

**MEDEDELINGEN LANDBOUWHOGESCHOOL
WAGENINGEN • NEDERLAND • 69-17 (1969)**

DE AFBRAAK VAN ARGININE IN BAKKERSGIST

W. J. MIDDELHOVEN

*Laboratorium voor Microbiologie,
Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederland.*

(Received 16-10-1969)

**Mededelingen Landbouwhogeschool
Wageningen 69-17 (1969)
is ook gepubliceerd als proefschrift**

INHOUD

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

SYSTEMATISCHE NAMEN VAN VERMELDE ENZYMEN

HOOFDSTUK 1 INLEIDING EN LITERATUUROVERZICHT	1
1.1 Probleemstelling en inhoud	1
1.2 Literatuur over de afbraak van arginine	1
1.2.1 Inleiding	1
1.2.2 Arginase-weg	3
1.2.3 Arginine-deïminase-weg	3
1.2.4 Decarboxylase-weg	4
1.2.5 Decarboxy-oxidase-weg	4
1.2.6 Transaminering	4
1.2.7 Oxidatieve deaminering	4
1.2.8 Ureum-afbraak	4
1.2.9 De arginine-afbraak in gist	5
1.3 Literatuur over de regulatie van stofwisselingsprocessen	5
1.3.1 Inleiding	5
1.3.2 Eindproduktremming	5
1.3.3 Regulatie door enzymkinetiek	6
1.3.4 Inductie en repressie	7
1.3.5 Kataboliet-repressie	9
1.3.6 Inaktiveringsrepressie	11
1.4 Literatuur over de cofactor van arginase	12
HOOFDSTUK 2 WERKWIJZEN EN MATERIALEN	14
2.1 Herkomst van de gebruikte chemicaliën	14
2.2 Het kweken van de gist	15
2.2.1 Giststam	15
2.2.2 Kweekmedium en kweekwijzen	15
2.2.3 IJzer-deficiënt medium	17
2.3 Bepaling van de gistopbrengst	17
2.4 Bereiding van celextracten	17
2.5 Enzymbepalingen	18
2.5.1 Eenheid van specifieke enzymactiviteit	18
2.5.2 Arginase	18
2.5.3 Ornithine-transaminase	19
2.5.4 Glutaminezuur-dehydrogenase (NAD-specifiek)	19
2.5.5 Threonine-dehydratase	20
2.5.6 Proteïnase	20
2.5.7 Asparaginase	20
2.5.8 Glutaminase	21
2.6 Chemische bepalingen	21
2.6.1 Koolhydraat	21
2.6.2 Stikstof in diverse celfrakties	21
2.6.3 Deoxyribonucleïnezuur	21
2.6.4 Vrije aminozuren	22
2.6.5 Vrij arginine	22
2.6.6 Ureum	22
2.6.7 Δ^1 -Pyrroline-5-carbonzuur	23
2.6.8 Ammoniak	23
2.6.9 Eiwit	24

HOOFDSTUK 3 DE ARGININE-AFBRAAKWEG IN GIST, MECHANISME EN INDUCEERBAARHEID	25
3.1 Inleiding	25
3.2 Arginase of arginine-deiminase?	25
3.3 Ornithine-transaminase	27
3.4 Induktie en repressie van arginase en OTA	27
3.5 Diskussie	30
3.6 Samenvatting	31
HOOFDSTUK 4 DEREPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA TIJDENS STIKSTOF-UITPUTTING	32
4.1 Inleiding	32
4.2 Verband tussen de derepressie en de energievoorziening	33
4.3 Verschijnselen die de derepressie tijdens stikstof-uitputting begeleiden	35
4.4 Derepressie bij andere giststammen	37
4.5 Invloed van de koolstofbron op de derepressie	39
4.6 De derepressie van arginase en OTA in gist na uitputting van verschillende nutriënten	41
4.7 Invloed van stikstof-verbindingen op de synthese van arginase en OTA	42
4.8 Diskussie	47
4.9 Samenvatting	51
HOOFDSTUK 5 INVLOED VAN MYO-INOSITOL OP DE VORMING VAN ARGINASE EN OTA	53
5.1 Invloed van vitaminen op de repressie van arginase en OTA door stikstof-verbindingen	53
5.2 Invloed van myo-inositol op de derepressie van arginase en OTA	54
5.3 Diskussie	58
5.4 Samenvatting	61
HOOFDSTUK 6 HET MECHANISME VAN DE REPRESSIE DOOR STIKSTOF-VERBINDINGEN	62
6.1 Inleiding	62
6.2 Invloed van uracil- en adenine-analogen op de derepressie tijdens stikstof-uitputting	63
6.3 Invloed van stikstof-uitputting op gist die in arginine-houdende media werd gekweekt	65
6.4 Invloed van voorbehandeling van de gist op de derepressie tijdens stikstof-uitputting	67
6.5 Diskussie	68
6.6 Samenvatting	69
HOOFDSTUK 7 ANDERE MECHANISMEN IN DE REGULATIE DER ARGININE-AFBRAAK	70
7.1 Inleiding	70
7.2 Remming van arginase en OTA door aminozuren en andere stikstof-verbindingen	70
7.3 Remming van arginase door reactie-produkten	72
7.4 Inaktiveringsrepressie	73
7.5 Diskussie	73
7.6 Samenvatting	75
HOOFDSTUK 8 OVER DE COFAKTOR VAN GISTARGINASE IN VIVO	76
8.1 Inleiding	76
8.2 pH-aktiviteitskrommen van diverse arginase-metaalkomplexen	77

8.3 Natieve gistarginase	79
8.4 Invloed van remstoffen op gistarginase	82
8.5 Kinetische konstanten van gistarginase	82
8.6 Invloed van ijzer-deficiëntie op natieve gistarginase	84
8.7 Discussie	88
8.8 Samenvatting	91
HOOFDSTUK 9 ALGEMENE DISKUSSIE EN SAMENVATTING	93
9.1 De arginine-afbraakweg in gist	93
9.2 Eigenschappen van gistarginase	93
9.3 Regulatie van de arginine-afbraak door enzymremming	95
9.4 Inductie van arginase en OTA door arginine	95
9.5 Kataboliet-repressie en inaktiveringsrepressie	96
9.6 Repressie van arginase en OTA door stikstof-verbindingen en myo-inositol	96
9.7 Mechanisme van de regulatie der enzymvorming	98
9.8 Invloed van stikstof-uitputting op gist	99
9.9 Samenvatting	100
CHAPTER 9 GENERAL DISCUSSION AND SUMMARY	101
9.1 The pathway of arginine breakdown in yeast	101
9.2 Properties of yeast arginase	101
9.3 Regulation of arginine breakdown by enzyme inhibition	103
9.4 Induction of arginase and OTA by arginine	103
9.5 Catabolite repression and inactivation repression	103
9.6 Repression of arginase and OTA by nitrogen compounds and myo-inositol	104
9.7 Mechanism of the regulation of enzyme production	106
9.8 Effect of nitrogen starvation on yeast	107
9.9 Summary	108
VERANTWOORDING	109
LITERATUURLIJST	110

LIJST VAN GEBRUIKTE AFKORTINGEN

DNA	deoxyribonucleïnezuur
EDTA	dinatrium-ethyleendiamine-tetraacetaat
K_m	MICHAELIS-konstante
K_{orn}	inhibitie-konstante voor ornithine
mM	millimolair
mmol	millimol
μ M	mikromolair
μ mol	mikromol
NAD	nicotinamide-adenine-dinucleotide
OTA	ornithine-transaminase
RNA	ribonucleïnezuur
spec. aktiv.	specifieke aktiviteit
Tris	tris-(hydroxymethyl)-aminomethaan

SYSTEMATISCHE NAMEN VAN VERMELDE ENZYMEN

voor zover genoemd in het 'Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry' (1961)

Triviale naam	codenummer	Systematische naam
arginase	3.5.3.1	L-arginine-ureohydrolase
arginine-decarboxylase	4.1.1.19	L-arginine-carboxy-lyase
arginine-deïminase	3.5.3.6	L-arginine-iminohydrolase
asparaginase	3.5.1.1	L-asparagine-amidohydrolase
aspartase	4.3.1.1	L-aspartaat-ammoniak-lyase
β -galaktosidase	3.2.1.23	β -D-galaktoside-galactoïdrolase
α -glukosidase	3.2.1.20	α -D-glukoside-glukoïdrolase
glutaminase	3.5.1.2	L-glutamine-amidohydrolase
glutamine-synthetase	6.3.1.2	L-glutamaat: ammoniak-ligase (ADP)
glutaminezuur-dehydroge- nas (NAD)	1.4.1.2	L-glutamaat: NAD-oxidoreduktase (deaminerend)
histidase	4.3.1.3	L-histidine-ammoniak-lyase
malaat-dehydrogenase	1.1.1.37	L-malaat: NAD-oxidoreduktase
D-melkzuur-dehydrogenase	1.1.1.28	D-laktaat: NAD-oxidoreduktase
nitraat-reduktase	1.9.6.1	cytochroom: nitraat-oxidoreduktase
ornithine-transaminase	2.6.1.13	L-ornithine: 2-oxozuur-aminotransferase
ornithine-transcarbamoï- lase	2.1.3.3	carbamoïlfosfaat: L-ornithine-carbamoïltrans- ferase
orotidylaat-decarboxylase	4.1.1.23	orotidine-5'-fosfaat-carboxy-lyase
threonine-dehydratase	4.2.1.16	L-threonine-hydro-lyase (deaminerend)
urease	3.5.1.5	ureum-amidohydrolase

HOOFDSTUK 1

INLEIDING EN LITERATUUROVERZICHT

1.1 PROBLEEMSTELLING EN INHOUD

Arginine is één der basische aminozuren. Het komt universeel voor als bouwsteen van eiwitten. Verder speelt het een belangrijke rol bij de vorming van ureum in de lever van zoogdieren en andere ureotelische organismen. Bakkersgist bestaat voor 2,5% uit L-arginine (MOJONNIER, HEDRICK en PORTER, 1955). Ook de fraktie van de vrije aminozuren in gist bevat veel arginine. COWIE en McCLURE (1959) vonden dat *Candida utilis* per 100 g droog celmateriaal 1,1 g vrij arginine bevat; in dezelfde gist vonden zij bovendien 3,7% gebonden arginine.

De meeste stammen van *Saccharomyces cerevisiae* zijn in staat te groeien in media met L-arginine als enige N-bron. Ook in de complexe media waarin gist op industriële schaal wordt gekweekt, speelt het arginine een belangrijke rol bij de stikstofvoorziening. BARTON-WRIGHT (1952) toonde aan dat in gist gekweekt in wort 25% van de geassimileerde stikstof afkomstig is van arginine uit het medium.

Ondanks het grote belang van arginine voor de giststofwisseling was er, toen dit onderzoek werd begonnen (1961), slechts weinig werk gedaan over de afbraak van arginine door bakkersgist. Bovendien spraken de toen beschikbare literatuurgegevens elkaar tegen. Mede hierom werd besloten de arginine-afbraak in bakkersgist aan een nader onderzoek te onderwerpen. De resultaten van dit werk zijn in Hoofdstuk 3 beschreven.

Het onderzoek werd later uitgebreid met een studie van de wijze waarop de synthese van arginine-afbrekende enzymen in gist wordt gereguleerd. Dit werk vormt het grootste deel van het hier gerapporteerde (Hoofdstuk 4 tot 7).

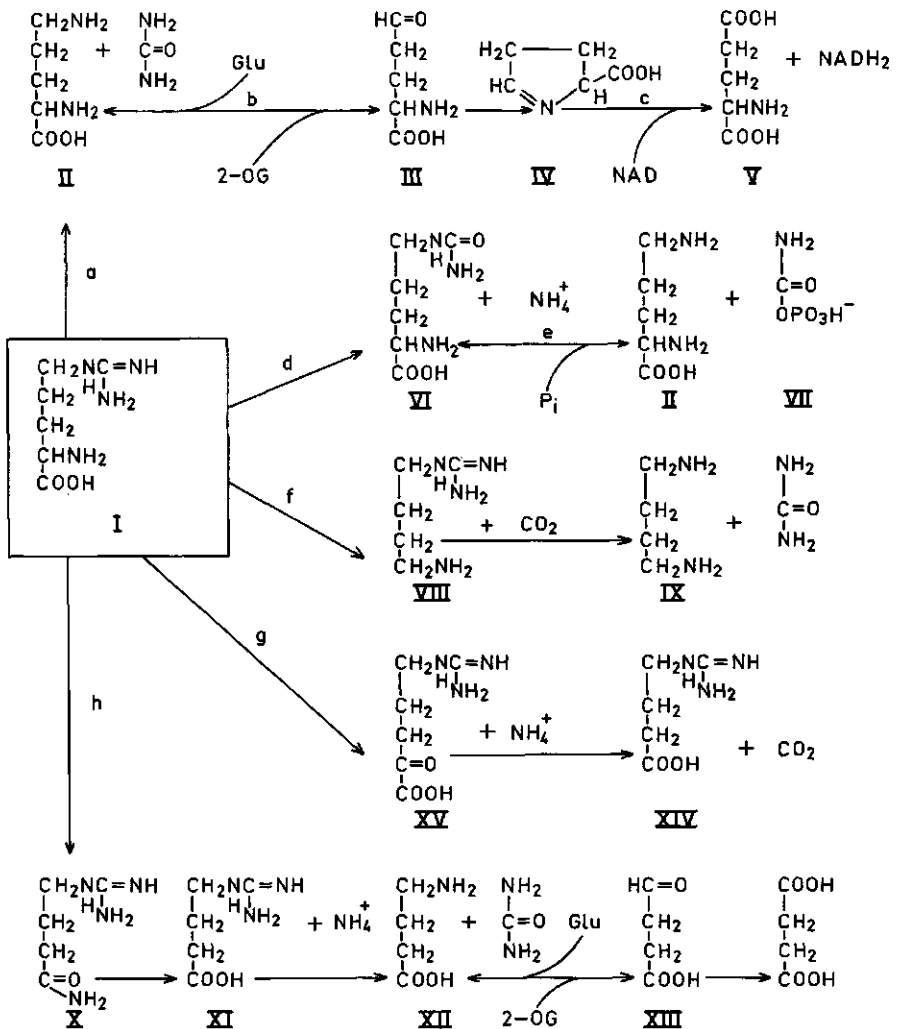
Tevens werd aandacht geschonken aan enkele eigenschappen van de in gist voorkomende arginase. Dit onderzoek was in het bijzonder gericht op de aard van de metaalionen die in vivo als cofactor aan de arginase zijn gebonden (Hoofdstuk 8).

1.2 LITERAATUUR OVER DE AFBRAAK VAN ARGININE

1.2.1 Inleiding

Het mechanisme van de arginine-afbraak is in vele planten en dieren bestudeerd. Gedurende de laatste jaren is een merkwaardig groot aantal afbraakmechanismen bekend geworden. Het langst bekend is de arginase-reaktie (zie Schema 1), waardoor L-arginine hydrolytisch wordt gesplitst in equimolaire hoeveelheden L-ornithine en ureum. In 1904 werd deze reaktie voor het eerst beschreven door KOSSEL en DAKIN in runderlever. Later toonden KREBS en

Schema 1. Arginine - afbraakwegen



I = arginine; II = ornithine; III = glutaminezuur- γ -semialdehyde; IV = Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat; V = glutaminezuur; VI = citrulline; VII = carbamoylfosfaat; VIII = agmatine; IX = putrescine; X = γ -guanidinobutyramide; IX = γ -guanidinoboterzuur; XII = γ -aminoboterzuur; XIII = barnsteenzuur-semialdehyde; XIV = γ -guanidinoboterzuur; XV = 5-guanidino-2-oxoglutaarzuur; a = arginase; b = ornithine-transaminase; c = Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaatdehydrogenase; d = arginine-deïminase; e = ornithine-transcarbamoylase; f = arginine-decarboxylase; g = L-aminozuur-oxidase; h = arginine-decarboxy-oxidase; Glu = glutaminezuur; NAD = nicotamide-adenine-dinucleotide; 2-OG = 2-oxoglutaarzuur; P_i = fosfaat.

HENSELEIT (1932) aan dat de reactie de laatste stap is van de ureumsynthese in de ornithine-cyclus. Uit het naast ureum uit arginine gevormde ornithine wordt door enzymen van deze cyclus weer arginine gesynthetiseerd. Men mag hier daarom niet spreken van arginine-afbraak in eigenlijke zin. De tot nu toe bekende afbraakwegen waardoor arginine tot intermediären van de algemene stofwisseling wordt omgezet, worden hiernaast vermeld. De romeinse cijfers verwijzen naar de structuurformules in Schema 1.

1.2.2 Arginase-weg

Deze werd voor het eerst aangetoond in *Bacillus subtilis* (DE HAUWER, LAVALLÉ en WIAME, 1964) en, onafhankelijk hiervan, in gist (tijdens dit onderzoek, zie Hoofdstuk 3 en MIDDELHOVEN, 1964). L-Arginine (I) wordt door middel van arginase hydrolytisch gesplitst in L-ornithine (II) en ureum. Het ornithine wordt door ω -transaminering met 2-oxoglutaraat vermoedelijk omgezet tot L-glutaminezuur- γ -semialdehyde (III), dat onmiddellijk spontaan ringsluiting ondergaat. Zo wordt Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat (IV) gevormd, dat in *Bacillus subtilis* en in gist (BECHET en WIAME, 1964) door dehydrogenering wordt omgezet tot glutaminezuur (V). De laatste reactie maakt tevens deel uit van de proline-afbraakweg. In beide bestudeerde mikroörganismen wordt deze reactie door twee afzonderlijke enzymen gekatalyseerd, waarvan één door arginine en het andere door proline wordt geïnduceerd. De gehele arginase-weg is later ook aangetoond in *Bacillus licheniformis* (RAMALEY en BERNLOHR, 1966) en in *Neurospora* (CASTAÑEDA, MARTUSCELLI en MORA, 1967). Het veelvuldig voorkomen van ornithine-transaminase (SCHER en VOGEL, 1957) en van arginase in dieren, hogere planten, schimmels, algen en gram-positieve bacteriën doet vermoeden dat deze afbraakweg niet tot genoemde mikroörganismen is beperkt.

1.2.3 Arginine-deïminase-weg

Deze weg werd vroeger, en wordt nog wel, genoemd het arginine-dihydrolase-systeem. De eerste stap is de hydrolyse van arginine tot citrulline (VI) en NH_3 door middel van arginine-deïminase. In *Streptococcus faecalis* (DEIBEL, 1964) en in *Pseudomonas* (STALON, RAMOS, PIÉRARD en WIAME, 1967) wordt citrulline vervolgens fosforolytisch gesplitst tot L-ornithine (II) en carbamoylfosfaat (VII). Het laatste kan zijn energierijke fosfaatgroep op ADP overdragen. Deze reactie stelt de genoemde bacteriën in staat anaëroob te groeien met L-arginine als energiebron. De ornithine-transcarbamoylase die citrulline tot ornithine en carbamoylfosfaat splitst is in *Pseudomonas* niet gelijk aan het enzym dat deze reactie in omgekeerde richting katalyseert, als onderdeel van de arginine-biosynthese (RAMOS, STALON, PIÉRARD en WIAME, 1967).

Arginine-deïminase is tot nu toe slechts enkele malen buiten het bacterie-rijk aangetoond. Zowel bij gram-positieve als gram-negatieve bacteriën komt het enzym tamelijk veel voor. Of en op welke wijze het ornithine dat uit citrulline wordt gevormd verder wordt afgebroken is niet onderzocht. Misschien speelt ornithine-transaminase, dat evenwel niet in gram-negatieve bacteriën voorkomt (SCHER en VOGEL, 1957), bij dit proces een rol.

