5294.
- STAHL, E., *Dünnschicht Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1957.
- STANIER, R.Y., *Bact. Rev.*, 14 (1950) 179.
- STANIER, R.Y., I.C. GUNSALUS en C.F. GUNSALUS, *J. Bacteriol.*, 66 (1953), 543.
- STANIER, R.Y., N.J. PALLERONI en M. DOUDOROFF, *J. Gen. Microbiol.*, 43 (1966) 159.
- STEVENS, W.F. en F.H. MEPPELDER (1969) (in voorbereiding).
- STRUKOV, I.T., *Zhur Obschei Khim.*, 22 (1952) 1025.
- SUBBA RAO, P.V., K. MOORE en G.H.N. TOWERS, *Arch. Biochem. Biophys.*, 122 (1967) 466.
- UMBREIT, W.W., R.H. BURRIS en J.F. STAUFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*, Burgess Publishing Co., Minneapolis, 1951.
- VOGEL, A.I., *Practical Organic Chemistry*, Longmans, Londen, 1959, p. 781.
- WENSINCK, F., *Appendix bij Berends* (1969).
- WERNER, G. en G. BREHMER, *Z. Phys. Chem.*, 348 (1967) 1640.
- WERNER, G. en K.H. SCHMIDT, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 741.

Op verzoek van de Faculteit der Wiskunde en Natuurwetenschappen volgt hier een overzicht van mijn academische studie.

Na het behalen van het eindexamen gymnasium β aan het Twentsch Carmel-lyceum te Oldenzaal in 1959 werd ik in hetzelfde jaar ingeschreven voor een studie in de scheikunde aan de Rijksuniversiteit te Leiden. In 1962 werd het kandidaats-examen afgelegd en in 1965 het doctoraalexamen cum laude met als hoofdrichting biochemie en als bijvakken organische chemie en farmacologie; de studie hiervan stond onder leiding van de hoogleraren Dr. L. Bosch, Dr. E. Havinga en Dr. E.L. Noach.

Voor het vervullen van de militaire dienstplicht werd ik na een verkorte officiers-opleiding gedetacheerd op het Medisch Biologisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO te Rijswijk in welke periode een aanvang werd gemaakt met het hier beschreven onderzoek. Hierna trad ik in dienst van de Rijksuniversiteit te Leiden als medewerker van het Instituut voor Radiopathologie en Stralingsbescherming, maar bleef werkzaam op het M.B.L. teneinde het onderzoek naar de regulering van enzym-synthese in *Pseudomonas* voort te zetten.

Gaarne wil ik mijn dank betuigen aan mijn promotor Prof. Dr. A. Rörsch en aan Prof. Dr. J.A. Cohen, directeur van het Medisch Biologisch Laboratorium, voor de wijze waarop zij aan mijn wetenschappelijke vorming hebben bijgedragen.

In het bijzonder ben ik dank verschuldigd aan Dr. F. Berends voor de diepgaande kritische belangstelling en zijn opmerkingen ten aanzien van de redactie van het manuscript, aan Ir. C.A. van Sluis voor diens bijzondere interpretatie van het begrip collegialiteit en aan Dr. R.A. Oosterbaan voor de waardevolle adviezen, die ik van hem mocht ontvangen.

Voorts gaat mijn erkentelijkheid uit naar de vele medewerkers van het Medisch Biologisch Laboratorium en van het Chemisch Laboratorium der Rijksverdedigingsorganisatie TNO, die aan het tot stand komen van dit proefschrift hebben meegewerkt. Met name wil ik noemen Mej. M.P. van Winden voor de snelle en accurate wijze waarop zij mij gedurende vier jaar ter zijde heeft gestaan, Mevr. T. Rodenhuis-Poelman en de Heer J.A.M. Glandorf voor hun aandeel in het experimentele werk, de Heer H.E. Groot Bramel, M. J. M. Boermans en J.J. Weber voor het vervaardigen van de figuren en de foto's en Mej. E. Looy voor het typen van het manuscript.

Het bestuur van de Rijksverdedigingsorganisatie TNO ben ik zeer erkentelijk voor de gelegenheid, die zij mij hebben geboden dit proefschrift op het Medisch Biologisch Laboratorium te bewerken.

Tenslotte dank ik jou, Yvonne, voor je stimulans en je daadwerkelijke steun en U, mijn ouders, voor alles wat U heeft gedaan teneinde mij de academische opleiding te kunnen geven, die met deze promotie wordt afgesloten.

