



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Enzymology and regulation of the atropine metabolism in *pseudomonas putida*

Stevens, W.F.

### Citation

Stevens, W. F. (1969, June 18). *Enzymology and regulation of the atropine metabolism in pseudomonas putida*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/77056>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/77056>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/77056> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Stevens, W.F.

**Title:** Enzymology and regulation of the atropine metabolism in pseudomonas putida

**Issue Date:** 1969-06-18

## 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 bacteria afgebroken volgens het schema weergegeven in bijlage 1. 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 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 de 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 reactieproducten 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 verwante verbindingen en wordt geremd door organofosfaten bv diisopropyl-fosforofluoridaat (DFP).

De afbraak van tropazuur verloopt o.i.v. een  $\text{NAD}^+$ -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  $\text{NAD}^+$  afhankelijke dehydrogenering van tropazuur als door een  $\text{NADH}$ -afhankelijke hydrogenering van pma aangetoond. De evenwichtsconstante is bepaald op  $\pm 0.30 \times 10^{-12}$  M; het evenwicht ligt sterk aan de kant van het tropazuur. Na de instelling van het evenwicht wordt een langzame  $\text{NADH}$  productie waargenomen, die veroorzaakt wordt door een spontane ontleding van pma.

Terwijl het effect van de tropazuur-,  $\text{NAD}^+$ - en  $\text{NADH}$ -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 een combinatie van infrarood-spectroscopie en enzymologisch onderzoek worden aangetoond, dat het tropazuur-dehydrogenase specifiek is voor de keto-vorm van pma. Bij de enzymatische 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  $\text{NADH}$ -productie na instelling van het evenwicht o.i.v. het tropazuur-dehydrogenase wordt veroorzaakt door de snelheid, waarmee het gevormde pma ontleedt, is geverifieerd door de bepaling van de stabiliteit van keto- en enol-pma onder reactie-condities. Hierbij bleek dat de snelheid van de ontleding van keto-pma – in tegenstelling tot die van enol-pma – overeenstemt met de snelheidsconstante van de reactie die aan de  $\text{NADH}$  productie ten grondslag ligt.

Met een niet-gezuiverd TDH-preparaat werd bij neutrale pH de evenwichtsinstelling 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 de aanwezigheid van dit enzym wordt pma zo snel gedecarboxyleerd dat het evenwicht niet kan worden ingesteld. Dit heeft een sterke toename in de productie van  $\text{NADH}$ ,  $\text{CO}_2$  en fenylacetaldehyde tot gevolg.

Fenylacetaldehyde wordt o.i.v. een  $\text{NAD}^+$ -afhankelijk 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 van minder geconcentreerde oplossingen. Deze inactivering kan worden voorkomen door een hoge concentratie kalium-ionen en door het toevoegen van mercapto-ethanol, EDTA, natrium laurylsulfaat en fenylacetaldehyde.

De tropazuur enzymen blijken alle in PMBL-1 te worden geïnduceerd, wanneer de bacterie wordt gekweekt in een medium met atropine, tropazuur, fenylacetaldehyde, fenylglyoxylzuur of benzaldehyde. Tropine en fenylazijnzuur induceren deze enzymen niet. In 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 basale niveau van de tropazuur-enzymen moeten worden omgezet in fenylacetaldehyde. Hetzelfde geldt voor fenylglyoxylzuur; slechts wanneer deze verbinding kan worden gedecarboxyleerd

tot benzaldehyde wordt inductie waargenomen. Blijkbaar zijn fenylacetaldehyde 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 informatie voor één of meer van de tropazuur-enzymen verloren is gegaan, ongestoord kunnen groeien met fenylazijnzuur als enige koolstofbron, duidt op een niet-essentiële functie van deze enzymen.

Indien men aannemt, 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 bijv. mogelijk zijn dat tropazuur in vivo wordt gevormd by 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 houtweefsel wordt aangetroffen. De afbraak van lignine zou kunnen verlopen via een afsplitsing van fenylisopropen-derivaten, waaruit door oxidatie tropazuur derivaten kunnen ontstaan. Een andere mogelijkheid is dat

de synthese van atropine en tropazuur in de natuur veel meer algemeen voorkomt dan men zich realiseert. Hiervoor pleit de belangrijke plaats die de natuurlijke producenten van atropine, de Solanaceae, in de planten- wereld innemen.

Aan de bestudering van het werkingsmechanisme 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 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.

Onderzoek van de stofwisselingsketen heeft het mogelijk gemaakt bij mutanten, die gestoord zijn in het metabolisme van atropine, een onderscheid te maken tussen mutanten, waarin alleen de atropine esterase activiteit verlaagd is en mutanten waarin het niveau van alle vier enzymen is veranderd. Op deze wijze kunnen uit de AtrE<sup>-</sup> mutanten - voorafgaand 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 de eiwitsynthese 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 en hebben een laag moleculair gewicht, zijn specifiek voor hun natuurlijke substraten en worden uitsluitend geïnduceerd door enkele aromatische aldehyden.

Het feit dat hun functie niet essentieel is voor het normale celmetabolisme maakt de tropazuur enzymen tot een geschikt object voor een dergelijke studie. Bij de bestudering van de de regulering van 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 gratuite 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 eiwitsynthese 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 enkele bacteriofagen geïsoleerd (1968) waarmee in *Pseudomonas putida* PMBL-1 de overdracht van genetische kenmerken kan worden aangetoond. Hoewel deze overdracht tot nu toe alleen is gevonden voor enkele auxotrofe kenmerken, zal het wellicht spoedig ook voor het atropine-kenmerk mogelijk zijn. Een verdere bestudering van de regulering van eiwit- en enzymesynthese 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.