Een variatie op deze afbraakweg werd aangetoond in *Tetrahymena pyriformis*. In dit protozo wordt citrulline niet fosforolytisch, maar hydrolytisch gesplitst tot ornithine, CO₂ en NH₃ (HILL en VAN EYS, 1965). Vervolgens wordt ornithine getransamineerd (HILL en CHAMBERS, 1967).

1.2.4 Decarboxylase-weg

Door *Aeromonas shigelloides* wordt arginine gedecarboxyleerd tot agmatine (VIII), dat vervolgens hydrolytisch gesplitst wordt tot ureum en putrescine (IX) (LECLERC, OSTEUX en LA RIVIÈRE, 1966). De arginine-decarboxylase komt veel bij enterobacteriën voor.

1.2.5 Decarboxy-oxidase-weg

Door *Streptomyces griseus* wordt arginine onder invloed van arginine-decarboxy-oxidase omgezet tot γ -guanidinobutyramide (X) (THOAI, THOMÉ-BEAU en PHO, 1962). Het enzym wordt uitsluitend gevormd indien arginine als enige C- en N-bron dienst doet. Verdere afbraak tot barnsteenzuur verloopt met γ -guanidinoboterzuur (XI), γ -aminoboterzuur (XII) en barnsteenzuur-semialdehyde (XIII) als tussenprodukten. *Streptomyces griseus* bevat vrijwel geen arginase als arginine de enige C- en N-bron is; hoge arginase-activiteit wordt echter waargenomen na groei in een complex medium dat o.m. glukose en pepton bevat. Arginine-decarboxy-oxidase is ook aangetoond in de hepatopancreas van de zoetwaterslak *Limnaea stagnatis* (THOAI, ROBIN en PRADEL, 1957).

1.2.6 Transamidinerig

In varkensnier en ook in *Streptomyces griseus* komen enzymen voor die de amidinegroep van arginine kunnen overdragen op glycine, hydroxylamine en andere acceptors (WALKER, 1958). In de vruchtlichamen van de fungus *Panus tigrinus* is een dergelijke reactie aangetoond tussen arginine en γ -aminoboterzuur (XII), waarbij ornithine (II) en γ -guanidinoboterzuur (XIV) worden gevormd (MIERSCH en REINBOHR, 1967). De eventuele betekenis van deze reacties voor de arginine-afbraak is onduidelijk.

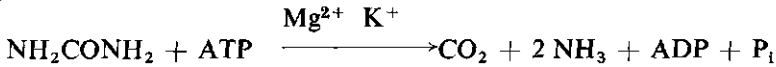
1.2.7 Oxidatieve deaminering

Met behulp van met ¹⁴C gemerkt arginine werd aangetoond dat in de zilverspar (*Picea glauca*) dit aminozuur gedeeltelijk wordt omgezet tot α -oxo- δ -guanidinovaleriaanzuur (XV) en vervolgens tot γ -guanidinoboterzuur (XIV) (DURRAN en RICHARDSON, 1966). Het eerstgenoemde produkt werd eerder aangetoond in *Proteus vulgaris* (STUMPF en GREEN, 1944) en in kalkoenlever (BOU-LANGER en OSTEUX, 1956).

1.2.8 Ureum-afbraak

Het bij enkele arginine-afbraakwegen vrijkomende ureum wordt door de meeste organismen waarschijnlijk afgebroken tot CO₂ en NH₃ door urease. Dit enzym komt in vele bacteriën, schimmels en hogere planten voor. Er zijn evenwel ook vele organismen die ureum uitstekend als enige N-bron kunnen

gebruiken, maar desondanks geen urease bevatten. Tot deze groep behoren onder meer *Saccharomyces cerevisiae* en *Candida utilis*. Uit celextracten van de laatste gist, alsmede van het groenwier *Chlorella*, werd onlangs door ROON en LEVENBERG (1968) een enzym gedeeltelijk gezuiverd dat de volgende reactie katalyseert:



Het enzym wordt gevormd tijdens groei met ureum als enige N-bron. Het wordt door avidine geremd en bevat daarom vermoedelijk biotine. Mogelijk speelt dit enzym ook een rol bij de afbraak van het tijdens de arginine-afbraak vrijkomende ureum.

1.2.9 De arginine-afbraak in gist

Toen dit onderzoek werd begonnen (1961) waren over de arginine-afbraak door *Saccharomyces* slechts twee, elkaar tegensprekende, publikaties verschenen. In de eerste (EDLBACHER en BAUR, 1938) werd een arginase beschreven, die slechts weinig van die in runderlever verschilde. ROCHE en LACOMBE (1952) waren niet in staat dit onderzoek te bevestigen. In plaats van arginase toonden zij in bakkergist een arginine-deïminase aan, die sterk in eigenschappen bleek fa te wijken van het overeenkomstige enzym van *Streptococcus faecalis*.

1.3 LITERATUUR OVER DE REGULATIE VAN STOFWISSELINGSPROCESSEN

1.3.1 Inleiding

Een nauwkeurig op de behoefte afgestemde biosynthese, een doelmatige verwerking van beschikbare bouwstenen en substraten, en een aan de levensomstandigheden aanpasbaar enzympatroon verhinderen verkwisting van materiaal en energie en stellen het organisme in staat onder verschillende omstandigheden zo snel mogelijk te groeien en daardoor een gunstige concurrentiepositie in te nemen. De laatste jaren zijn tal van regulatie-mechanismen bekend geworden die bijdragen tot een doelmatig verloop van de stofwisseling. In dit overzicht (zie ook: MIDDELHOVEN, 1965c) zullen alleen die mechanismen worden genoemd die belangrijk zijn voor de interpretatie van de in dit onderzoek verrichte waarnemingen. De tot nu toe bekende regulatie-mechanismen kunnen in twee groepen worden ingedeeld, al naar gelang de werking dan wel de vorming of afbraak van de enzymen erdoor wordt beïnvloed. In het eerste geval wordt de werking van in de cel aanwezige enzymen geremd of gestimuleerd door metabolieten. In het tweede geval wordt het enzympatroon van de cel gewijzigd door remming of stimulering van de expressie van de betreffende structurele genen, of door inaktivering of afbraak van enzymen.

1.3.2 Eindproduktremming

Dit verschijnsel wordt algemeen aangetroffen in biosynthetische stofwisselingswegen. Het houdt in dat het eindproduct van een biosynthetische reactie-

keten het eerste enzym van die keten omkeerbaar remt. De regulerende betekenis van het verschijnsel is duidelijk. Zodra in de cel meer van een bouwsteen (b.v. aminozuur, purine- of pyrimidinebase) wordt gemaakt dan verbruikt, wordt door remming van het eerste enzym de verdere biosynthese verhinderd. Als de concentratie door verder verbruik tot onder het remmende niveau zakt, wordt de synthese onmiddellijk hervat. Eindproductremming is voor het eerst aangetoond door NOVICK en SZILARD (1954) in de tryptofanweg van *Escherichia coli*. Sindsdien is het verschijnsel algemeen aangetoond in vele verschillende organismen. De regulatie berust op tegenkoppeling (Engels: *feed-back*).

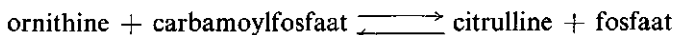
Wegens de meestal geringe chemische verwantschap tussen remmend eindproduct en substraten van het geremde enzym wordt het verschijnsel ook wel allosterische enzymremming genoemd. De eindproductremming is meestal niet-kompetitief. Allosterische enzymen zijn vaak oligomere polypeptiden (MONOD, WYMAN en CHANGEUX, 1965).

In katabolische reaktieketens werd eindproductremming nog slechts weinig bestudeerd. Onlangs werd een dergelijk verschijnsel aangetoond in de histidineafbraakweg van *Pseudomonas putida* (HUGH, ROTH en HUNTER, 1968). In dit organisme wordt het tweede enzym van de keten, urocanase, dat urocaanzuur omzet tot imidazolonpropionzuur, competitief geremd door het eindproduct van de keten, succinaat.

1.3.3 Regulatie door enzymkinetiek

Evenmin als andere katalysatoren hebben enzymen invloed op de ligging van de door hen gekatalyseerde evenwichtsreacties. Die wordt geheel bepaald door thermodynamische grootheden. Wel wordt mede door de affiniteit van het enzymmolekuul tot substraten en reactieproducten de reactiesnelheid bepaald. Als een enzym weinig affiniteit heeft tot zijn substraten, zal de reactie alleen dan snel verlopen wanneer hoge substraatconcentraties aanwezig zijn, die in staat zijn het enzym te verzadigen. Als het actief centrum van een enzym grote affiniteit heeft tot één of meer reactieproducten, zal bij ophoping van de laatste de reactiesnelheid aanzienlijk verminderen. Dit laatste verschijnsel is duidelijk van betekenis voor de regulatie van de stofwisseling, in het bijzonder voor de controle van afbraakreacties. Zo wordt de histidine van *Pseudomonas putida*, het eerste enzym van de histidineafbraakweg, competitief geremd door het reactieproduct urocanaat (HUGH, ROTH en HUNTER, 1968). Op deze wijze wordt de voorraad histidine in dit organisme tegen ongewenste afbraak beschermd.

De betekenis van de enzymkinetiek voor de regulatie van de stofwisseling wordt aangetoond door het vóórkomen van multiële enzymen. Deze komen algemeen voor, wanneer een enzymreactie in de cel meer dan één functie heeft. Veelal worden dan voor die verschillende functies verschillende enzymen gevormd. Een goed bestudeerd voorbeeld zijn de ornithine-transcarbamoylases van *Pseudomonas* (STALON, RAMOS, PIÉRARD en WIAME, 1967). Deze katalyseren de omkeerbare reactie:



Bij deze bacterie is de citrulline-vorming een stap in de arginine-synthese; de fosforolyse van citrulline speelt een rol bij de arginine-afbraak. Voor beide functies blijken aparte enzymen te worden gevormd, elk met zijn eigen karakteristieke regulatie-mechanismen en elk met kinetische eigenschappen die het voor zijn functie het meest geschikt maken (RAMOS, STALON, PIÉRARD en WIAME, 1967).

1.3.4 Induktie en repressie

Sinds lang is bekend dat het enzympatroon van de cel, vooral dat van mikroorganismen, sterk varieert met de levensomstandigheden. Dit vindt zijn verklaring onder meer in een specifieke beïnvloeding van de enzymsynthese door bestanddelen van het kweekmedium. Zo wordt de vorming van biosynthetische reaktieketens geremd door de aanwezigheid van het eindproduct van die keten (enzymrepressie). Verder worden enzymen van afbraakwegen veelal alleen dan in hoeveelheden van enige betekenis gevormd, als het substraat van die afbraakweg in het medium aanwezig is (induktie).

De wijze waarop laag-moleculaire stoffen specifiek in de vorming van enzymen ingrijpen is het meest intensief bestudeerd bij het laktose-afbrekende enzymstelsel van *Escherichia coli* door de werkgroep van MONOD en JACOB. Door deze auteurs is in 1961 het operonmodel opgesteld (JACOB en MONOD, 1961). Na enkele wijzigingen en aanvullingen door andere auteurs voldoet het operonmodel als verklaring voor de induktie van de betrokken enzymen, zowel in de wilde stam als in mutanten van deze waarin de regulatie is verstoord. De regulatie van de enzymvorming verloopt in dit systeem als volgt: De structurele genen van drie enzymen, β -galaktosidase, β -galaktoside-permease en galaktoside-transacetylase bevinden zich achter elkaar in het genoom van de bacterie. De transkriptie van deze genen verloopt gelijktijdig en leidt tot vorming van één polycistronisch boodschapper-RNA waarin de drie genen zijn gekopieerd. Een dergelijke eenheid van transkriptie, waarbij enkele structurele genen zijn betrokken, wordt door JACOB en MONOD een operon genoemd. De werking van het operon wordt bepaald door de repressor, een makromolekuul dat het product is van het regulatorgen dat de werking van het operon beheerst, en dat zich op enige afstand daarvan in het genoom bevindt.

In het geval van het laktose-operon van *E. coli* heeft het product van het regulatorgen (de apo-repressor) zelf affiniteit tot de operator, welke zich aan het begin van het operon bevindt. Als de operator door de repressor geblokkeerd is, is transkriptie van het operon onmogelijk (repressie). Laktose en verwante verbindingen kunnen zich aan de apo-repressor binden. Deze verliest daardoor zijn affiniteit tot de operator zodat het operon voor transkriptie open komt te liggen (induktie of derepressie). Induktie moet dus worden opgevat als het opheffen van repressie.

In het geval van represserbare, biosynthetische systemen wordt de regulatie van de enzymvorming verklaard door aan te nemen dat de apo-repressor zelf

geen affiniteit tot de operator heeft, maar deze pas verkrijgt na interactie met het represserende eindprodukt van de reaktieketen. Doordat boodschapper-RNA en repressor instabiele molekulen zijn, is het regulatie-mechanisme zoals dat door het operonmodel wordt beschreven, zeer wendbaar. Belangrijk bewijsmateriaal voor het operonmodel werd aangevoerd na isolatie (GILBERT en MÜLLER-HILL, 1966) en vergaande zuivering (RIGGS en BOURGEOIS, 1968) van de repressor van het laktose-operon. Het blijkt een eiwit te zijn, in staat tot interactie met isopropyl- β -D-thiogalaktoside – dit is een induktor van het systeem – en met DNA (RIGGS, BOURGEOIS, NEWBY en COHN, 1968).

Het meest karakteristieke in het operonmodel is dat de regulatie van de enzym synthese gedacht wordt uitsluitend plaats te vinden op transkriptie-niveau. Dit vormt het belangrijkste verschil tussen het operonmodel en andere modellen die later werden opgesteld ter verklaring van verschijnselen die met het operonmodel moeilijk zijn uit te leggen.

AMES en HARTMAN (1963) stelden een model voor, waarin de snelheid van de enzym synthese wordt bepaald door de beschikbaarheid van bepaalde aminocyl-transfer-RNA's. Elk aminozuur wordt immers in de genetische kode gekenmerkt door zijn eigen karakteristieke basetriplet. De genetische kode is evenwel gedegenereerd, dat wil zeggen vaak koderen meer dan één basetriplet voor één aminozuur. Dit impliceert dat bij de translatie (de vorming van de polypeptideketen naar voorbeeld van het boodschapper-RNA) van het aminozuur ook meer dan één transfer-RNA aanwezig moet zijn, één algemeen voorkomende en één of meer zeldzame. AMES en HARTMAN (1963) stellen in hun modulatie-theorie voor dat de snelheid van de translatie door de beschikbaarheid van de zeldzame transfer-RNA's kan worden gereguleerd. Een repressor is dan een verbinding die zo'n zeldzaam transfer-RNA afbreekt of anderszins inaktiveert. Door STENT (1964) werd de modulatie-theorie uitgebreid door de obligatie koppeling van translatie en transkriptie aan te nemen. Volgens hem is binding aan, en polypeptide-synthese op het in statu nascendi zijnde boodschapper-RNA noodzakelijk voor voltooiing der synthese van het laatste. Voor de modulatie-theorie is tot nu toe minder bewijsmateriaal aangevoerd dan voor het operonmodel.

In de modellen opgesteld door ENGLANDER en PAGE (1965) en door GRUBER en CAMPAGNE (1965) wordt verondersteld dat de groei van de polypeptideketen, het tot stand komen van de juiste tertiaire structuur en het loslaten van het enzymmolekuul van het polysoom versneld of vertraagd kunnen worden door de aanwezigheid van enzym-substraten, eindprodukten, coënzymen of corepressors. In deze modellen wordt de regulatie van de enzym synthese gedacht geheel plaats te vinden op translatieniveau.

Door VAN DAM c.s. (1965) werd de α -glukosidase-synthese in een celvrij systeem van *Saccharomyces carlsbergensis* bestudeerd. Zij komen tot een model, dat later door BLOEMERS (1967) enigszins werd gewijzigd. Voor voltooiing en loslaten van de α -glukosidase van het polysoom is de aanwezigheid van de induktor (maltose) noodzakelijk. Bij afwezigheid van de induktor worden onvoltooid α -glukosidase-molekulen afgebroken; hierbij komt een glycopeptide

vrij dat specifiek de synthese van α -glukosidase remt. Het remmende glycopeptide is, ook in het celvrije systeem, onderhevig aan afbraak. De remming wordt door overmaat gereduceerd glutathion opgeheven. De regulatie van de enzym-synthese komt in het model van VAN DAM c.s. (1965) voort uit een tegenkoppeling tussen afbraak van enzym-in-wording en enzym-synthese.

De enzym-systemen die in mikroörganismen ingewikkelde suikers, aminozuren en dergelijke afbreken tot intermediairen van de glukose-stofwisseling en de citroenzuurcyclus zijn veelal adaptatief. Dat wil zeggen, ze worden meestal alleen dan gevormd indien het substraat (de induktor) in het medium aanwezig is. Induktie vindt overigens ook vaak plaats als chemisch verwante stoffen worden aangeboden, die niet noodzakelijk substraten van de reaktieketen behoeven te zijn (gratis induktie). Bij enkele systemen is aangetoond, dat de reaktieketen in vivo niet geïnduceerd wordt door het substraat, maar door het reaktieproduct van de eerste afbraakstap. Zo worden de enzymen van de tryptofan-afbraakweg in *Pseudomonas fluorescens* geïnduceerd door kynurenine, het reaktieproduct van de eerste stap (PALLERONI en STANIER, 1964). Hetzelfde verschijnsel is aangetoond bij de histidine-afbraak door *Aerobacter aerogenes*. De induktor van de hierbij werkzame enzymen is urocanaat, het eerste tussenproduct van het proces (MAGASANIK c.s., 1965). Verder is de induktie door een reaktieproduct aangetoond bij de afbraak van catechol en protocatechuzuur door *Pseudomonas putida* (ORNSTON, 1966). De induktie van afbraakwegen door intermediairen komt evenwel niet universeel voor. Zo wordt de induktie van het laktose-operon van *E. coli* bewerkstelligd door laktose en verwante β -galaktosiden en β -thiogalaktosiden, verbindingen die of substraten zijn voor het enzym-systeem of chemisch nauw verwant zijn aan die substraten.

1.3.5 Kataboliet-repressie

Sinds vele jaren is bekend dat induceerbare enzym-systemen vaak niet worden gevormd, indien het kweekmedium naast het inducerende substraat glukose bevat. Kennelijk is glukose in staat de induktie van bepaalde enzymen tegen te werken. Dit verschijnsel wordt in de oude mikrobiologische literatuur het glukose-effekt genoemd (EPPS en GALE, 1942). Later onderzoek leerde dat niet alleen glukose, maar ook andere verbindingen hiertoe in staat zijn. Door MAGASANIK (1961) is toen voorgesteld het verschijnsel kataboliet-repressie te noemen. Het mechanisme stelt de cel in staat de afbraak van ingewikkelde verbindingen te verhinderen, zolang gemakkelijker assimileerbare substraten aanwezig zijn. Induceerbare enzymen die aan kataboliet-repressie onderhevig zijn worden in het algemeen slechts dan gemaakt als ze voor de groei noodzakelijk zijn. Kataboliet-repressie wordt bij vele organismen waargenomen en is een specifiek verschijnsel. Dit laatste blijkt uit de waarneming dat in mutanten waarin één enzym-systeem ongevoelig voor kataboliet-repressie is geworden, andere enzym-systemen zich als in de wilde stam gedragen (MAGASANIK, 1963).