AFKORTINGEN

PMBL-1	<i>Pseudomonas</i> geïsoleerd uit <i>Atropa belladonna</i> aarde
Ps-atropine	PMBL-1 gekweekt in aanwezigheid van atropine
Ps-tropazuur	PMBL-1 gekweekt in aanwezigheid van tropazuur
AtrE	atropine-esterase
TDH	tropazuur-dehydrogenase
PDC	2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde-decarboxylase
PDH	fenylaceetaldehyde-dehydrogenase
NAD ⁺	nicotinamide-adenine-dinucleotide
NADH	gereduceerd NAD ⁺
NADP ⁺	nicotinamide-adenine-dinucleotide fosfaat
NADPH	gereduceerd NADP ⁺
pma	2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde
enol-pma	tautomere enol-vorm van pma
keto-pma	tautomere keto-vorm van pma
nm	nanometer (mμ)
A ₃₄₀	absorptie bij 340 nm
A ₇₀₀	absorptie bij 700 nm
U	eenheid van enzym-activiteit
TA	totale activiteit
SA	specifieke activiteit
HMP	10 mM K-fosfaat buffer pH 7,0
EDTA	ethyleen-diamino-tetra-azijnzuur
ME	mercapto-ethanol
SDS	natrium-laurylsulfaat
TRIS	tris-hydroxymethyl-aminomethaan
LDH	melkzuur-dehydrogenase

GENETISCHE KENMERKEN

Atr	atropine
Tro	tropazuur
Tpn	tropine
Pac	fenylazijnzuur
Php	p-hydroxy-fenylazijnzuur
Pgl	fenylglyoxylzuur

Voor het verband tussen de hoeveelheid resp. concentratie NADH en de absorptie bij 340 nm geldt bij een volume van 3 ml:

1 μmol NADH = A₃₄₀ 2,07

1 mM NADH = A₃₄₀ 6,22

N.B. De afkortingen zijn afgeleid van de Engelse benamingen.

INHOUD

	Pag.
INLEIDING	7
HOOFDSTUK 1	LITERATUUR
1.1	De afbraak van atropine in zoogdieren
1.2	De afbraak van atropine in planten
1.3	De afbraak van atropine in micro-organismen
HOOFDSTUK 2	MATERIALEN EN METHODEN
2.1	Nomenclatuur
2.2	Materialen
2.3	Het isoleren van <i>Pseudomonas</i> PMBL-1
2.4	Het kweken van de bacteriën
2.5	Het isoleren van <i>Pseudomonas</i> -mutanten
2.6	Bepaling van de zuurstofopname en CO ₂ -productie
2.7	Dunnelaagchromatografie
2.8	Het isoleren van ³ H-tropazuur; opname van ³ H-tropazuur in <i>Pseudomonas</i>
2.9	Enzym-activiteitsbepalingen
2.9.1	Algemeen
2.9.2	Kwantitatieve bepaling van de AtrE-activiteit
2.9.3	Kwantitatieve bepaling van de TDH-, PDC- en PDH-activiteit
2.10	Bepaling van de specifieke enzym-activiteit in extracten van PMBL-1 en van mutanten
2.11	Zuivering van de tropazuur-enzymen
2.11.1	Zuivering van het AtrE
2.11.2	Zuivering van het TDH, PDC en PDH
2.11.3	Schatting van het moleculair gewicht van de tropazuur-enzymen
2.12	Spectroscopische en chemische analyses
2.13	Bepaling van het enol-gehalte van 2-fenylmalonzuur- semi-aldehyde
HOOFDSTUK 3	SYNTHESE EN EIGENSCHAPPEN VAN 2-FENYLMALONZUUR-SEMI-ALDEHYDE
3.1	Inleiding
3.2	Synthese van het 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde
3.3	Identificatie van het 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde
3.3.1	Het ontledingstraject
3.3.2	Infrarood- en kernspinresonantie spectroscopie
3.3.3	Gaschromatografie
	157