In enkele gevallen is het gelukt de identiteit van de represserende kataboliet vast te stellen. Soms blijkt deze het eindproduct van de betrokken afbraakweg te zijn, soms niet. Zo worden de enzymen van de 2-oxoadipaatweg van *Pseudo-*

monas fluorescens, die amandelzuur via benzoëzuur, catechol en 2-oxoadipaat omzetten tot succinyl-CoA en acetyl-CoA, alle sterk door barnsteen- en geropressie. Bovendien represseren de genoemde intermediairen de enzymen waarmee zij uit amandelzuur kunnen worden gevormd, en induceren zij de enzymen die hun afbraak tot succinyl-CoA en acetyl-CoA katalyseren (MANDELSTAM, 1964). In vele andere gevallen is de represserende kataboliet niet als eindproduct van de gerepressie te beschouwen. Zo blijkt in mutanten van *Aerobacter aerogenes* waarin de histidase niet langer in aanwezigheid van glukose wordt gerepressie, de vorming van glukonzuur uit glukose te zijn verstoord. De inductie van histidase wordt in deze mutant door glukonzuur wel verhinderd. NEIDHARDT (1960) konkludeerde uit deze waarnemingen dat de represserende kataboliet van dit systeem glukonzuur of een van zijn derivaten is. Deze verbindingen zijn niet verwant aan de eindproducten van de histidine-afbraak in dit organisme, glutaminezuur, CO₂ en NH₃.

Over het mechanisme van de kataboliet-repressie is nog weinig bekend. LOOMIS en MAGASANIK (1965, 1967) meenden voor het laktose-operon van *E. coli* een speciaal kataboliet-repressorgen (CR-gen) te hebben aangetoond, dat een apo-repressor zou produceren die door interactie met de represserende katabolieten in staat zou zijn de transkriptie van het laktose-operon te verhinderen. RICKENBERG c.s. (1968) toonden evenwel aan dat het laktose-systeem in de CR-mutanten van LOOMIS en MAGASANIK wel onderworpen is aan kataboliet-repressie door glukose-6-fosfaat en glukonzuur als deze verbindingen aan het medium worden toegevoegd. Zij veronderstellen dat de CR-mutanten van LOOMIS en MAGASANIK in hun glukose-stofwisseling zijn gestoord en dat het bewijs voor een kataboliet-repressorgen niet is geleverd. PALMER en MOSES (1968) hebben aanwijzingen verkregen, dat de apo-repressor van het laktose-operon van *E. coli* in staat is tot interactie met kataboliet-corepressoren en dat daardoor zijn affiniteit tot de operator wordt vergroot. Een waarneming die hier mogelijk mee in verband staat is, dat de warmte-stabiliteit van de β -galaktosidase van *E. coli* wordt verminderd door de aanwezigheid van glukose-6-fosfaat en vooral van fructose-1,6-difosfaat (GEST en MANDELSTAM, 1966). Kennelijk heeft het enzym een herkenningsplaats voor deze verbindingen.

De kataboliet-repressie wordt niet in alle gevallen uitgeoefend door intermediairen van de glukose-stofwisseling. In enkele gevallen wordt de inductie van enzymsystemen duidelijk tegengewerkt door stikstof-verbindingen. Zo wordt de NAD-afhankelijke, katabolisch werkende glutaminezuur-dehydrogenase in *Neurospora crassa* (SANWALL en LATA, 1962) en in bakkersgist (HIERHOLZER en HOLZER, 1963) door NH₄⁺ gerepressie. Hetzelfde geldt voor de threonine-dehydratase (CENNAMO, BOLL en HOLZER, 1964) en de glutamine-synthetase (KOHLRAW, DRAGERT en HOLZER, 1965) van *Saccharomyces cerevisiae*. Ook de urease van *Hydrogenomonas* (KÖNIG, KALTWASSER en SCHLEGEL, 1966) wordt door NH₄⁺ gerepressie. In al deze gevallen, uitgezonderd de glutamine-synthetase, is NH₄⁺ een produkt van de reactie die door het gerepressieerde enzym wordt gekatalyseerd. Repressie van nitraat-reduktase door NH₄-zouten werd aangetoond in *Neurospora crassa* (KINSKY, 1961), *Asper-*

gillus nidulans (COVE, 1966), *Hansenula anomala* (PICHINOTY en MÉTÉNIER, 1967) en *Aerobacter aerogenes* (VAN 'T RIET, STOUTHAMER en PLANTA, 1968).

1.3.6 Inaktiveringsrepressie

Wanneer cellen van een mikroörganisme worden overgebracht van omstandigheden waaronder een bepaald enzymstelsel is gedereprimeerd, naar omstandigheden waaronder repressie van dat enzymstelsel optreedt, verminderen de specifieke activiteiten van die enzymen in het algemeen pas nadat groei en synthese van eiwit optreden. De repressie van enzymen heeft pas effect na enige generaties, wanneer de aanvankelijk aanwezige specifieke enzymactiviteiten door verdunning met nieuw-gevormd eiwit zijn verminderd.

Door de werkgroep van HOLZER is voor enkele enzymen aangetoond dat repressie kan samengaan met inaktivering of afbraak van reeds aanwezig enzym. Zo blijkt de glutamine-synthetase van *E. coli* te worden gereprimeerd door NH_4 -zouten en tevens te worden geïnactiveerd indien *coli*-cellen naar een NH_4 -bevattend medium worden overgebracht (MECKE, WULFF en HOLZER, 1966). In vitro blijkt dat in celextracten van *E. coli* de glutamine-synthetase-activiteit snel en irreversibel verdwijnt na toevoeging van glutamine, ATP en Mg-zouten, onder behoud van de glutamyl-transferase-activiteit van het enzym. Kennelijk wordt slechts één der beide actieve centra van het enzym irreversibel geïnactiveerd. De inaktivering van het enzym wordt veroorzaakt door binding van de nucleoside-groep van ATP aan het enzym, onder invloed van een speciaal inaktiveringsenzym (WULFF, MECKE en HOLZER, 1967).

Ook in gist is enzyminaktivering waargenomen. Eén der malaatdehydrogenases die in glukose-houdende media aan kataboliet-repressie onderhevig is, wordt geïnactiveerd als gist van een acetaat-medium naar een glukose-medium wordt overgebracht (WITT, KRONAU en HOLZER, 1966). Een later onderzoek gaf aanwijzingen dat de inaktivering ook verloopt bij remming van de eiwit-synthese door cycloheximide. Het herstel van de enzymactiviteit na terugbrengen van de gist in acetaat-medium is wel aan eiwitsynthese gekoppeld (DUNTZE, NEUMANN en HOLZER, 1968).

Inaktivering van de ornithine-transcarbamoylase van gist door vorming van een specifiek bindend eiwit, gelijktijdig met de repressie van het enzym door arginine, werd aangetoond door BECHET en WIAME (1965). Dit verschijnsel lijkt op inaktiveringsrepressie. Later onderzoek (MESSENGUY en WIAME, 1969) wees uit dat dit bindende eiwit een arginase is. Het oefent zijn remmende werking op ornithine-transcarbamoylase slechts uit in aanwezigheid van arginine en ornithine.

In de oudere literatuur zijn ook 'de-adaptaties' beschreven. SPIEGELMAN en REINER (1947) namen waar dat de activiteit van het galactose-afbrekende enzymstelsel van gist snel afneemt na het overbrengen van gist gekweekt in galactose-medium naar een glukose-medium. ROBERTSON en HALVORSON (1957) namen een dergelijk verschijnsel waar bij de maltose-afbrekende enzymen van gist. Het mechanisme van deze beide 'de-adaptaties' is niet nader bestudeerd.

De in deze paragraaf onder de naam inaktiveringsrepressie beschreven ver-

schijnselen hebben alle gemeen de snelle vermindering van enzymaktiviteiten – door afbraak of door inaktivering – die optreedt als mikroörganismen overgebracht worden naar represserende omstandigheden. Het is uit het voorgaande duidelijk, dat de inaktivering op zeer verschillende wijze tot stand kan komen. Omdat de-adaptatie en inaktiveringsrepressie tot nu toe vooral in afbrekende enzymssystemen van gist werden waargenomen, is er in dit literatuuroverzicht uitvoerig aandacht aan besteed.

1.4 LITERATUUR OVER DE COFAKTOR VAN ARGINASE

Sinds de opheldering van de rol die arginase speelt bij de ureum-synthese in de lever van ureotelische organismen (KREBS en HENSELEIT, 1932) werden aan de eigenschappen van dit enzym vele studies gewijd. HELLERMAN en PERKINS (1935) toonden aan dat de werking van leverarginase door tweewaardige metaalionen wordt gestimuleerd. Uitsluitend de bivalente kationen van Mn, Co, Ni en Fe zijn daartoe geschikt. De pH-aktiviteitskromme van het enzym varieert met het aktiverende metaalion. In aanwezigheid van Co- of Ni-ionen ligt de optimum-pH tussen 6,5 en 7,5; met Mn-ionen wordt een pH-optimum van 10 waargenomen (HELLERMAN en STOCK, 1936, 1938). Ook de arginase van bakkersgist blijkt door de kationen van Mn, Co, Ni en nog enkele metalen te worden geaktiveerd (EDLBACHER en BAUR, 1938). Aktivering van de arginase van 'jack beans' (*Canavalia*) door Mn-, Co-, Ni- en Fe-ionen werd waargenomen door STOCK, PERKINS en HELLERMAN (1938) en door ANDERSON (1945).

De arginases uit diverse bronnen worden niet alleen in vitro door bivalente metaalionen geaktiveerd, maar ook in vivo. Langdurige dialyse van celextracten veroorzaakt volledige inaktivering van de enzymaktiviteit. Gistarginase is in dit opzicht gevoeliger dan leverarginase (EDLBACHER en BAUR, 1938). Door dialyse geïnaktiveerde arginase-preparaten kunnen door toevoeging van de geschikte metaalionen weer geheel of gedeeltelijk worden gereaktiveerd. Deze reactie verloopt evenwel langzaam. De beste reaktivering verkrijgt men bij toepassing van hoge concentraties metaalionen, lange reaktietijden of bij verwarming (MOHAMMED en GREENBERG, 1945). Klaarblijkelijk is het voor de werking van het enzym nodig, dat het metaalion er chemisch aan gebonden wordt.

Reeds in de dertiger en veertiger jaren heeft men zich afgevraagd welk van de metaalionen die in vitro de werking van arginase stimuleren de cofaktor van het enzym in vivo is. EDLBACHER, KRAUS en WALTER (1932) konkluderen dat ionen van zware metalen, mogelijk Fe, de cofaktor in vivo zijn, omdat in ruwe extracten de arginase door KCN wordt geremd. Koolmonoxyde was evenwel zonder effekt. Desondanks komen EDLBACHER en ZELLER (1936) tot de konklusie dat Mn-ionen de natuurlijke cofaktor van leverarginase zijn, omdat reaktivering van gedialyseerd enzym in vitro met Mn^{2+} -zouten het beste verloopt en omdat Mn^{2+} -ionen het enzym beter tegen aantasting door trypsine beschermen dan Fe^{2+} -ionen. HELLERMAN en STOCK (1938) zuiverden leverarginase gedeeltelijk door acetone-fraktionering zonder tijdens deze procedure opzettelijk zouten van tweewaardige metalen toe te voegen. Dit enzympreparaat vertoonde een pH-

optimum van ongeveer 8. Bij toevoeging van Mn^{2+} -zouten verschoof dit naar 10. RICHARDS en HELLERMAN (1940) slaagden erin runderleverarginase 100-voudig te zuiveren, zonder opzettelijk aktiverende ionen toe te voegen. Met behulp van vlamemissiespektrografie konden zij van alle aktiverende metalen slechts Mn en Fe in hun preparaat aantonen. Na inaktivering van hun preparaat bij lage pH of door middel van $(NH_4)_2SO_4$ -precipitatie, bleken sporen Mn^{2+} -zouten in staat te zijn het enzym te reaktiveren. Met Fe^{2+} -zouten verliep de reaktivering minder gemakkelijk. Op grond van deze proeven kwamen RICHARDS en HELLERMAN (1940) tot de konklusie dat Mn^{2+} -ionen in vivo de cofaktor van leverarginase zijn, zonder een rol van Fe^{2+} -ionen geheel uit te sluiten.

In de veertiger jaren werd het probleem van de aard van de natuurlijke cofaktor van leverarginase bestudeerd met behulp van proefdieren die op een Mn-deficient diët werden gekweekt. BOYER, SHAW en PHILLIPS (1942) toonden in leverhomogenaten van Mn-deficiënte ratten minder arginase aan dan in de kontrolegroep. Toevoeging van Mn^{2+} -zouten in vitro verhoogde de arginase-aktiviteit tot 50% van die in de kontrolegroep. De N-uitscheiding was in de Mn-deficiënte groep nauwelijks verminderd. Door SHILS en MCCOLLUM (1943) werden deze proeven herhaald. Zij kwamen tot dezelfde waarnemingen als BOYER c.s., met het verschil dat toevoeging van Mn^{2+} -zouten aan leverhomogenaten van de Mn-deficiënte groep de arginase-aktiviteit geheel op het niveau van de kontrole-groep bracht. De N-uitscheiding was niet verminderd, zelfs niet als de proefdieren met grote doses ammoniumcitraat werden belast. Ook SMITH en ELLIS (1947) vonden in leverhomogenaten van Mn-deficiënte konijnen minder arginase-aktiviteit dan in normale proefdieren. Hoewel op de methode van enzymbepaling veel is aan te merken, wordt tegenwoordig op grond van de waarnemingen met Mn-deficiënte proefdieren algemeen aangenomen dat Mn^{2+} -ionen in vivo de cofaktor van arginase zijn. Nooit zijn pogingen gedaan deze konklusie te bevestigen door isolatie en bestudering van het natuurlijke arginase-metaal-komplex, ondanks de tamelijk grote stabiliteit van het laatste. De waarnemingen door EDLBACHER, KRAUS en WALTER (1932) en door HELLERMAN en STOCK (1938) gedaan aan natuurlijke arginase wijzen op de funktie van andere metaalionen.

Als de talrijke experimentele gegevens over leverarginase al twijfel laten over de aard van het in vivo aktiverende metaalion, hoeveel te meer is dit dan het geval bij de veel minder bestudeerde gistarginase. Daarom werd de aard van het in vivo aktiverende metaalion van de laatste aan een nader onderzoek onderworpen.

HOOFDSTUK 2

WERKWIJZEN EN MATERIALEN

2.1 HERKOMST VAN DE GEBRUIKTE CHEMIKALIËN

De verbindingen die als bestanddelen van het kweekmedium, als reagens in analytisch-chemische bepalingen of voor enzymbepalingen werden gebruikt, werden van verscheidene firma's betrokken. De namen van deze zijn in de hieronder volgende opsomming aldus afgekort: B, Brocades en Stheeman, Amsterdam; BDH, British Drug Houses, Poole, Engeland; D, Difco Laboratories, Detroit, Michigan; F, Fluka, Buchs, Zwitserland; H-R, Hoffman-La Roche, Basel, Zwitserland; K en K, K and K Laboratories, New York; K-L, Koch-Light Laboratories, Colnbrook-Buks, Engeland; L en I, Lamers en Indemans, 's-Hertogenbosch; M, Merck, Darmstadt, Duitse Bondsrepubliek; Myc, Mycofarm, Delft; NBC, Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio; Pharm, Pharmacia, Uppsala, Zweden; S, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri; Sch, Schuchardt, München, Duitse Bondsrepubliek.

DL-alanine (M); β -alanine (S); o-aminobenzaldehyde (F); p-aminobenzoëzuur (B); DL- α -aminoboterzuur (NBC); DL- β -aminoboterzuur (NBC); γ -aminoboterzuur (F); anthron (M); arginase, runderlever- (S); L-arginine-HCl (NBC); L-asparagine (M); DL-asparaginezuur (NBC); 8-azaguanine (NBC); 6-azaüracil (NBC); D-biotine (NBC); cadaverine-2HCl (F); caseïne (D); chlooramfenicol (Myc); choline-HCl (F); L-citrulline (NBC); creatine (M); cycloheximide (handelsnaam Actidione, K-L); L-cysteïne-HCl (M); diacetylmonoxim (Sch); difenylamine (B); dimethylglyoxim (B); 2,4-dinitrofenol (M); 2,4-dinitrofenylhydrazine (M); Na₂H₂-ethyleendiaminetetraäcetaat, EDTA (M); 5-fluoruracil (K en K); fenol (M); L-fenylalanine (NBC); Folin-Ciocalteu-reagens (BDH); L-glutamine (NBC); L-glutaminezuur (M); Na₂-glycerolfosfaat (B); glycine (B); L-histidine (H-R); DL-homocysteïne (NBC); DL-homoserine (NBC); 8-hydroxyquinoline (BDH); L-isoleucine (NBC); α -isonitrosopropiofenon (Sch); L-leucine (NBC); L-lysine-HCl (F); 2-mercaptoëthanol (F); L-methionine (NBC); 6-methylpurine (K-L); myo-inositol (B); nicotinamide (M); nicotinamide-adenine-dinucleotide, NAD (Myc); ninhydrine (NBC); L-ornithine-HCl (F); 2-oxoglutaarzuur (K-L); Ca-D-pantothenaat (K-L); perchloorzuur 70% (M); L-proline (K-L); putrescine-2HCl (F); pyridoxal-5-fosfaat (K-L); pyridoxol (M); pyrodruivezuur (K-L); Na-pyruvaat (K-L); riboflavine (NBC); Sephadex G 25 (Pharm); L-serine (M); serumalbumine, kristallijn runder- (S); L-thiamine (NBC); L-threonine (NBC); trichloorazijnzuur (M); triëthanolamine (L en I); trihydroxymethylaminomethaan, Tris (S); L-tryptofan (NBC); L-tyrosine (NBC); urease, 'jack bean', technisch zuiver (S); L-valine (NBC).

2.2 HET KWEKEN VAN DE GIST

2.2.1 Giststam

Het hier gerapporteerde onderzoek werd geheel uitgevoerd met een stam van *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN, die in oktober 1961 uit Koningsgist van de Koninklijke Nederlandsche Gist- en Spiritusfabriek werd reingekweekt op moutagar. Deze stam, stam B genoemd, werd aangehouden in buizen met schuine 1% glukose-0,7% gistextraktagar, en elke drie maanden overgeënt. De reinkultures werden na enting 20 tot 24 uur bij 30° bebroed en vervolgens bij 0° bewaard.

Stam B groeit uitstekend in een glukosemedium, zowel in geaëreerde als in staande kultuur, met een NH₄-zout of een aminozuur als N-bron, mits tevens enkele vitaminen worden aangeboden. Van de laatste zijn D-biotine, D-pantotheenzuur, L-thiamine en myo-inositol essentieel. Ook met andere koolstofbronnen, zoals galaktose, melkzuur, pyrodruivezuur en ethanol groeit stam B in aanwezigheid van een NH₄-zout als enige N-bron.

2.2.2 Kweekmedium en kweekwijze

De gist werd gekweekt met verschillende C- en N-bronnen. Deze werden toegevoegd aan een basismedium bestaande uit mineralen en vitaminen, opgelost in gedemineraliseerd water. De samenstelling is in Tabel 2.1 weergegeven.

TABEL 2.1. Samenstelling van het basismedium.

Mineralen	mg/l	Vitaminen	mg/l
KH ₂ PO ₄	1360	p-aminobenzoëzuur	0,3
H ₃ BO ₃	0,5	D-biotine	0,02
CaCl ₂ .H ₂ O	100	myo-inositol	10
CuSO ₄ .5 H ₂ O	0,1	nicotinamide	5
FeCl ₃ .6 H ₂ O	2	Ca-D-pantothenaat	2
KI	0,1	pyridoxol	1
MgCl ₂ .6 H ₂ O	400	riboflavine	0,1
MnSO ₄ .H ₂ O	0,4	thiamine	0,2
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,2		
NaCl	100		
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,4		

De N-bron was in de meeste gevallen 20 mM (NH₄)₂SO₄. Om verzuring van het medium ten gevolge van NH₄⁺-assimilatie tegen te gaan werd naast deze N-bron 40 mM kaliumnatriumtartraat toegevoegd. Zelfs bij volledige assimilatie van de N-bron kan de pH dan niet lager worden dan ongeveer 3,5. Stam B is niet in staat tartraat te assimileren. Aminozuren die als N-bron dienst deden werden gegeven in een concentratie overeenkomende met 40 mggramatomen N per l, in de L-someer. Van een racemaat werd de dubbele hoeveelheid aangeboden. Caseïnehydrolysaat (pepton) werd als N-bron in een concentratie van 10 g/l gegeven.

De gebruikte C-bronnen waren glukose, galaktose, melkzuur of ethanol. Ze

werden toegediend in hoeveelheden van: glukose 40 g/l (geaëreerde kultuur) of 100 g/l (staande kultuur); galaktose 25 g/l (geaëreerde kultuur) of 50 g/l (staande kultuur); ethanol 30 ml/l (toegevoegd na sterilisatie); melkzuur 10 ml/l (met KOH op pH 4,0 gebracht, kaliumnatriumtartraat werd uit dit medium weggelaten). De pH van de media, het laktaatmedium uitgezonderd, lag tussen 4,5 en 5,5. De media werden gedurende 20 minuten bij 110° in een autoklaaf gesteriliseerd.

De voedingsoplossingen werden geënt door per 1 medium 10 ml voorkultuur toe te voegen; deze had dezelfde samenstelling, werd geënt met een oogje van een reinkultuur van stam B, en 15 tot 24 uur in een schudbak bij 30° in een erlenmeyer van 100 ml bebroed. Glukosemedium werd ook wel geënt door de gehele groei van een 24 uur oude reinkultuur op schuine gistextrakt-glukose-agar aseptisch over te brengen naar 2 l medium.

Alle kultures werden bij 30° bebroed: geaëreerde kultures in Kluiverkolven, staande kultures, die zachtjes werden geschud, in platbodemkolven voor de helft met kultuurvloeistof gevuld. De kultures in ethanol- en in laktaatmedium werden heftig geschud (1 l medium in een erlenmeyer van 5 l).

De gist werd geoogst door centrifugeren van de in ijs gekoelde kultuur, gevolgd door drie maal wassen met ijskoud gedemineraliseerd water. Het oogsten vond plaats op een moment dat niet meer dan 15 g gist (vers gewicht) per 1 medium was gevormd. De kultuur is dan waarschijnlijk nog in de exponentiële groeifase, aangezien de N-bron de vorming van 30 g gist (vers gewogen) toestaat en daar de aangeboden C-bron dan nog aantoonbaar is. De kweektijd die nodig is voor het bereiken van de aangegeven opbrengst varieert met de samenstelling van het medium (zie Tabel 2.2).

TABEL 2.2. Kweektijden nodig voor het bereiken van ongeveer 50% van de maximale opbrengst onder verschillende kweekomstandigheden.

Medium		Kultuur	Kweektijd (h)
C-bron	N-bron		
Glukose	Pepton	Geaëreerd of staand	12
	(NH ₄) ₂ SO ₄	„	15
	L-glutaminezuur	„	18
	L-asparaginezuur	„	15
	L-asparagine	„	15
	DL-alanine	„	24
	γ-aminoboterzuur	„	18
	L-arginine	„	18
Galaktose	(NH ₄) ₂ SO ₄	Geaëreerd	20
		Staand	72
Melkzuur	Pepton	Aëroob	18
	(NH ₄) ₂ SO ₄	„	24
	L-glutaminezuur +	„	24
	L-arginine	„	24
Ethanol	(NH ₄) ₂ SO ₄	„	72

Voor enkele proeven werd gist gekweekt in een glukose-pepton-medium, waarin het KH_2PO_4 was vervangen door 0,63 g (2 mmol) dinatriumglycerolfosfaat per l. De groeisnelheid en de opbrengst werden hierdoor niet beïnvloed.

2.2.3 IJzer-deficiënt medium

De bereiding van Fe-deficiënt kweekmedium verliep aldus: de C-bron (20 ml melkzuur per l), de N-bron (40 mM L-glutaminezuur en 10 mM L-arginine-HCl) en de fosfaatbron (2 mM Na_2 -glycerolfosfaat) werden samen met de gebruikelijke hoeveelheden MgCl_2 , CaCl_2 , NaCl en vitamines opgelost in glasgedestilleerd water. Na toevoeging van 100 mg 8-hydroxyquinoline werd het medium met KOH op pH 7,0 gebracht, opgekookt en een nacht bij kamertemperatuur weggezet. Vervolgens werden de sporen Fe verwijderd door uitschudden met CHCl_3 . Na toevoeging van pro analysi H_2SO_4 tot pH 3,5 werd de overmaat 8-hydroxyquinoline door herhaalde extractie met CHCl_3 verwijderd. Tenslotte werd na verwijdering van CHCl_3 door 10 minuten te koken, en na toevoeging van de spore-elementen (behalve Fe), het medium gesteriliseerd.

2.3 BEPALING VAN DE GISTOPBRENGST

In alle proeven werd de gistopbrengst bepaald door weging van de pas oogste celmassa in de centrifugebuis. Soms werd tevens het droog-gewicht van de cultuur bepaald door monsters van meestal 10 ml te centrifugeren, de gist 3 maal met gedestilleerd water te wassen, kwantitatief over te brengen naar een tot op konstant gewicht gedroogd weegflesje, en weer tot op konstant gewicht bij 110° te drogen.

Het aantal gistcellen in de cultuurvloeistof werd bepaald door direkte telling in een telkamer volgens THOMA.

2.4 BEREIDING VAN CELEXTRAKTEN

Enzymbepalingen werden uitsluitend uitgevoerd in een cel-vrij systeem. Voor de bereiding van de celextracten werden twee methoden toegepast.

In de eerste experimenten werden celextracten verkregen door 10 g verse gist met 10 ml buffer (meestal 200 mM kaliumfosfaatbuffer pH 7,5) te schudden met 50 g glaspareltjes (doorsnede 0,45 tot 0,50 mm) in een 'Zellhomogenisator' (MERCKENSCHLAGER, SCHLOSSMANN en KURZ, 1957) van de firma Braun (Melsungen, Duitse Bondsrepubliek). Het beschreven mengsel werd eerst in het bij het apparaat passende flesje gekoeld tot 0° en daarna gedurende $1\frac{1}{2}$ minuut geschud met een frekwentie van 4000 per minuut. De temperatuur liep hierbij tot ongeveer 30° op. Op een büchnerrechtter werden de glaspareltjes verwijderd. Het aanhangende celextract werd met 10 ml water uitgespoeld. Na koeling van het ruwe extract werden intacte cellen, celwanden en celkernen eruit verwijderd door 10 minuten bij $4000 \times g$ te centrifugeren.

In latere proeven werden extracten van kleine hoeveelheden gist bereid door sonische desintegratie. Hoeveelheden van 0,5 tot 2 g verse gist werden met onge-

veer de halve hoeveelheid 20 mM 2-mercaptoëthanol-oplossing bevattende 1% NaHCO_3 gemengd. De desintegratie werd uitgevoerd met behulp van een 'Ultrasonic Power Unit' (M.S.E., stempeldoorsnede 9,5 mm) gedurende 30 tot 90 seconden (afhankelijk van de hoeveelheid gist) bij 0° . Na verdunning met enkele ml water werd gecentrifugeerd op de bovenbeschreven wijze.

Het gecentrifugeerde ruwe celextrakt werd in vele gevallen onderworpen aan een gelfiltratie, om ongewenste laag-moleculaire bestanddelen te verwijderen. Deze behandeling was niet noodzakelijk, en werd daarom ook niet toegepast, indien de celextrakten uitsluitend dienden ter bepaling van de daarin aanwezige aktiviteiten van arginase en ornithine-transaminase. Alleen indien de celextrakten dienden voor de bepaling van andere enzymen, of voor enzymologisch werk met arginase, werd de gelfiltratie toegepast. Hiertoe werd een kolom van Sephadex G 25 bereid (5 g droge stof, kolomhoogte 18 cm, doorsnede 1,6 cm) en in evenwicht gebracht met 20 mM kaliumfosfaat pH 7,5 (enzymbepalingen) of 20 mM Tris-HCl-buffer pH 8,5 (enzymologisch werk met arginase). De hoeveelheid ruw celextrakt die op deze wijze werd gezuiverd was maximaal 5 ml. De gelfiltratie werd bij 0° binnen 20 minuten uitgevoerd.

Het eiwitgehalte van de celextrakten lag tussen 10 en 20 mg/ml (bepaald volgens DeMoss en BARD, 1957, zie 2.6.9).

2.5 ENZYMBEPALINGEN

2.5.1 Eenheid van specifieke enzymaktiviteit

Een eenheid wordt gedefinieerd als die hoeveelheid enzym die de vorming van 1 μmol reactieprodukt per uur bij 30° onder standaardomstandigheden katalyseert. Om vergelijking tussen verschillende celextrakten mogelijk te maken, werden de specifieke enzymaktiviteiten, te weten het aantal enzymeenheden aanwezig per mg eiwit, berekend (het laatste bepaald volgens De Moss en BARD, 1957, zie 2.6.9).

2.5.2 Arginase

Hoewel gistarginase in vivo door Fe^{2+} -ionen wordt geactiveerd (MIDDELHOVEN, 1965b, 1969b en Hoofdstuk 8 van dit proefschrift) werd voor de routinebepaling aktivering door Mn^{2+} -zouten verkozen, omdat deze methode gevoeliger, beter reproduceerbaar en gemakkelijker uitvoerbaar bleek te zijn dan de aktivering door Fe^{2+} -zouten.

De aktivering van het celextrakt werd op de volgende wijze uitgevoerd: 1,0 ml celextrakt, 1,0 ml 100 mM MnCl_2 en 0,5 ml 200 mM Tris-HCl-buffer pH 7,5 werden óf samen 15 minuten in een waterbad van 50° verwarmd, óf 4 tot 6 uur bij kamertemperatuur en vervolgens 15 tot 20 uur bij 0° weggezet. De aktivering verliep in beide gevallen even goed. Een monster van het geaktiveerde enzympreparaat werd met water tot 0,5 ml aangevuld. Vervolgens werd 1,0 ml 200 mM natriumglycinaat pH 9,5 toegevoegd, werden de inkubatiebuisen in een waterbad van 30° gezet en werd de enzymreactie geïnitieerd door toevoeging van het substraat (0,5 ml 200 mM L-arginine-HCl, met NaOH op pH

9,5 gebracht). Na precies 60 minuten werd de reactie afgebroken door toevoeging van 2 druppels azijnzuur en 3,0 ml water. Indien veel eiwit neersloeg, werd dit door centrifugeren verwijderd; deze handeling was slechts zelden noodzakelijk. In monsters van 1,0 ml werd ureum bepaald (ARCHIBALD, 1945, zie 2.6.6).

Hoewel het enzym onder de geschetste omstandigheden niet geheel met substraat is verzadigd, is de hoeveelheid gevormd ureum recht evenredig aan de tijd en de enzymconcentratie, zolang niet meer dan 5 μmol arginine zijn omgezet.

2.5.3 *Ornithine-transaminase*

Dit enzym werd reeds eerder in gist aangetoond door SCHER en VOGEL (1957). Het katalyseert de transaminering van ornithine met 2-oxoglutaraat. Waarschijnlijk wordt zo glutaminezuur- γ -semialdehyde gevormd, dat door ring-sluiting onmiddellijk spontaan overgaat in Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat. Dit laatste reageert, zoals vele pyrroline-derivaten, met o-aminobenzaldehyde tot een geelgekleurde dihydroquinazolinium-verbinding. De meeste methoden ter bepaling van ornithine-transaminase (voortaan afgekort als OTA) zijn op deze reactie gebaseerd. FINCHAM (1953) ontwikkelde een methode waarin de transaminering van ornithine continu wordt gevolgd. Voor de routinebepalingen in dit onderzoek werd een discontinue methode ontwikkeld uit die van FINCHAM. Continue meting van de enzymactiviteit was bezwaarlijk, omdat deze te traag verloopt als slechts weinig enzymactiviteit aanwezig is.

De inkubatiemengsels voor de routinebepaling van OTA bevatten per ml: 0,20 ml celextrakt (2 tot 4 mg eiwit), 100 μmol kaliumfosfaat pH 7,5, 20 μmol L-ornithine-HCl, 10 μmol o-aminobenzaldehyde (opgelost in 0,05 ml 96% ethanol), 10 μmol MgCl_2 , 1 μmol pyridoxal-5-fosfaat en 20 μmol Na_2 -2-oxoglutaraat (als laatste op tijd 0 toegevoegd). De buizen werden naast een blanco waaruit het enzym was weggelaten (korrektie voor niet-enzymatische transaminering) in een waterbad van 30° geïnkubeerd en van tijd tot tijd beoordeeld. Indien in een buis duidelijk geel pigment was gevormd, werd de reactie met 1,0 ml 1 M HClO_4 afgebroken. De maximale inkubatietijd was 5 uur. Na aanvulling met water tot 10 ml werden de buizen een nacht bij 0° weggezet. In de heldere bovenstaande vloeistof werd de absorbantie bij 450 nm gemeten tegen de blanco (Beckman Spectrophotometer DU, lichtweg 1 cm). Door vergelijking met een standaardkromme van Δ^1 -pyrroline-5-carbonzuur (zie 2.6.7) werd de hoeveelheid gevormd reactieproduct berekend. Deze was evenredig aan de inkubatietijd en de enzymconcentratie, zolang niet meer dan 5 μmol ornithine werd omgezet.

2.5.4 *Glutaminezuur-dehydrogenase (NAD-specifiek)*

De katabolische functie van dit enzym in gist werd bewezen door HIERHOLZER en HOLZER (1963). De enzymactiviteit werd gemeten door de NADH_2 -vorming spektrofotometrisch te volgen bij 340 nm (Beckmann Spectrophotometer DU, kwartskuvet, lichtweg 1 cm). Per 2,10 ml werden bij kamertemperatuur geïnkubeerd: 0,50 ml celextrakt (5 tot 10 mg eiwit), 100 μmol Tris-HCl-buffer pH 8,5, 10 μmol KCN, 10 μmol EDTA, 1 mg NAD, 50 μmol Na-L-

glutamaat pH 8,5 (als laatste op tijd 0 toegevoegd). De waarnemingen werden gecorrigeerd voor de NADH₂-vorming die optrad in de blanco waaruit glutamaat was weggelaten. Uit de waargenomen absorpties werd de hoeveelheid NADH₂ berekend met de molaire absorptie-coëfficiënt $6,22 \cdot 10^6$ cm²/mol (RAFTER en COLOWICK, 1957).

2.5.5 Threonine-dehydratase

Dit enzym werd in gist eerder bepaald door CENNAMO, BOLL en HOLZER (1964). In een totaal volume van 2,0 ml werden gedurende 30 minuten bij 30° geïnkubeerd: 0,01 ml celextract (0,1 tot 0,2 mg eiwit), 200 µmol triëthanolamine-HCl-buffer pH 7,9, 0,2 µmol pyridoxal-5-fosfaat, 2 µmol DL-valine, 20 µmol (NH₄)₂SO₄ en 40 µmol L-threonine (als laatste toegevoegd). De reactie werd met 1,0 ml 1 M HClO₄ afgebroken, waarna het uit threonine gevormde 2-oxoboterzuur (maximaal 1 µmol) met dinitrofenylhydrazine spektrofotometrisch werd bepaald volgens de methode van FRIEDEMANN en HAUGEN (1943), met natriumpyruvaat als standaard.

2.5.6 Proteïnase

Door LENNEY (1956) werd in gist een proteïnase aangetoond die eiwitten hydrolyseert in zwak zuur milieu, in aanwezigheid van hoge concentraties ureum. De methode waarmee het enzym werd bepaald, berust op meting van de hoeveelheid tyrosine die uit een caseïne-oplossing door het enzym wordt vrijgemaakt, dat wil zeggen, in trichloorazijnzuur-oplossing oplosbaar gemaakt.

Celextracten waarin proteïnase werd bepaald werden aan zorgvuldige gel-filtratie onderworpen (Sephadex G 25-kolom van eerder beschreven afmetingen, in evenwicht gebracht met 20 mM natriumsuccinaat pH 5,0). De proteïnase werd volgens LENNEY (1956) geactiveerd door 1,0 ml eluaat met 1,0 ml 6 M ureum 1 uur bij 30° te inkuberen. Daarna werd substraat toegevoegd (4,0 ml caseïne-oplossing, 40 mg/ml, in 100 mM kaliumfosfaat pH 6,2, 6 M ureum). Onmiddellijk na toevoeging van het substraat (blanco), na 30 en na 60 minuten inkubatie bij 30° werd het eiwit neergeslagen met 4,0 ml trichloorazijnzuur-oplossing (150 mg/ml) in 1 N HCl. Na centrifugeren werd in de bovenstaande vloeistof tyrosine bepaald door meting van de absorptie bij 280 nm tegen water (Beckmann Spectrophotometer DU, 1 cm lichtweg in kwartskuvet). Indien nodig werden de monsters voor de meting met water verdund. De hoeveelheid tyrosine werd berekend door vergelijking met een standaardkromme, verkregen met tyrosine-oplossing (20 tot 120 µg/ml) in 0,4 N HCl trichloorazijnzuur-oplossing (60 mg/ml). Na correctie voor de blanco werd de enzymactiviteit berekend als µg tyrosine per mg gisteiwit per uur bij 30° uit het substraat vrijgemaakt.

2.5.7 Asparaginase

Dit enzym werd door GRASSMANN en MAYR (1933) in gist aangetoond. De enzymactiviteit wordt gemeten door het uit asparagine gevormde NH₃ na mikrodestillatie in CONWAY-schalen te bepalen. Het inkubatiemengsel bevatte

per ml: 0,05 tot 0,10 ml celextrakt (1 tot 2 mg eiwit), 100 μmol Tris-HCl-buffer pH 7,8 en 50 μmol L-asparagine. Na 4 uur inkuberen bij 30°, naast blanco's waaruit asparagine of celextrakt was weggelaten, werd de reactie onderbroken door toevoeging van 1,0 ml 1,0 M HClO_4 . Het gevormde NH_3 (maximaal 3 μmol) werd in een CONWAY-schaal na toevoeging van een gelijk volume 5,0 M (berekend op H_3BO_3) kaliumboraat pH 10,5, opgevangen in 2,0 ml 0,1 N HCl. In 1,0 ml hiervan werd NH_3 bepaald met NESSLERS reagens (JOHNSON, 1941, zie 2.6.8).

2.5.8 *Glutaminase*

Dit enzym werd aangetoond bij pH 8,0 in aanwezigheid van fosfaat, onder de omstandigheden die door ERRERA (1949) als optimaal werden beschreven voor aantoning van de dierlijke, aan mitochondriën gebonden glutaminase. In een totaal volume van 1,0 ml werden geïnkubeerd: 0,5 ml celextrakt (5 tot 10 mg eiwit), 50 μmol Tris-HCl-buffer pH 8,0, 50 μmol kaliumfosfaat pH 8,0 en 50 μmol L-glutamine. Tevens werden blanco's ingezet, waaruit glutamine of celextrakt werd weggelaten. Na 4 uur inkubatie bij 30° werd de reactie onderbroken met 1,0 ml 1,0 M HClO_4 , waarna het gevormde NH_3 (maximaal 3 μmol) werd opgevangen in 2,0 ml 0,1 N HCl op de manier die voor asparaginase werd beschreven.