3.3.4	Biochemische aanwijzingen	39
3.4	Tautomere omlegging van het 2-fenylmalonzuur-semi-aldehyde	39
3.4.1	Kwantitatieve bepaling van de enol-vorm	39
3.4.2	Verschuiving van het keto-enol evenwicht in ethanol bij 0°	40
3.4.3	Snelheid van de tautomere omlegging in waterig milieu	42
HOOFDSTUK 4	DE AFBRAAK VAN ATROPINE EN TROPАЗUUR IN PSEUDOMONAS PMBL-1	
4.1	Inleiding	43
4.2	Koolstofbronnen voor PMBL-1	44
4.3	De adaptatie van PMBL-1 aan aromatische zuren	45
4.4	Onderzoek van mutanten, gestoord in de afbraak van tropazuur	47
4.5	Mutanten, gestoord in het metabolisme van fenylazijnzuur en p-hydroxy-fenylazijnzuur	48
4.6	Onderzoek van mutanten, gestoord in het metabolisme van fenylazijnzuur	49
4.7	Afbraak van fenylazijnzuur	51
4.8	Discussie	51
HOOFDSTUK 5	HET ATROPINE-ESTERASE	
5.1	Inleiding	53
5.2	Kwantitatieve bepaling van de activiteit van het atropine-esterase	53
5.3	Zuivering van het atropine-esterase	54
5.4	Eigenschappen van het atropine-esterase	55
5.4.1	Analyse van de producten van de enzym-reactie	55
5.4.2	Stoechiometrie	55
5.4.3	Substraat-optimum	55
5.4.4	pH-optimum	58
5.4.5	Substraat-specificiteit	58
5.4.6	Stereo-specificiteit	60
5.4.7	Stabiliteit van het enzym	60
5.4.8	Diversen	61
5.5	Discussie	61
HOOFDSTUK 6	HET TROPАЗUUR-DEHYDROGENASE	
6.1	Inleiding	64
6.2	Kwantitatieve bepaling van het tropazuur-dehydrogenase	66
6.3	Gedeeltelijke zuivering	67
6.4	Eigenschappen van het gezuiverd enzym	67
6.4.1	Analyse van de reactie-producten en de stoechiometrie van de reactie	67
6.4.2	Invloed van de pH op de enzymatische dehydrogenering	69
6.4.3	Specificiteit van het tropazuur-dehydrogenase	70
6.4.4	De stabiliteit	72
6.4.5	Enkele andere eigenschappen	72
6.5	De enzymatische dehydrogenering van tropazuur in neutraal milieu	73

6.6	Het effect van de keto—enol tautomerie op de enzymatische hydrogenering van pma	80
6.7	De snelheid van spontane ontleding van pma	86
6.8	Het effect van keto—pma op de instelling van het evenwicht	89
6.9	Discussie	90

HOOFDSTUK 7 HET 2—FENYLMALONZUUR—SEMI—ALDEHYDE—DECARBOXYLASE

7.1	Inleiding	94
7.2	Aanwijzingen voor het voorkomen van een decarboxylase	94
7.3	Kwantitatieve bepaling van de PDC—activiteit	101
7.4	Gedeeltelijke zuivering van het PDC	101
7.5	Eigenschappen van het gezuiverd enzym	102
7.5.1	Substraat—specificiteit	102
7.5.2	Specificiteit voor de keto—vorm van pma	103
7.5.3	De stabiliteit van het enzym	104
7.5.4	Diversen	104
7.6	Discussie	105

HOOFDSTUK 8 HET FENYLACEETALDEHYDE—DEHYDROGENASE

8.1	Inleiding	107
8.2	Activiteits—bepaling en stabiliteit van het PDH	107
8.2.1	Stabiliteit tijdens dialyse	108
8.2.2	Stabiliteit in verdunde preparaten	109
8.3	Gedeeltelijke zuivering van het PDH	110
8.4	Enkele eigenschappen van het gezuiverde enzym	111
8.4.1	Analyse van de producten van de enzymatische omzetting	111
8.4.2	Stoechiometrie van de reactie	111
8.4.3	Het pH—optimum	111
8.4.4	Specificiteit van PDH	112
8.5	Omzetting van pma door een gedeeltelijk gezuiverd PDH—preparaat	114
8.6	Diversen	116
8.7	Discussie	118

HOOFDSTUK 9 DE TROPAZUUR—ENZYMEN

9.1	Inleiding	119
9.2	Volgorde, waarin de tropazuur—enzymen werkzaam zijn	119
9.3	Andere enzymen, die wellicht betrokken zijn bij de afbraak van atropine	121
9.3.1	Afbraak van tropine	121
9.3.2	Opname van substraten uit het medium	121
9.3.3	Racemase	123
9.4	Afbraak van atropine in andere Pseudomonaceae	123
9.5	Relatie met de afbraak van amandelzuur en fenylpyrodruienzuur	125

HOOFDSTUK 10	REGULERING VAN DE SYNTHESE VAN DE TROPAZUUR-ENZYMEN	
10.1	Inleiding	128
10.2	Kinetiek van de inductie; het effect van chlooramfenicol	130
10.3	De specificiteit van inductie van de tropazuur-enzymen	132
10.4	Gratuite inductie door tropazuur en fenylacetaldehyde	134
10.5	Gratuite inductie door fenylglyoxylzuur en benzaldehyde	135
10.6	Inductie in mutanten van PMBL-1	136
10.7	Overzicht van de gebruikte mutanten van PMBL-1	139
10.8	Discussie	140
SAMENVATTING EN NABESCHOUWING		144
SUMMARY		149
LITERATUUR-REFERENTIES		152
NAWOORD		155
AFKORTINGEN		156

Composer-zetwerk: Zetterijbedrijf Sannen, Rijswijk zh.

Offsetdruk: Demmenie N.V., Leiden.