2.6 CHEMISCHE BEPALINGEN

2.6.1 *Koolhydraat*

Koolhydraat werd in monsters van een gistsuspensie spektrofotometrisch bepaald volgens de anthronmethode (TREVELYAN en HARRISON, 1952). Glukose diende hierbij als standaard.

2.6.2 *Stikstof in diverse celfracties*

Het totale N-gehalte van een gistsuspensie werd bepaald met de KJELDAHL-methode (CuSO_4 en SeO_2 als katalysator). Na verdunning van de destructiemengsels en aanvulling tot bekend volume werd in monsters hieruit NH_3 bepaald volgens JOHNSON (1941, zie 2.6.8).

N-bepalingen in verschillende fracties van de gist werden op dezelfde wijze uitgevoerd. De bedoelde fracties zijn: de vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden; de nucleïnezuren en de polypeptiden. De eerstgenoemde fractie werd geïsoleerd door herhaalde extractie van 5 g gist met 20 ml trichloorazijnzuuroplossing (20 mg/ml) bij 0° gedurende 1 uur. De nucleïnezuur-fractie werd daarna geïsoleerd door herhaalde extractie van het residu met hetzelfde reagens, gedurende 30 minuten bij 100°. De stikstof in het residu van deze fractie werd als polypeptide-N (eiwit-N) beschouwd.

2.6.3 *Deoxyribonucleïnezuur*

DNA werd als deoxyribose bepaald in monsters van de nucleïnezuur-fractie met difenylamine-reagens (DISCHE, 1930). Uit de waargenomen absorpties bij

600 nm werd de aanwezige hoeveelheid DNA berekend als μg DNA-fosfaat volgens de formule van SCHNEIDER (1945).

2.6.4 *Vrije aminozuren*

De vrije aminozuren werden tevens bepaald als α -amino-N in waterige extracten van gist. Deze werden verkregen door 25 g gist herhaalde malen met 10 ml water bij 100° te extraheren. De verzamelde extracten werden vervolgens gedeeltelijk ingedampt en aangevuld tot 25,0 ml. De α -amino-N werd spektrofotometrisch bepaald met behulp van de ninhydrine-methode volgens MOORE en STEIN (1948), met L-glutaminezuur als standaard.

2.6.5 *Vrij arginine*

Vrij arginine werd bepaald in cultuurfiltraten en in heet-water-extrakten van verse gist of van gedroogde monsters. In 5,0 ml extract werd het aanwezige arginine bepaald na omzetting tot ureum met 2 mg runderleverarginase opgelost in 5,0 ml 200 mM natriumglycinaat pH 9,5, en 10 mM MnCl_2 . Na schudden met enkele druppels toluen werd 15 uur bij 37° geïnkubeerd. In monsters van het inkubatiemengsel werd ureum bepaald volgens ARCHIBALD (1945, zie 2.6.6).

2.6.6 *Ureum*

Ureum werd bepaald in monsters uit de inkubatiemengsels van de arginase-bepaling, en bij de bepaling van vrij arginine. De methode berust op spektrofotometrische bepaling van het paars-rode, fotolabele pigment (van onbekende structuur), dat in zuur milieu bij 100° uit ureum en α -isonitrosopropiofenon wordt gevormd (ARCHIBALD, 1945). Omdat deze reactie zowel door arginine als door Mn^{2+} -zouten wordt gestoord, is de oorspronkelijk door ARCHIBALD voorgeschreven methode niet zonder meer bruikbaar voor de routine-bepaling van arginase. De wijzigingen die werden aangebracht, bestaan uit toevoegingen van arginine aan de ureum-standaardserie en van metaalzouten aan het H_3PO_4 - H_2SO_4 -mengsel.

Bij elke serie monsters werd een ureum-standaardserie (0,20 tot 1,0 μmol ureum) meebepaald, omdat de waargenomen absorpties enigszins variëren met het H_3PO_4 - H_2SO_4 -mengsel. Aan de ureum-standaardserie werd per buis 20 μmol arginine (de hoeveelheid aanwezig in monsters van de arginase-bepaling) toegevoegd. Ureum-standaardserie en monsters (maximaal 1 μmol ureum) werden met water tot 2,5 ml aangevuld. Tevens werd 2,5 ml water als blanco gebruikt. Daarna werden achtereenvolgens 0,2 ml α -isonitrosopropiofenon (40 mg/ml 96% ethanol) en 2,5 ml zuurmengsel toegevoegd. Onmiddellijk na de laatste toevoeging werden de buizen geschud en in het donker een uur in een kokend waterbad gezet. Het zuurmengsel bevatte per 1: 200 ml water (waarin opgelost 500 mg $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 250 mg MnCl_2 en 250 mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$), 200 ml 98% H_2SO_4 en 600 ml 85% H_3PO_4 . Na snelle afkoeling van de buizen tot kamertemperatuur werd de absorptie bij 535 nm binnen 24 uur gemeten (Beckman Spectrophotometer DU, lichtweg 1 cm). De buizen werden zo min

mogelijk aan het licht blootgesteld. De absorptantie van de standaard varieerde van 0,80 tot 0,90, als deze 1 μ mol ureum bevatte.

2.6.7 Δ^1 -Pyrroline-5-carbonzuur

Dit reactieproduct van de transaminering van ornithine werd bepaald als geel-gekleurde dihydroquinazolinium-verbinding na reactie met o-aminobenzaldehyde, zoals in het voorschrift voor de OTA-bepaling (2.5.3) werd vermeld. Uit de in die bepaling waargenomen absorptanties werd door vergelijking met een standaardkromme de hoeveelheid Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaate berekend. De oplossing van deze verbinding, nodig voor de standaardkromme, werd bereid volgens het voorschrift van SCHOPMAN (1953), uitgaande van DL-glutaminezuur- γ -semialdehyde-diethylmercaptal.¹ Een hoeveelheid van 29,7 mg (125 μ mol) werd opgelost in 1,0 ml 1 M HClO₄ in een kleine centrifugebuis. Na toevoeging van een kleine overmaat HgCl₂ (74,7 mg, 275 μ mol), opgelost in 5 ml 1 M HClO₄, werd de buis enkele uren bij kamertemperatuur weggezet. Na verwijdering en uitwassen met 1 M HClO₄ van het neergeslagen HgSC₂H₅Cl werd de Δ^1 -pyrroline-5-carbonzuur-oplossing met 1 M HClO₄ tot 25,0 ml aangevuld (concentratie 5 mM). Een standaardkromme werd verkregen door variabele hoeveelheden (0,4 tot 4,0 μ mol) met 1 M HClO₄ tot 1,0 ml aan te vullen, vervolgens 10 μ mol (1,21 mg) o-aminobenzaldehyde (opgelost in 0,1 ml ethanol en 1,0 ml 100 mM kaliumfosfaat pH 7,4) en 8,0 ml water toe te voegen. Na enkele uren reactie bij kamertemperatuur en een nacht bij 0° werd bij 450 nm de absorptantie gemeten tegen een blanco (Beckmann Spectrophotometer DU, lichtweg 1 cm).

De standaardkromme is lineair tot 4,0 μ mol (absorptantie 0,92). Bij controle bleek dat de absorptanties niet groter zijn, indien Δ^1 -pyrroline-5-carbonzuur en o-aminobenzaldehyde voordat HClO₄ wordt toegevoegd de gelegenheid krijgen enkele uren bij pH 7,4 en 30° te reageren (zoals tijdens de OTA-bepaling het geval is). Integendeel, de absorptanties waren dan, vooral als meer dan 2 μ mol aanwezig was, enkele procenten minder, wat gezien de geringe stabiliteit van Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaate in neutraal en alkalisch milieu verwacht kon worden.

Omdat de standaardkromme goed reproduceerbaar bleek te zijn, werd het niet nodig gevonden bij elke serie monsters een standaard mee te bepalen.

2.6.8 Ammoniak

NH₃ werd bepaald in destructiemengsels van de N-bepaling volgens KJELDAHL (2.6.2) en ten behoeve van enkele enzymbepalingen (2.5.7 en 8). De bepaling geschiedde spektrofotometrisch met NESSLERS reagens (JOHNSON, 1941). Monsters (bevattende niet meer dan 0,1 ml H₂SO₄) van met water tot bekend volume gebrachte destructiemengsels van de KJELDAHL-bepaling, of monsters NH₃ in CONWAY-schalen in 0,1 N HCl opgenomen, werden met water tot 2,0 ml aangevuld. Hetzelfde werd gedaan met een standaardserie van (NH₄)₂-

¹Een preparaat van Dr. W. SCHOPMAN, uit de preparaten-kollektie van het Organisch-Chemisch Laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht, vriendelijk ter beschikking gesteld door Professor Dr. L. L. M. VAN DEENEN.

SO₄-oplossing (0,5 tot 3,0 μmol NH₃). Bij deze buizen, en bij een blanco (2,0 ml H₂O) werden achtereenvolgens 2,0 ml reagens en 3,0 ml 2 N NaOH toegevoegd. Onmiddellijk na de laatste toevoeging werd intensief geschud. Het reagens bevatte per 1: 4,0 g KI, 4,0 g HgI₂ en 1,75 g arabische gom. Na een reactietijd van 15 tot 30 minuten werd de absorptantie bij 490 nm gemeten tegen de blanco (Beckmann Spectrophotometer DU, lichtweg 1 cm).

2.6.9 Eiwit

Voor de eiwitbepalingen in celextracten werd een spektrofotometrische methode, gebaseerd op de bekende bepaling van LOWRY c.s. (1951), gebruikt (DEMOSS en BARD, 1957). In deze eiwitbepaling wordt het blauwe pigment gemeten, dat in alkalisch milieu uit een mengsel van fosfo-wolfram- en fosfomolybdeen-zuur (FOLIN-CIOALTEU-reagens) wordt gevormd na interactie met de tyrosine- en, in mindere mate, met de tryptofan-groepen in het polypeptide.

Aan monsters van 0,050 ml celextrakt (500 tot 1000 μg eiwit) werden 5,0 ml koper-tartraat-oplossing (per 1: 0,60 g CuSO₄.5H₂O en 1,2 g kaliumnatriumtartraat) en 5,0 ml natriumcarbonaat-oplossing (80 g Na₂CO₃ per liter) toegevoegd. Na 1 tot 4 uur inkubatie bij 20° werd 1,0 ml FOLIN-CIOALTEU-reagens (1/3 verdund met water) toegevoegd en onmiddellijk intensief geschud. Na 20 tot 45 minuten werd de absorptantie bij 660 nm gemeten (Beckmann Spectrophotometer DU, lichtweg 1 cm). Door vergelijking met een standaardkromme (100 tot 1000 μg kristallijn runderserumalbumine, vers opgelost in natriumcarbonaat-oplossing) werd de in de celextracten aanwezige hoeveelheid eiwit berekend. De standaardkromme was niet lineair, maar wel goed reproduceerbaar. Het was daarom niet nodig bij elke serie een standaard mee te bepalen.

HOOFDSTUK 3

DE ARGININE-AFBRAAKWEG IN GIST, MECHANISME EN INDUCEERBAARHEID

3.1 INLEIDING

Toen dit onderzoek werd begonnen (oktober 1961) waren twee, elkaar tegensprekende, studies verschenen over de eerste stap van de arginine-afbraak in bakkersgist. EDLBACHER en BAUR (1938) toonden in celextrakten een op leverarginase gelijkend enzym aan, dat bij pH 9,5 zijn optimum heeft en door Mn^{2+} -zouten wordt geactiveerd. ROCHE en LACOMBE (1952) evenwel, waren niet in staat de resultaten van EDLBACHER en BAUR te reproduceren. In plaats van arginase toonden zij arginine-deïminase aan, dat arginine hydrolyseert tot citrulline en NH_3 . Het gistenzym, dat gedeeltelijk door hen werd gezuiverd, bleek sterk af te wijken van het enzym van *Streptococcus*. In tegenstelling tot het laatste is de aanwezigheid van Co^{2+} -zouten noodzakelijk voor de werking ervan.

Omdat in de literatuur verwarring bestond omtrent het mechanisme van de eerste stap van de arginine-afbraak in gist, was het nodig het onderzoek allereerst hierop te richten.

3.2 ARGINASE OF ARGINASE-DEÏMINASE

Ter opheldering van de eerste stap van de arginine-afbraak in gist werden celextrakten gedurende lange tijd geïnkubeerd met arginine, zowel onder omstandigheden die door ROCHE en LACOMBE (1952) als optimaal voor arginine-deïminase werden vermeld, als onder omstandigheden die door EDLBACHER en BAUR (1938) als optimaal voor arginase werden opgegeven. Stam B werd gekweekt in geaëreerd 5% moutextract bij 30° en geoogst in de stationaire fase. Het celextract werd aan gelfiltratie onderworpen. De inkubatiemengsels bevatten beide 10 mg eiwit per ml en 20 mM L-arginine-HCl; verder 1 mM $CoCl_2$ en 100 mM kaliumfosfaat pH 6,5, resp. 1 mM $MnCl_2$ en 100 mM natriumglycinaat pH 9,5. Na schudden met een druppel toluëen werd 8 uur bij 30° geïnkubeerd, waarna de reactieproducten werden gescheiden door middel van papierchromatografie (dalende methode, Whatman-papier Nr 1, loopvloeistof fenol: water (3:1), sproeivloeistof ninhydrine-reagens). In beide inkubatiemengsels werden uitsluitend reactieproducten met een R_f van 0,40 (gelijk aan die van ornithine) aangetroffen. Reactieproducten met een R_f van 0,69 (zoals citrulline) waren niet aantoonbaar.

De proef werd herhaald met andere bakkers- en biergiststammen (Heineken A 24; C 14, 240 en 447, ter beschikking gesteld door DR. W. F. F. OPPENOORTH van het Nationaal Instituut voor Brouwerst, Mout en Bier, T. N. O.; en een zelf reïngekweekte stam uit bakkersgist van de Kongelige Danske Spritfabrik-

kerne, Aalborg, Denemarken). Omdat het onderzoek van ROCHE en LACOMBE werd uitgevoerd met bakkersgist uit de handel, werden tevens celextracten van bij een bakker gekochte gist onderzocht. In geen der gevallen werd citrulline-vorming uit arginine waargenomen; steeds werd ornithine gevormd.

De reactieproducten van de arginine-afbraak door celextracten van stam B werden nader geïdentificeerd door middel van specifieke reacties:

1. De aanwezigheid van ornithine werd bevestigd door reactie met zuur ninhydrine-reagens (CHINARD, 1952) en kwantitatieve bepaling hiermee (VOGEL en BONNER, 1956). Uit 20 μmol L-arginine bleken 19,5 μmol ornithine te worden gevormd. Ninhydrine vormt bij pH 1,0 slechts met ornithine, proline, lysine en hydroxylysine een rood pigment; andere aminozuren storen deze reactie niet (CHINARD, 1952).

2. De aanwezigheid van ureum werd bevestigd door reactie met diacetylmonoxim (ARCHIBALD, 1944). Dit agens reageert ook met citrulline. In beide gevallen ontstaan gekleurde verbindingen, te onderscheiden naar hun absorptiespektra (ureum met maximum bij 480 nm, citrulline bij 495 nm). Het reactieproduct dat uit arginine werd verkregen, bleek na reactie met diacetylmonoxim een absorptiemaximum bij 480 nm te geven, evenals ureum. Na behandeling met urease bij pH 7,5 in fosfaatbuffer van monsters uit de inkubatiemengsels bleek met diacetylmonoxim geen kleurreactie meer op te treden. Dit is een duidelijke aanwijzing, dat het met diacetylmonoxim reagerende product van de arginine-afbraak inderdaad ureum is.

Ureum werd kwantitatief bepaald in de inkubatiemengsels met α -isonitrosopropiofenon (ARCHIBALD, 1945, zie 2.6.6). Uit 20 μmol L-arginine bleek 19,2 μmol ureum te worden gevormd, zodat de kwantitatieve omzetting van arginine tot ornithine en ureum door celextracten van stam B, zowel in aanwezigheid van Co^{2+} -ionen bij pH 6,5 als in aanwezigheid van Mn^{2+} -ionen bij pH 9,5 als bewezen geacht mag worden. Of de beide arginase-activiteiten aan één dan wel aan twee verschillende enzymeiwitten moesten worden toegeschreven, was in dit stadium van onderzoek nog een open vraag.

De mogelijkheid tot citrulline-vorming uit arginine werd ook nog onderzocht in extracten van een gistmonster, uit Parijs door mejuffrouw G. LACOMBE toegezonden. Helaas bleek de fabrikant van bakkersgist waarmee ROCHE en LACOMBE (1952) hun onderzoek hadden uitgevoerd, de produktie te hebben gestaakt. Noch bakkersgist van de firma Springer uit Parijs, noch gist van een onbekende fabrikant uit Auvergne bleek in staat arginine tot citrulline om te zetten; in beide gevallen werden uitsluitend ornithine en ureum als reactieproducten aangetoond.

Uit deze proeven werd gekonkludeerd dat de citrulline-vorming uit arginine geen algemene eigenschap van gist is, en dat de arginase-reactie de eerste stap is van de afbraak van dit aminozuur. Van verdere pogingen tot aantonen van arginine-deïminase werd afgezien.

3.3 ORNITHINE-TRANSAMINASE

De meest waarschijnlijke tweede stap in de arginine-afbraak is de transaminering van ornithine. De aanwezigheid van OTA in gist werd reeds bewezen door SCHER en VOGEL (1957). De resultaten van deze onderzoekers konden zonder moeite worden gereproduceerd. De vorming van een geel gekleurde verbinding (absorptiemaximum bij 450 nm) door reactie van o-aminobenzaldehyde met het reactieproduct Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat werd als zo specifiek beschouwd, dat van nadere identifikatie van de reactieprodukten werd afgezien.

3.4 INDUKTIE EN REPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA

Enzymsystemen met een katabolische functie worden in het algemeen geïnduceerd door hun substraat. Omgekeerd geldt dat het geïnduceerd worden van enzymen door een bepaalde verbinding een aanwijzing is voor het functioneren van die enzymen in de afbraak van die verbinding, of in de afbraak van chemisch nauw verwante verbindingen.

Voor de functie van arginase in de arginine-afbraak lijkt bewijs overbodig. Voor OTA is zo'n functie minder vanzelfsprekend, temeer omdat dit enzym eerder functies toebedacht kreeg in de ornithine-synthese (VOGEL en BONNER, 1954) en in de lysine-stofwisseling (SCHER en VOGEL, 1957). Het werkelijk functioneren van OTA in de arginine-afbraak mag dus niet zonder meer uit zijn aanwezigheid in celextrakten worden gekonkludeerd. Pas nadat gebleken zal zijn dat OTA door arginine wordt geïnduceerd, is deze functie waarschijnlijk.

De mogelijkheid tot inductie van arginase en OTA door arginine werd onderzocht door gist die aëroob gekweekt werd in glukose-pepton-medium 6 uren aëroob verder te kweken in glukose-media met als N-bron arginine, ornithine, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of combinaties van deze (0,5 g gist per 50 ml medium). In celextrakten van deze gist werd arginase bepaald na aktivering zowel met MnCl_2 (zie 2.5.2) als met CoCl_2 (aktivering in hetzelfde milieu bij gelijke concentratie, 15 minuten bij 45°). Mn-arginase werd bepaald bij pH 9,5 (zie 2.5.2), Co-arginase bij pH 6,7 in 100 mM kaliumfosfaat. De resultaten van de proef zijn vermeld in Tabel 3.1.

TABEL 3.1. Specifieke aktiviteiten van arginase en OTA in gist, aëroob gekweekt in glukose-media met verschillende N-bronnen.

Stikstofbron	Arginase		OTA
	Co ²⁺ , pH 6,7	Mn ²⁺ , pH 9,5	
20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2,8	14,0	0,20
20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 10 mM L-arginine-HCl	9,0	46,0	1,25
20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + 10 mM L-ornithine-HCl	3,5	18,0	0,50
10 mM L-Arginine-HCl	25,0	125	4,80
10 mM L-Ornithine-HCl	12,0	68,0	1,00

Duidelijk is in deze tabel de inductie van beide enzymen door arginine en door ornithine te zien. Arginine lijkt als inductor werkzamer te zijn dan ornithine; vooral bij OTA valt dit op. Het betrokken zijn van OTA bij de afbraak van arginine in gist is hierdoor zeer waarschijnlijk geworden. De inductie van beide enzymen is sterk verminderd indien naast arginine of ornithine $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in het medium aanwezig is.

De verhouding tussen de specifieke activiteiten van Co- en Mn-arginase blijkt konstant te zijn. Dit wijst erop dat beide activiteiten verband houden met hetzelfde enzymeiwit. Toen bovendien bleek dat beide activiteiten met behulp van enkele gebruikelijke technieken van enzymfraktionering (precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of koude aceton, en adsorptie aan $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ -gel) niet te scheiden waren, werd de homogeniteit van de in de gist aanwezige arginase bewezen geacht (zie evenwel 8.3). In latere proeven werd daarom van de bepaling van Co-arginase afgezien en werd uitsluitend Mn-arginase bepaald.

De verhouding tussen de specifieke activiteiten van arginase en OTA is niet konstant. Kennelijk is de synthese van beide enzymen niet gekoördineerd en liggen de betreffende structurele genen niet in één operon.

De eventuele regulatie van de vorming van arginase en OTA door kataboliet-repressie werd nagegaan door gist te kweken met verscheidene C-bronnen, met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron, al of niet naast 5 mM L-arginine-HCl. De specifieke activiteiten van de beide enzymen, de hoeveelheid vrij arginine in de gist en de hoeveelheid arginine tijdens de groei per g droge gist opgenomen, werden bepaald en zijn vermeld in Tabel 3.2.

Duidelijk blijkt dat toevoeging van arginine aan de verschillende minimale media de specifieke activiteiten van beide enzymen doet toenemen. De mate van de inductie varieert sterk met de C-bron. In glucose- en in ethanol-media is de inductie duidelijker dan in galactose- en in melkzuur-media. De mate van inductie houdt meer verband met de totale hoeveelheid arginine per g droge gist tijdens de groei uit deze media opgenomen, dan met de concentratie vrij arginine in de cel. Een dergelijke waarneming werd eerder gedaan tijdens een studie van de repressie van een biosynthetisch enzym (ornithine-transcarbamoylase) door arginine in *S. cerevisiae*, stam B (MIDDELHOVEN, 1969a).

Vergelijking van de specifieke activiteiten van arginase en OTA in gist gekweekt in diverse minimale media, toont een duidelijke invloed van de C-bron. Toch moet men voorzichtig zijn deze invloed aan eventuele kataboliet-repressie toe te schrijven, omdat in aanwezigheid van de C-bron die in minimaal medium de laagste specifieke activiteiten veroorzaakt (glukose) de inductie door arginine niet minder is dan in aanwezigheid van de andere C-bronnen. Een kenmerk van echte kataboliet-repressie is dat inductie in aanwezigheid van de represserende C-bron geheel of vrijwel geheel wordt onderdrukt. Dit is bij geen der C-bronnen in de proef van Tabel 3.2 het geval. Hoewel de specifieke activiteiten door de C-bron onmiskenbaar worden beïnvloed, lijkt het erop dat het tegengaan van de inductie door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (zie Tabel 3.1) kwantitatief belangrijker is.

TABEL 3.2. De inductie van arginase en OTA door arginine in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -media met verscheidene C-bronnen.

Koolstofbron en kweekomstandigheden	Arginine-concentratie (mM)	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.	Arginine in cel ($\mu\text{mol/g}$ droge gist)	Arginine uit medium opgenomen ($\mu\text{mol/g}$ droge gist)
Glukose	Geaëreerd	3,0-5,5 15,0-26,0	0,06-0,30 0,64-0,80	60-75 100-160	300-550
	Staannd	0,5-1,5 14,5	0,19-0,20 2,62-3,28	25-55 50-70	500-1000
Galaktose	Geaëreerd	8,5-20,0 12,0-36,0	0,33-0,54 0,69-0,90	40-80 50-150	<100
	Staannd	3,7-4,3 5,3-10,5	0,40-0,56 0,75	7 7-13	160
Ethanol	Aëroob	4,1-6,7 14,0-68,0	0,35-0,53 0,90-1,55	10-20 20-40	300
	Aëroob	11,0-14,0 12,5-20,5	0,93-1,37 1,64-2,47	16 18-20	250

3.5 DISKUSSIE

De resultaten vermeld in dit hoofdstuk werden reeds eerder gepubliceerd als korte mededeling (MIDDELHOVEN, 1964) en als verslag (MIDDELHOVEN, 1965a).

De eerste stap van de arginine-afbraak door bakkersgist blijkt de arginase-reaktie te zijn, die leidt tot kwantitatieve omzetting van arginine tot equimolaire hoeveelheden ornithine en ureum. Beide reaktieproducten werden door middel van specifieke reakties aangetoond en kwantitatief bepaald na inkubatie onder verschillende omstandigheden van arginine met celextrakt van gist B, gekweekt in moutextrakt. De waarnemingen van ROCHE en LACOMBE (1952), die in gist arginine-deïminase aantoonde en dit enzym gedeeltelijk zuiverde, konden niet worden bevestigd.

De tweede stap van de arginine-afbraak is een transaminering van ornithine. De ornithine-transaminase, eerder in gist aangetoond door SCHER en VOGEL (1957), is in celextrakten van gist B in duidelijke hoeveelheden aanwezig.

Een nadere aanwijzing voor het betrokken zijn van arginase en OTA bij de afbraak van arginine is de sterke inductie van beide enzymen, die optreedt als arginine aan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -media met verschillende C-bronnen wordt toegevoegd. De arginine-afbraakweg in gist, op grond van dit onderzoek voorgesteld, is gelijk aan die in *Bacillus subtilis* (DEHAUWER, LAVALLÉ en WIAME, 1964). Deze auteurs slaagden er bovendien in de laatste stap van de arginine-afbraak op te helderen.

Mijn waarnemingen aan de arginine-afbraakweg in gist werden door BECHET en WIAME (1964) bevestigd. Deze auteurs toonden in gist bovendien een door arginine induceerbaar Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat-dehydrogenase aan. Verder werd de arginase-weg aangetoond in *Bacillus licheniformis* (RAMALEY en BERNLOHR, 1966) en in *Neurospora crassa* (CASTAÑEDA, MARTUSCELLI en MORA, 1967).

Nadat was aangetoond dat de afbraak van arginine in gist via de arginase-weg verloopt, en dat de arginine-deïminaseweg bij dit mikroörganisme niet voorkomt, werd het niet nodig gevonden de eventuele functie van andere arginine-afbraakwegen (zie 1.2.4 tot 1.2.7) in gist na te gaan. De literatuurgegevens over deze afbraakwegen kwamen overigens pas ter beschikking toen dit onderzoek al ver was gevorderd.

De gistarginase blijkt door bivalente metaalionen te worden geactiveerd. De arginase werd in celextrakten van gist B bepaald, zowel bij pH 6,7 na aktivering met CoCl_2 , als bij pH 9,5 na aktivering met MnCl_2 . De mogelijkheid dat deze beide aktiviteiten aan verschillende enzymeiwitten moeten worden toegeschreven werd verworpen op grond van het feit dat beide steeds in konstante verhouding in de cel aanwezig zijn en op grond van het feit dat ze met gebruikelijke technieken van enzymfraktionering niet van elkaar zijn te scheiden. De mogelijkheid tot aktivering door zeer verschillende metaalionen is ook beschreven voor leverarginase (HELLERMAN en PERKINS, 1935).

De functie van OTA in de arginine-afbraak is in overeenstemming met waarnemingen van DAVIS (1968) aan OTA-negatieve *Neurospora*-mutanten. Deze blijken in minimaal medium even snel te groeien als de wilde stam. Klaarblijkelijk heeft de mutatie in dit organisme geen enkele voedings-deficiëntie tot gevolg.

Dit sluit een essentiële functie van OTA in enig biosynthetisch proces uit. De mutatie heeft als enig gevolg dat proline-deficiënte mutanten wier voedingsbehoefte ook door arginine of ornithine kon worden gedekt, bij verlies van het vermogen OTA te vormen nog slechts in aanwezigheid van proline kunnen groeien. Door middel van de OTA-reaktie worden de processen arginine-afbraak en proline-synthese gekoppeld (Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat is een intermediair van de proline-synthese, de proline-afbraak en de ornithine-afbraak).

Arginase, en vooral OTA, blijken door arginine sterker te worden geïnduceerd dan door ornithine. Dit lijkt in tegenspraak te zijn met vele waarnemingen dat vooral in aminozuur-afbrekende systemen het reaktieproduct van de eerste afbraakstap de meest doelmatige inductor is (zie 1.3.4). De verklaring van deze tegenstelling is waarschijnlijk te vinden in het feit dat ornithine moeilijker dan arginine door gistcellen wordt opgenomen (ongepubliceerde waarnemingen). Hierdoor zal de concentratie van ornithine in de cel bij groei in een medium met ornithine lager zijn dan bij groei in een medium met arginine. De vraag of arginine dan wel ornithine de inductor is van de arginine-afbraakweg in gist, kan daarom alleen worden beantwoord met behulp van arginase-negatieve mutanten.

De inductie van arginase en OTA blijkt door verscheidene C-bronnen niet te worden verhinderd. Ondanks het feit dat deze C-bronnen duidelijk invloed uitoefenen op de specifieke activiteiten in arginine-vrij medium, lijkt kataboliet-repressie door C-verbindingen geen belangrijke rol te spelen in de regulatie van de enzymvorming, daar de inductie van de enzymen door arginine door geen der onderzochte C-bronnen wordt verhinderd. Wel wordt de opname van arginine uit het medium door enkele C-bronnen vermindert. Het ontbreken van kataboliet-repressie is in tegenspraak met de waarnemingen van LAISHLEY en BERNLOHR (1966, 1968), die een sterke repressie van de arginase-weg in *Bacillus licheniformis* door glukose aantoonde, en met die van ELIASSON (1965) die sterke repressie van arginase door glukose en door succinaat aantoonde in CHANGS lever cellen.

Het duidelijk tegengaan door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ van de inductie van arginase en OTA door arginine of ornithine lijkt kwantitatief veel belangrijker te zijn dan eventuele kataboliet-repressie door koolstofverbindingen.

3.6 SAMENVATTING

1. De eerste stap van de arginine-afbraak in bakkersgist is de arginase-reaktie. Arginine-deïminase is niet in gist aanwezig.
2. De tweede stap is de transaminering van ornithine.
3. Arginase en OTA worden beide door arginine en, in mindere mate, door ornithine geïnduceerd.
4. De beide arginase-aktiviteiten (na aktivering met CoCl_2 , resp. MnCl_2) moeten aan één enkel arginase worden toegeschreven.
5. Kataboliet-repressie van arginase en OTA door C-verbindingen is niet duidelijk aangetoond.
6. De inductie van arginase en OTA door arginine en door ornithine wordt door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ duidelijk tegengegaan.

HOOFDSTUK 4

DEREPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA TIJDENS STIKSTOF-UITPUTTING

4.1 INLEIDING

Tijdens dit onderzoek werd toevallig waargenomen dat de specifieke activiteiten van arginase en OTA sterk toenemen, wanneer gist gekweekt in een glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium enige uren wordt verdergekweekt in hetzelfde medium zonder de N-bron. Deze derepressie is geheel onverwacht daar geen arginine of ornithine aan de gist werd aangeboden. Omdat nadere bestudering van dit verschijnsel inlichtingen zou kunnen geven over de wijze waarop de synthese van arginase en OTA in gist wordt gereguleerd, werd nagegaan onder welke omstandigheden deze ongeïnduceerde derepressie van beide enzymen optreedt.

Het verloop van de derepressie tijdens N-uitputting met de tijd is te zien in Figuur 4.1. In deze proef werd aëroob in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium gekweekte gist aan N-uitputting onderworpen in een staande kultuur in glukose-medium. Binnen 2 uur na het begin van de N-uitputting zijn de specifieke activiteiten van arginase en OTA sterk toegenomen. Deze toeneming vindt vooral plaats tussen 15 en 45 minuten na het begin van de proef. Resultaten gelijk aan die in Figuur 4.1 werden verkregen bij N-uitputting in geaëreerd glukose-medium (MIDDELHOVEN, 1968). De derepressie moet aan enzym synthese de novo worden toege-

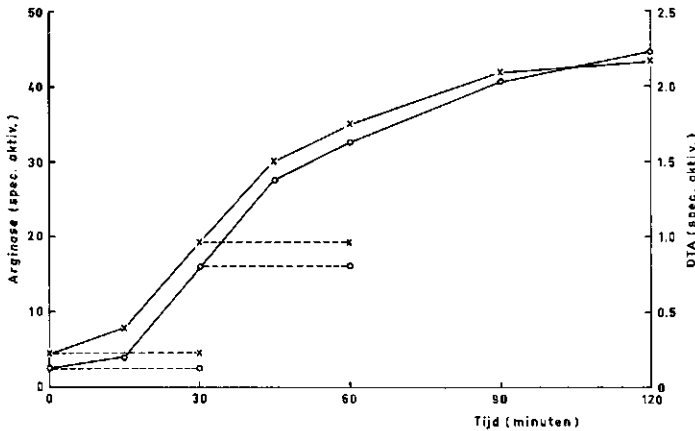


FIG. 4.1. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting. Aëroob in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium gekweekte gist werd gesuspendeerd (20 g/l) in N-vrij glukosemedium en bij 30° zachtjes geschud. Van tijd tot tijd werden monsters (50 ml) genomen voor bepaling van specifieke enzymactiviteiten. Cycloheximide werd op tijd 0 en na 30 minuten aan gedeelten van de kultuur toegevoegd (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die daarna nog 30 minuten werden geïnkubeerd. x—x arginase; o—o OTA; - - - cycloheximide toegevoegd.

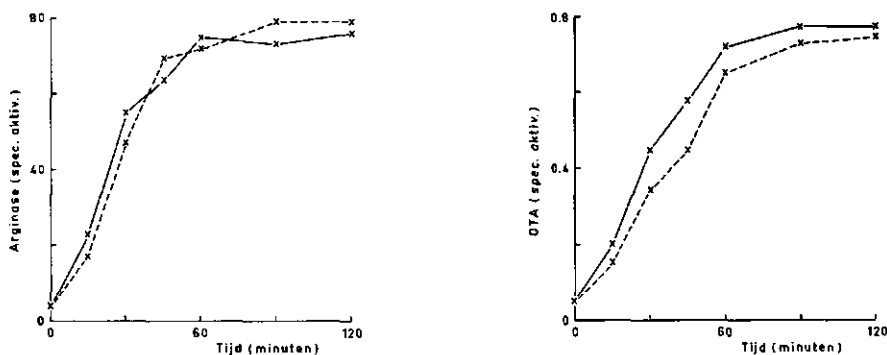


FIG. 4.2. Snelheid van arginase- en OTA-vorming tijdens inductie door arginine en tijdens N-uitputting. Aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist werd gesuspenderd (20 g/l) in geaëreerd glukose-medium, zonder N of met 10 mM L-arginine-HCl als N-bron. Vitaminen werden weggelaten. x—x zonder N; x - - - x met arginine.

schreven, omdat toevoeging van cycloheximide, zowel aan het begin van de proef, als na 30 minuten, de enzymproductie onmiddellijk en volledig remt. Cycloheximide is in eucaryotische cellen een remstof van de incorporatie van geactiveerde aminozuren in de polypeptide-keten (SIEGEL en SISLER, 1964a en b).

De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting leidt tot aanzienlijke specifieke activiteiten, groter dan waargenomen worden in gist van (NH₄)₂SO₄-media waaraan 5 mM L-arginine werd toegevoegd (zie Tabel 3.2), doch minder dan in gist gekweekt met arginine als enige N-bron (zie Tabel 4.13). De specifieke activiteiten in N-arme gist zijn ongeveer gelijk aan die in gist van glukose-pepton-medium (zie Tabel 4.4 en Tabel 6.3).

De snelheid van de enzym synthese tijdens N-uitputting en die tijdens inductie door arginine worden vergeleken in Figuur 4.2. In deze proef werd aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist verdergekweekt in glukose-media met en zonder 10 mM L-arginine. Uit deze media werden de vitaminen weggelaten, om groei in het glukose-arginine-medium tegen te gaan en zodoende de vergelijking meer zinvol te maken. De toevoeging van arginine aan het N-deficiënte medium blijkt de derepressie van arginase en OTA niet te versnellen of te vergroten.

4.2 VERBAND TUSSEN DE DEREPRESSIE EN DE ENERGIE-VOORZIENING

Remstoffen van de aërobe en de anaërobe glukose-afbraak blijken in staat te zijn de derepressie van arginase en OTA geheel te verhinderen. In Tabel 4.1 is het effect van deze stoffen duidelijk te zien. Klaarblijkelijk is de derepressie volledig van de energie-voorziening afhankelijk.

Een schatting van de hoeveelheid energiebron die voor de derepressie nodig is, kan worden gemaakt door gist te suspenderen in N-vrije media met variabele glukose-koncentratie. Het blijkt dat aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium ge-

TABEL 4.1. Remming van de derepressie tijdens N-uitputting door remstoffen van de aërobe en anaërobe glukose-afbraak.

Aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist werd gedurende 2 uur bij 30° in staande kultuur verdergekweekt (1 g/50 ml) in N-vrij glukose-medium.

	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
Kontrole	1,5	0,12
Geen remstof	43,4	1,73
2,4-Dinitrofenol (1 mg/ml)	1,5	0,11
NaAsO ₂ (1 mg/ml)	1,8	0,17
Na ₂ HAsO ₄ (5 mg/ml)	1,5	0,15
KCN (1 mg/ml)	4,7	0,24
NaF (5 mg/ml)	1,5	0,15
NaHSO ₃ (1 mg/ml)	1,4	0,13

kweekte gist kennelijk over zoveel reservestof beschikt dat na aëratie in een medium zonder C- en N-bron al duidelijke derepressie optreedt (zie Tabel 4.8 en Tabel 4.9). In gist gekweekt in melkzuur-(NH₄)₂SO₄-medium treedt derepressie van arginase en OTA alleen op indien het N-vrije medium een C- en energiebron bevat. In Tabel 4.2 is het verband tussen de glukose-koncentratie en de derepressie tijdens N-uitputting van in melkzuur-medium gekweekte gist weergegeven. Zonder glukose treedt geen derepressie op; bij concentraties vanaf 10 mg/50 ml is dat, althans voor arginase, wel het geval; 50 mg/50 ml (1 g gist) is reeds optimaal.

TABEL 4.2. Invloed van de glukose-koncentratie op de derepressie tijdens N-uitputting van in melkzuur-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist.

In melkzuur-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist werd gesuspenderd (1 g/50 ml) en 2 uur bij 30° geaëreerd in N-vrij medium met variabele glukose-koncentratie.

	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
Kontrole	5,2	0,12
Glukose-koncentratie (mg/50 ml)		
0	5,4	0,12
5	5,2	0,12
10	7,8	0,12
20	23,6	0,14
50	33,6	0,38
100	28,2	0,42
200	27,0	0,45
2000	28,2	0,45

4.3 VERSCHIJNSELEN DIE DE DEREPPRESSIE TIJDENS STIKSTOF- UITPUTTING BEGELEIDEN

Voor beter begrip van de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist is het van belang te weten, door welke verschijnselen dit proces wordt begeleid. Veranderingen in de celsamenstelling, en in specifieke activiteiten van andere enzymen werden onderzocht.

De veranderingen in de celsamenstelling die optreden als gevolg van N-uitputting zijn in Tabel 4.3 weergegeven. In deze proef werd aëroob in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium gekweekte gist gedurende 4 uur bij 30° geaëreerd in N-vrij glukose-medium. Voor en na de N-uitputting werden de specifieke activiteiten van arginase en OTA, het aantal cellen en verschillende celbestanddelen bepaald. De werkwijzen zijn onder 2.6 beschreven.

TABEL 4.3. Veranderingen in de celsamenstelling als gevolg van N-uitputting.

In geaëreerd glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium gekweekte gist werd gesuspenderd (10 g/l) in N-vrij glukose-medium en gedurende 4 uur bij 30° geaëreerd. De uitkomsten van de bepalingen zijn uitgedrukt in mg of mmol per g droge onbehandelde gist.

	Kontrole	N-deficiënt
Arginase (spec. aktiv.)	3,5	58,5
OTA (spec. aktiv.)	0,08	2,10
Aantal cellen $\times 10^9$ (per g nat)	13,5-16,5	14,5-17,5
Drooggewicht (g)	1,000	1,570
Polysaccharide (mg)	192	425
Totaal N (mg)	117	118
Fractie vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden (mg N)	29,5	17,2
Nucleïnezuur-fractie (mg N)	16,0	17,0
Polypeptide-fractie (mg N)	71,5	83,8
DNA (μg fosfaat)	1,7	2,0
Aminozuren (mmol α -amino-N)	0,74	0,58
Vrij arginine (mmol)	0,12	0,03

Ondanks een duidelijk toenemen van het drooggewicht van de kultuur tijdens N-uitputting, nemen het aantal cellen en de totale hoeveelheid DNA niet noemenswaard toe. De toeneming van het drooggewicht moet worden toegeschreven aan synthese van reserve-materiaal, in dit geval polysaccharide, en, mogelijk, aan toeneming van het asgehalte (niet bepaald). Synthese van reserve-materiaal tijdens N-deficiëntie wordt algemeen in mikroorganismen waargenomen (MULDER, DEINEMA, VAN VEEN en ZEVENHUIZEN, 1962).

De totale hoeveelheid N en de totale hoeveelheid nucleïnezuur in de gistkultuur veranderen tijdens N-uitputting niet. Wel vindt een duidelijke toeneming plaats van de polypeptide-fractie ten koste van de fractie der vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden. De laatstgenoemde fractie, bepaald als N volgens de KJELDAHL-methode, neemt met 42% af tijdens N-uitputting. Als deze fractie wordt bepaald als α -amino-N volgens de ninhydrine-methode, blijkt de afneming tijdens N-uitputting 22% te zijn. Dit zou kunnen worden verklaard door

hydrolyse van peptiden, waarbij immers α -amino-groepen vrijkomen of, waarschijnlijker, door omzetting van vrij arginine tot andere aminozuren. Tijdens N-uitputting vermindert de concentratie vrij arginine in gist tot 25%. Als de 4 N-atomen die per molecuul afgebroken arginine vrijkomen, in andere aminozuren worden vastgelegd, is de relatief geringe afnemning van α -amino-N in de vrije-aminozuren-fractie gedeeltelijk verklaard.

Uit Tabel 4.3 blijkt niet alleen dat de enzymen arginase en OTA tijdens N-uitputting sterk worden gedepresseerd, maar ook dat deze enzymen zeer werkzaam zijn bij de afbraak van de voorraad vrij arginine van de gist. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-gebrek van gist stelt de gist in staat arginine als N-reservestof te gebruiken. Het fysiologisch belang hiervan is niet bekend. In dit opzicht is het interessant te weten of de derepressie tijdens N-uitputting tot arginase en OTA beperkt blijft, of dat dit verschijnsel ook door andere enzymen wordt vertoond.

In Tabel 4.4 (eerder als korte mededeling gepubliceerd, MIDDELHOVEN, 1968) zijn de specifieke activiteiten van enkele enzymen vermeld, die alle betrokken zijn bij de afbraak van eiwit of aminozuren. Deze activiteiten werden bepaald in aëroob gekweekte gist van glukose-(NH₄)₂SO₄-medium, voor en na N-uitputting in geaëreerd glukose-medium, en in aëroob gekweekte gist van glukose-pepton-medium. De bepaalde enzymen zijn: arginase, OTA, proteïnase, glutaminezuur-dehydrogenase (NAD-specifiek), threonine-dehydratase, asparaginase en glutaminase. De werkwijzen zijn onder 2.5 beschreven. Pogingen, aspartase en histidase in celextrakten van stam B aan te tonen, mislukten. De onderzochte proteïnase werkt bij pH 6,2 in aanwezigheid van hoge concentraties ureum en is in gist aangetoond door LENNEY (1956). De NAD-specifieke glutaminezuur-dehydrogenase heeft in gist een katabolische functie en wordt door NH₄-zouten gerepresseerd (HIERHOLZER en HOLZER, 1963). De threonine-dehydratase in gist heeft zowel een functie bij de isoleucine-synthese als bij de threonine-afbraak. Ook dit enzym wordt door NH₄-zouten gerepresseerd (CENNAMO,

TABEL 4.4. Beïnvloeding van specifieke enzymactiviteiten door N-uitputting van gist.

In geaëreerd glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist werd gesuspendeerd (20 g/l) in N-vrij glukose-medium en 4 uur bij 30° geaëreerd. De specifieke activiteiten (bepaald volgens 2.5.4 tot 2.5.8) voor en na N-uitputting worden vergeleken met die in aëroob gekweekte gist van glukose-pepton-medium. De opgegeven waarden zijn de uitersten van tenminste 4 waarnemingen.

Kweekmedium	Glukose-(NH ₄) ₂ SO ₄		Glukose-pepton
	Kontrole	N-deficiënt	
Arginase	2,5-5,0	30-95	35-85
OTA	0,04-0,25	0,80-2,75	1,30-2,75
Proteïnase	390-540	300-535	550-650
Glutaminezuur-dehydrogenase (NAD)	0,036-0,12	0,035-0,093	0,18-0,35
Threonine-dehydratase	16,6-22,6	15,0-24,3	12,6-16,6
Asparaginase	1,25-1,90	0,80-1,40	1,00-1,13
Glutaminase	0,13-0,17	0,15-0,18	0,16-0,20

BOLL en HOLZER, 1964). Asparaginase en glutaminase zijn enzymen die veelvuldig als N-reservestoffen voorkomende amiden afbreken. Asparaginase werd in gist door GRASSMANN en MAYR (1933) aangetoond. Glutaminase werd bepaald bij pH 8,0 in aanwezigheid van fosfaat, onder omstandigheden die door ERRERA (1949) als optimaal werden beschreven voor aantoning van de dierlijke, aan mitochondriën gebonden glutaminase. Celextracten van gist bleken bij pH 4,9 glutamine nauwelijks aan te tasten in tegenstelling tot extracten van *Escherichia coli* en *Clostridium welchii* (MEISTER, 1955).

Uit Tabel 4.4 blijkt duidelijk dat de derepressie tijdens N-uitputting alleen door arginase en OTA wordt vertoond. De specifieke activiteiten van deze enzymen in N-deficiënte gist zijn ongeveer even groot als die in gist van glukose-pepton-medium. De andere enzymen worden niet gederepseerd. Ook glutaminezuur-dehydrogenase niet, dat in pepton-medium wordt geïnduceerd en dat in gist het produkt van de arginine-afbraak verder tot 2-oxoglutaraat en NH_3 afbreekt. De specifieke activiteiten van proteïnase, threonine-dehydratase, asparaginase en glutaminase worden blijkbaar door de N-bron weinig beïnvloed. Het niet optreden van derepressie tijdens N-uitputting is daarom bij deze enzymen minder verwonderlijk dan in het geval van glutaminezuur-dehydrogenase.

4.4 DEREPRESSIE BIJ ANDERE GISTSTAMMEN

De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting komt niet alleen bij *Saccharomyces cerevisiae* voor, maar ook bij andere gistsoorten. Verscheidene stammen uit de kollektie van het Laboratorium voor Microbiologie te Wageningen werden gekweekt in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium in een intensief geschudde kultuur. De N-uitputting werd uitgevoerd in geaëreerd N-vrij glukose-medium. In Tabel 4.5 (eerder als korte mededeling gepubliceerd, MIDDELHOVEN, 1968)

TABEL 4.5. Invloed van N-deficiëntie op de specifieke activiteiten van arginase en OTA in verschillende gisten.

De gisten werden aëroob gekweekt in 4% glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium in een intensief geschudde kultuur (1 l medium in een erlenmeyer van 5 l). De N-uitputting werd uitgevoerd door 1 g gist in 50 ml N-vrij glukose-medium 4 uur bij 30° te aëren.

	Arginase		OTA	
	Kontrole	N-deficiënt	Kontrole	N-deficiënt
<i>Candida bogoriensis</i>	17,5	18,3	0,05	0,08
<i>Candida utilis</i>	1,8	34,5	0,15	0,65
<i>Cryptococcus albidus</i>	4,4	3,5	0,10	0,13
<i>Hansenula anomala</i>	0,46	4,0	0,03	0,10
<i>Lipomyces starkeyi</i>	15,5	14,7	0,41	0,40
<i>Rhodotorula glutinis</i>	22,6	7,8	0,06	0,11
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (stam B)	2,2	55,5	0,10	0,65
<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	11,2	15,0	0,19	0,17
<i>Sporobolomyces holsaticus</i>	13,6	13,1	0,04	0,05
<i>Torula cremoris</i>	5,3	20,9	0,18	0,36

is de invloed van N-uitputting op de specifieke activiteiten van arginase en OTA te zien. De nomenclatuur van de gisten is die volgens LODDER en KREGER-VAN RIJ (1952). Derepressie van beide enzymen wordt vertoond door ascosporene gisten (*S. cerevisiae* en *Hansenula anomala*) en door asporogene (*Candida utilis* en *Torula cremoris*). In *Rhodotorula glutinis* wordt arginase gedurende N-uitputting geïnactiveerd. In de andere gistsoorten heeft N-uitputting geen invloed op de specifieke enzymactiviteiten. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting is blijkbaar een eigenschap van vele, doch niet van alle gisten.

In *S. cerevisiae* wordt derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting behalve door stam B ook door andere stammen, waaronder vele haploïde, auxotrofe mutanten, vertoond. Deze stammen werden verkregen van DR. G. E. MAGNI van het Istituto di Genetica van de Universiteit van Parma, Italië, en van DR. R. C. VON BORSTEL, Biology Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, V.S.

Van DR. MAGNI werden verkregen de stammen:

1341, α -can^R, een mutant resistent tegen kanavanine (een analoog van arginine);
1419, α -asp-gua-can^R, afgeleid van stam 1341, asparaginezuur-en-guanine-behoef-
tig;

1265, α -try₅-met-can^R, een kanavanine-resistente mutant, die tryptofan- en methionine-behoef-
tig is.

Van DR. VON BORSTEL werden verkregen de stammen:

S 288 C, wild;

S 288 C-27, α -ileu₁, isoleucine-behoef-
tig;

DV-147, α -ade₂, adenine-behoef-
tig;

S 1238 D, a-ade₃-ur₁, adenine- en uracil-behoef-
tig;

X 1049-9 C, a-thr₅-try₁-ur₃-his₈-arg₈; opgegeven voedingseisen: threonine, tryptofan, uracil, histidine en arginine. De stam bleek in plaats van threonine asparaginezuur nodig te hebben en zijn arginine-behoefte gemakkelijk te verliezen. Het onderzoek werd met de revertant uitgevoerd.

TABEL 4.6. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van mutanten van *S. cerevisiae*.

De stammen werden in geaëreerd glukose-(NH₄)₂SO₄-medium (waaraan toegevoegd de noodzakelijke verbindingen in een concentratie van 50 mg/l) gekweekt. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur in N-vrij glukose-medium (1 g gist per 50 ml, 4 uur bij 30°).

Giststam	Arginase spec. aktiv.		OTA spec. aktiv.	
	Kontrole	N-deficiënt	Kontrole	N-deficiënt
1341, α -can ^R	4,6	55,0	0,06	0,48
1419, α -asp-gua-can ^R	2,3	2,3		
1265, α -try ₅ -met-can ^R	37,7	30,0	0,23	0,31
S 288 C, wild	4,2	53,5		
S 288 C-27, α -ileu ₁	6,0	16,7	0,07	0,15
DV-147, α -ade ₂	3,2	14,9	0,17	0,30
S 1238 D, a-ade ₃ -ur ₁	5,7	9,7	0,35	0,48
X 1049-9 C, a-thr ₅ -try ₁ -ur ₃ -his ₈ -arg ₈	12,0	26,0	0,12	0,26

Al deze stammen werden aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekt. Hieraan werden voor de groei noodzakelijke aminozuren, purinen en pyrimidinen toegevoegd in een concentratie van 50 mg/l. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur, in N-vrij glukose-medium.

In Tabel 4.6 is te zien dat derepressie van arginase en OTA ten gevolge van N-deficiëntie in de meeste stammen optreedt. In de auxotrofe mutanten is de derepressie minder duidelijk dan in een wilde stam (S 288 C) of een kanavanine-resistente stam (1341). In enkele auxotrofe mutanten is de derepressie zeer gering (S 1238 D) of niet aantoonbaar (1419). Stam 1265 schijnt een konstitutief hoge arginase-aktiviteit te hebben, die tijdens N-uitputting niet verhoogd wordt.

4.5 INVLOED VAN DE KOOLSTOFBRON OP DE DEREPRESSIE

De derepressie van arginase en OTA in stam B en in andere gisten treedt op als gevolg van N-deficiëntie. De vraag doet zich voor of de N-deficiëntie op de een of andere manier zelf de oorzaak van de derepressie is, of dat de derepressie wordt veroorzaakt door ophoping van metabolieten van de C-bron, die in normaal groeiende gist snel verwerkt worden. Deze, normaliter in lage concentratie aanwezige metabolieten zouden een inducerende werking kunnen hebben. Ter beantwoording van deze vraag is het belangrijk na te gaan wat de invloed van de aard van de C-bron op de derepressie is. Om dit te bestuderen werd in enkele proeven de glukose in het kweekmedium, of die in het N-uitputtingsmedium door andere C-bronnen vervangen.

In Tabel 4.7 is de invloed van de C-bron in het kweekmedium weergegeven. Stam B werd in (NH₄)₂SO₄-media met verschillende C-bronnen en onder verschillende omstandigheden gekweekt, en vervolgens aan N-uitputting onderworpen in staande kultuur in glukose-medium. Duidelijk blijkt dat beide enzymen tijdens N-uitputting worden gederepresseerd, onverschillig met welke C-bron de gist werd gekweekt. De derepressie in gist gekweekt in ethanol-medium is betrekkelijk gering. Stam B groeit in dit medium langzaam (zie Tabel 2.2) en

TABEL 4.7. Invloed van de C-bron in het kweekmedium op de derepressie van arginase en OTA.

Stam B werd gekweekt in (NH₄)₂SO₄-media met verschillende C-bronnen en onder verschillende omstandigheden. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur (1 g gist per 50 ml N-vrij glukose-medium, 2 uur bij 30°).

C-bron en kweekomstandigheden	Arginase spec. aktiv.		OTA spec. aktiv.	
	Kontrole	N-deficiënt	Kontrole	N-deficiënt
Glukose, geaëreerd	2,5- 5,0	35- 93	0,04-0,25	1,05-2,70
Glukose, staand	0,5- 4,5	32- 54	0,19-0,22	0,80-2,10
Galaktose, geaëreerd	11,5-15,0	42- 56	0,34-0,43	1,13-2,21
Ethanol, aëroob	3,7- 4,8	27- 37	0,07-0,15	0,52-0,70
Melkzuur, aëroob	5,2-10,5	33-103	0,28-0,47	1,28-2,20

heeft dan waarschijnlijk een kleinere voorraad vrije aminozuren als substraat voor de enzym synthese beschikbaar dan snel-groeiende gist.

Vervanging van de glukose in het N-uitputtingsmedium door andere C-bronnen heeft tot gevolg dat de activiteiten van arginase en OTA van in glukose-medium gekweekte gist niet uitstijgen boven die welke worden waargenomen als gist uitsluitend de endogene energie-voorraad ter beschikking heeft (Tabel 4.8, linker twee kolommen). Aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist werd aan N-uitputting onderworpen in N-vrije media met verscheidene C-bronnen onder verschillende omstandigheden. Alleen in glukose-medium, zowel aëroob (geaëreerd) als anaëroob (in uitgekookt medium onder paraffine) treedt duidelijk derepressie op. Geen der andere C-bronnen is in staat de derepressie die optreedt met de endogene energie-reserve, te vergroten. Dit kan zijn oorzaak hebben in de onvervangbaarheid van glukose, maar ook in het feit dat in glukose-medium gegroeide gist andere C-bronnen niet onmiddellijk kan assimileren. Glukose heeft in grote concentraties een represserende werking op verscheidene enzym systemen die bij de aërobe koolhydraat-afbraak betrokken zijn (EPHRUSI c.s., 1956; POLAKIS en BARTLEY, 1965). Omdat galaktose deze represserende werking niet bezit (TUSTANOFF en BARTLEY, 1964) werden de proeven herhaald met in geaëreerd galaktose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist (Tabel 4.8, rechter twee kolommen). Duidelijk is te zien dat de derepressie van arginase tijdens N-uitputting door alle aangeboden C-bronnen ongeveer even sterk wordt gestimuleerd. Omdat deze C-bronnen onderling sterk in structuur verschillen is de inductie van arginase en OTA door een zich ophopende metabooliet van de koolhydraat-afbraak onwaarschijnlijk. Het is beter de verklaring voor de derepressie van deze enzymen tijdens N-uitputting te zoeken in factoren die meer direkt verband houden met de N-deficiëntie of met de stilstand van de groei.

TABEL 4.8. Invloed van de C-bron in het N-uitputtingsmedium op de derepressie van arginase en OTA.

Gist werd gekweekt in geaëreerd (NH₄)₂SO₄-medium, met 4% glukose of 2,5% galaktose als C-bron. De N-uitputting werd uitgevoerd bij 30° gedurende 3 (glukose-gist) of 2 uur (galaktose-gist) in N-vrije media met verschillende C-bronnen (1 g gist per 50 ml). De opgegeven waarden zijn specifieke enzymaktiviteiten.

C-bron in kweekmedium:	Glukose		Galaktose	
	Arginase	OTA	Arginase	OTA
Kontrole	2,0	0,03	11,5-15,0	0,34-0,43
C-bron en kweekomstandigheden tijdens N-uitputting				
Geen C-bron (geaëreerd)	12,0	0,20	10,5	0,33
4% Glukose (geaëreerd)	40,0-90,0	1,20-2,80	42,0-56,0	1,13-2,21
10% Glukose (anaëroob)	40,0-90,0	1,20-2,80	71,0-79,0	2,16-3,75
2,5% Galaktose (geaëreerd)	12,5	0,25	45,0-47,0	1,35-1,36
2% Na-pyruvaat pH 4,0 (aëroob)	12,7	0,24	70,0-73,0	0,55-1,31
2% Na-laktaat pH 4,0 (aëroob)	12,8	0,23	54,0-67,0	0,44-1,55
2% Ethanol (aëroob)	13,0	0,26	62,0	0,93

4.6 DE DEREPPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA IN GIST NA UITPUTTING VAN VERSCHILLENDE NUTRIËNTEN

Ter bestudering van het mechanisme van de derepressie tijdens N-uitputting is het van belang na te gaan hoe de specifieke activiteiten van arginase en OTA zich ontwikkelen als gist wordt verdergekweekt in media, waaruit andere voor de groei essentiële bestanddelen worden weggelaten. Stam B werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. De uitputtingsproeven werden uitgevoerd door 1 g gist bij 30° te schudden met 150 ml 10% glukose-(NH₄)₂SO₄-medium waaruit één of meer bestanddelen werden weggelaten; bij fosfaat-uitputting werd slechts 0,2 g gist gebruikt. Sulfaat werd weggelaten door vervanging van het (NH₄)₂SO₄ door een equivalente hoeveelheid NH₄Cl. Tijdens de Mg-uitputting werden tevens CaCl₂, NaCl en spore-elementen weggelaten. Uitputting van de voorraad van deze elementen werd onwaarschijnlijk geacht. Om zeker te zijn dat werkelijk deficiënte gist werd verkregen, zijn de uitputtingsproeven gedurende 16 uur uitgevoerd en werden de gistopbrengsten vergeleken met die in compleet medium.

In Tabel 4.9 is te zien dat fosfaat-, sulfaat- of Mg-uitputting de specifieke activiteiten van arginase en OTA niet vergroot, ondanks het feit dat de groei door de deficiëntie van de betrokken media duidelijk wordt beperkt. De derepressie is het grootst wanneer de N-bron uit het medium wordt weggelaten. Gelijktijdig weglaten van de glukose vermindert deze derepressie. Verder treedt, ook in aanwezigheid van de N-bron, een duidelijke derepressie op, wanneer de vitaminen worden weggelaten. Deze derepressie is veel minder dan die tijdens N-uitputting. Bovendien blijkt dat beide derepressies niet additief zijn, indien de gist tegelijk van de N-bron en van de vitaminen wordt beroofd. Het uitblijven van derepressie na een fosfaat-, sulfaat- of Mg-uitputting toont aan dat stilstand van de groei

TABEL 4.9. Specifieke activiteiten van arginase en OTA na uitputting van verschillende nutriënten.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. De uitputtingsproeven werden uitgevoerd gedurende 16 uur bij 30°, door 1 g gist (tijdens fosfaat-uitputting 0,2 g) te schudden met 150 ml 10% glukose-(NH₄)₂SO₄-medium waaruit één of meer bestanddelen werden weggelaten.

	Gistopbrengst (g nat)	Arginase	OTA
Kontrole		2,2	0,03
Weggelaten bestanddelen:			
NH ₄ ⁺	1,4	39,0	0,25
NH ₄ ⁺ en vitaminen	1,4	39,0	0,25
NH ₄ ⁺ en glukose	0,9	10,5	0,07
Vitaminen	1,6	12,5	0,07
Fosfaat	0,95	3,2	0,04
Sulfaat	1,8	3,4	0,04
Mg en spore-elementen	1,7	2,6	0,04
Geen	3,5	2,5	0,04

en ophoping van glukose-katabolieten in de gist geen voorwaarde zijn voor de derepressie. De oorzaak van de laatste moet worden gezocht in N-deficiëntie en, in mindere mate, in vitamine-deficiëntie. Gezien het eerder waargenomen tegengaan door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ van de inductie van arginase en OTA door arginine (Tabel 3.1) lijkt het waarschijnlijk dat de vorming van deze enzymen door NH_4 -ionen of door andere N-verbindingen wordt gerepresseerd. Deze repressie zou tenietgedaan kunnen worden zowel door toevoeging van arginine aan de gistkultuur, als door N-deficiëntie. Als de repressie door N-verbindingen een omkeerbaar proces is, zou het heel goed kunnen zijn dat de repressor onder omstandigheden van N-deficiëntie van het enzym-vormend systeem loslaat en dissocieert. Dit zou een verklaring kunnen zijn van de derepressie tijdens N-uitputting. De derepressie tijdens vitamine-uitputting kan worden verklaard door aan te nemen dat N-verbindingen hun represserende werking slechts in samenwerking met één of meer vitaminen kunnen uitoefenen. Deze laatste werkhypothese zal in Hoofdstuk 5 nader worden uitgewerkt.

4.7 INVLOED VAN STIKSTOF-VERBINDINGEN OP DE SYNTHESE VAN ARGINASE EN OTA

In de proeven die tot nu toe werden beschreven werd de derepressie van arginase en OTA bepaald na N-uitputting van gist die met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als N-bron was gekweekt. Als deze derepressie inderdaad wordt veroorzaakt door het wegvallen van een repressie door N-verbindingen, is het van belang te weten welke invloed andere N-bronnen op de specifieke activiteiten van arginase en OTA hebben en welk effect N-uitputting na groei met die andere N-bronnen heeft. In Tabel 4.10 zijn proeven vermeld waarin deze effecten werden nagegaan. Duidelijk is te zien dat de N-bron slechts weinig invloed heeft op de specifieke activiteiten van beide enzymen, en dat N-uitputting in alle gevallen tot sterke derepressie leidt. De veronderstelde repressie van beide enzymen door N-verbindingen is blijkbaar geenszins tot $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ beperkt.

Als de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting werkelijk wordt veroorzaakt door het wegvallen van de repressie van deze enzymen door N-verbindingen, mag worden verwacht dat N-verbindingen deze derepressie remmen. Mogelijk kunnen uit deze remmingsproeven inlichtingen worden verkregen over de identiteit van de N-verbindingen die als co-repressor van het systeem optreden. Toevoeging van goed assimileerbare N-verbindingen, die onder aërobe omstandigheden in glukose-medium als enige N-bron dienst kunnen doen, remt de derepressie van arginase en OTA duidelijk. In Tabel 4.11 zijn resultaten van proeven vermeld, waarin gist van geaëreerd glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium werd overgebracht naar staande kulturen in glukose-medium, zonder N of met 40 mM N in de vorm van verschillende goed assimileerbare aminozuren. In de meeste gevallen wordt de derepressie van arginase voor 80% of meer geremd. Proline, γ -aminoboterzuur, threonine, valine en isoleucine remmen de derepressie minder duidelijk. De derepressie van OTA wordt sterker geremd dan die van arginase.

TABEL 4.10. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist die met verschillende N-bronnen was gekweekt.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-media met diverse N-bronnen. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur in N-vrij glukose-medium (1 g gist per 50 ml, 2 uur bij 30°).

N-bron	Arginase spec. aktiv.		OTA spec. aktiv.	
	Kontrole	N-deficiënt	Kontrole	N-deficiënt
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,6	50,0	0,04	2,40
L-Glutaminezuur	5,1	35,0	0,14	2,00
L-Asparaginezuur	5,7	45,0	0,18	2,60
L-Asparagine	1,7	42,8	0,10	1,85
DL-Alanine	5,1	41,4	0,02	1,65
γ-Aminoboterzuur	3,3	44,0	0,27	2,50

TABEL 4.11. Remming van de derepressie van arginase en OTA door goed assimileerbare N-verbindingen.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. De derepressie werd gedurende 1 1/2 uur bij 30° uitgevoerd in staande kultuur (1 g gist per 50 ml) in N-vrij glukose-medium, waaraan de vermelde N-verbindingen werden toegevoegd in een concentratie van 40 mM N (L-isomeer).

	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
Kontrole	3,5	0,08
Toegevoegde N-verbinding:		
Geen	58,5	2,10
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,5	0,12
DL-Alanine	12,8	0,16
γ-Aminoboterzuur	26,6	0,75
L-Asparagine	3,5	0,08
L-Asparaginezuur	8,4	0,14
L-Fenylalanine	14,5	0,14
L-Glutamine	12,3	0,30
L-Glutaminezuur	14,0	0,34
DL-Homoserine	16,7	0,22
L-Isoleucine	22,2	0,21
L-Leucine	14,0	0,20
L-Methionine	14,0	0,16
L-Proline	39,2	1,09
L-Serine	12,3	0,14
L-Threonine	25,0	0,28
L-Valine	25,0	0,34

Toevoeging van N-verbindingen die niet of moeilijk assimileerbaar zijn, aan een N-arme gistcultuur remt de derepressie van arginase en OTA in een aantal gevallen wel, maar meestal niet (Tabel 4.12). Onder assimileerbaarheid wordt hier verstaan het vermogen van de gist tot groei in een glukose-medium met de N-verbinding als enige N-bron onder aërobe omstandigheden, visueel waargenomen na enting met een juist zichtbare hoeveelheid entmateriaal (per 10 ml 1 druppel jonge cultuur in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium). Met goed assimileerbare N-bronnen (zie Tabel 4.11) trad binnen 24 uur sterke troebeling op, met zwak assimileerbare pas na enkele dagen. Indien na enkele dagen geen troebeling optrad werd de N-verbinding als niet-assimileerbaar beschouwd. Met enkele N-verbindingen als N-bron trad nauwelijks aantoonbare groei op; de cultuur werd pas na enkele dagen zeer licht troebel. Verscheidene niet-assimileerbare N-verbindingen (choline, histidine, homocysteïne, kadaverine, kreatine en lysine) remmen de derepressie niet, zoals mag worden verwacht. Door andere niet of nauwelijks assimileerbare N-verbindingen (β-alanine, β-aminoboterzuur en glycine) wordt de derepressie zeer duidelijk geremd. Door de onderzochte zwak-assimileerbare N-bronnen (α-aminoboterzuur, tryptofan en ureum) en door enkele niet-assimileerbare N-verbindingen (cysteïne en putrescine) wordt de derepressie van arginase enigszins geremd. Evenals in de proef van Tabel 4.11 met de

TABEL 4.12. Remming van de derepressie van arginase en OTA door niet of moeilijk assimileerbare N-verbindingen.

De proef werd op dezelfde wijze uitgevoerd als die van Tabel 4.11. Onder assimilatie van de N-verbinding wordt verstaan het vermogen van de gist, aëroob in glukose-medium te groeien met de N-verbinding als enige N-bron. + betekent zwak-assimileerbaar, ± nauwelijks aantoonbare groei, — geen groei.

	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.	Assimilatie
Kontrole	3,5	0,08	
Toegevoegde N-verbinding:			
Geen	58,5	2,10	
β-Alanine	7,9	0,14	—
DL-α-Aminoboterzuur	22,4	0,21	+
DL-β-Aminoboterzuur	10,6	0,18	—
Choline-HCl	50,3	1,19	—
L-Cysteïne	26,6	0,22	—
Glycine	18,3	0,23	±
L-Histidine	90,4	1,39	—
DL-Homocysteïne	58,5	1,09	±
Kadaverine	56,3	1,19	—
Kreatine	58,5	1,70	—
L-Lysine	58,5	0,94	—
Putrescine	42,0	1,03	—
L-Tryptofan	34,3	0,94	+
Ureum	21,1	0,31	+

goed assimileerbare N-bronnen werd waargenomen, wordt de derepressie van OTA veel sterker geremd dan die van arginase.

In de proeven van Tabel 4.11 en Tabel 4.12 werden de N-verbindingen aan het begin van de proef toegevoegd. Het is interessant te weten wat er gebeurt als remmende N-verbindingen worden toegevoegd aan een N-arme gistcultuur waarin de derepressie van arginase en OTA is begonnen, maar nog niet voltooid. In Figuur 4.3 is weergegeven het verloop van de specifieke activiteiten van arginase en OTA in een staande cultuur van gist, aëroob voorgekweekt in glukose-(NH₄)₂-SO₄-medium en overgebracht naar een N-vrij glukose-medium. Aan gedeelten van deze N-arme cultuur werden na 30 minuten verscheidene assimileerbare en niet-assimileerbare N-verbindingen toegediend. In Figuur 4.3 zijn de resultaten van glutaminezuur-toevoeging weergegeven. Essentieel dezelfde waarnemingen werden gedaan, indien na 30 minuten NH₄Cl, DL-alanine, β-alanine, DL-α-aminoboterzuur, DL-β-aminoboterzuur, L-asparagine, L-asparaginezuur, L-cysteïne, glycine of L-methionine werden toegevoegd. Alleen ureum, dat bij toevoeging aan het begin van de proef wel remde (Tabel 4.12), deed dit niet als het na 30 minuten werd toegevoegd. Hoewel de specifieke activiteiten van arginase en OTA slechts met tussenpozen van 30 minuten werden bepaald, lijkt het erop dat de remming van de derepressie zeer snel optreedt. Indien men aanneemt dat de derepressie na toevoeging van de N-verbinding even snel als tevoren verloopt, en dan plotseling ophoudt, zou de remming binnen 5 tot 10 minuten volledig zijn. Dit geldt voor alle in Figuur 4.3 genoemde N-verbindingen.

De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting blijkt door tal van N-verbindingen te worden geremd. Dit is een duidelijke aanwijzing dat het verschijnsel inderdaad wordt veroorzaakt door het wegvallen van de repressie door

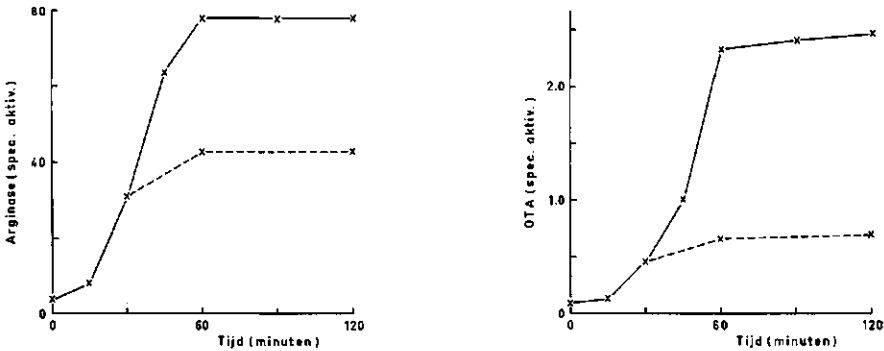


FIG. 4.3. Remming van de derepressie van arginase en OTA door N-verbindingen. Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. De derepressie werd uitgevoerd bij 30° in staande cultuur in N-vrij glukose-medium (20 g/l). Aan porties van 50 ml van deze N-arme cultuur werden na 30 minuten N-verbindingen toegevoegd (40 mM N, L-isomeer). In de weergegeven proef werd L-glutaminezuur gebruikt. Dezelfde resultaten werden bereikt met NH₄Cl, DL-alanine, β-alanine, DL-α-aminoboterzuur, DL-β-aminoboterzuur, L-asparagine, L-asparaginezuur, L-cysteïne, glycine en L-methionine. — zonder N; - - - N-verbinding toegevoegd.

N-verbindingen. Over de aard van de N-verbindingen die als co-repressor van het systeem kunnen optreden, is weinig te zeggen. Het is uit de gegevens van Tabel 4.11 duidelijk dat de meeste goed assimileerbare N-bronnen óf als co-repressor dienst kunnen doen, óf snel in represserende verbindingen kunnen worden omgezet. Omdat ook enkele niet- of zwak-assimileerbare aminozuren (β -alanine, β -aminoboterzuur en glycine) de derepressie tijdens N-uitputting remmen, onverschillig of ze aan het begin van de proef of na 30 minuten worden toegevoegd, is het waarschijnlijk dat meer dan één N-verbinding, de genoemde niet-assimileerbare inbegrepen, als co-repressor van het systeem kan optreden. Het is immers onwaarschijnlijk dat deze niet-assimileerbare N-verbindingen door gist in aanzienlijke mate tot andere verbindingen worden omgezet. β -Alanine is een tussenprodukt van de pantothenaat-synthese en het produkt van de decarboxylatie van asparaginezuur. Omdat stam B pantotheenzuur voor zijn groei nodig heeft, is het zeer de vraag of β -alanine tot pantotheenzuur kan worden verwerkt. β -Aminoboterzuur is een analoog van β -alanine en evenmin assimileerbaar. Glycine kan door gist alleen dan worden geassimileerd, wanneer tevens andere aminozuren aanwezig zijn (LEWIS en RAINBOW, 1965). Glycine is, evenals de beide β -aminozuren, niet giftig voor gist. De groei in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium wordt er niet door geremd, zodat de remming van de derepressie door deze aminozuren als specifiek moet worden beschouwd.

Nu gebleken is dat de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting door vele assimileerbare en niet-assimileerbare N-verbindingen wordt geremd, is het van belang te weten welke invloed deze verbindingen uitoefenen op de inductie van beide enzymen door arginine. Hiertoe werd gist aëroob gekweekt in glukose-medium met 10 mM L-arginine als N-bron, al of niet naast andere N-verbindingen (40 mM N, L-isomeer). In Tabel 4.13 is te zien dat de inductie van arginase en OTA beide slechts door $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, DL-alanine, L-asparagine en L-asparaginezuur duidelijk wordt tegengegaan. De inductie van OTA wordt door deze verbindingen sterker geremd dan die van arginase. Andere N-verbindingen remmen de inductie van arginase niet significant. De inductie van OTA wordt verder nog door DL- α -aminoboterzuur, β -alanine, L-glutaminezuur, glycine, L-leucine en ureum enigszins geremd; de remming is evenwel veel minder sterk dan bij de derepressie tijdens N-uitputting werd waargenomen (Tabel 4.11 en Tabel 4.12). Hoewel verscheidene N-verbindingen de inductie door arginine remmen, heeft het systeem dat arginase en OTA vormt kennelijk een grote affiniteit tot de inductor arginine. Alleen goed assimileerbare N-bronnen remmen de inductie door arginine duidelijk. Deze N-verbindingen kunnen blijkbaar als co-repressor dienst doen, of gemakkelijk tot represserende verbindingen worden omgezet. Glutaminezuur, het eindprodukt van de arginine-afbraak in gist, remt de inductie door arginine slechts weinig, ondanks het feit dat het beter assimileerbaar is dan alanine (Tabel 2.2). Het laatste aminozuur gaat de inductie wel duidelijk tegen. Kennelijk wordt de enzymvorming in de arginine-afbraakweg van gist niet gerepresseerd door het eindprodukt van de keten, maar door andere N-verbindingen.

TABEL 4.13. Het remmend effect van N-verbindingen op de inductie van arginase en OTA door arginine.

Gist werd aëroob gekweekt in glucose-10 mM L-arginine-medium, waaraan N-verbindingen in een concentratie van 40 mM N (L-isomeer) werden toegevoegd. De gegevens zijn de uiterste waarnemingen van tenminste 3 bepalingen.

N-bron	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
L-arginine	74-144	3,42-7,36
„ + (NH ₄) ₂ SO ₄	12- 65	0,97-1,33
„ + DL- α -aminoboterzuur	102-165	2,11-4,83
„ + γ -aminoboterzuur	78- 92	3,10-6,57
„ + DL-alanine	41- 80	1,61-2,83
„ + β -alanine	103-120	1,98-4,80
„ + L-asparagine	30- 52	0,27-0,54
„ + L-asparaginezuur	30- 51	0,38-0,97
„ + L-glutaminezuur	100-141	1,18-3,28
„ + glycine	33-116	1,92-2,60
„ + L-leucine	105-135	3,09-3,40
„ + ureum	61-146	2,65-3,21

4.8 DISKUSSIE

De proeven die in dit hoofdstuk zijn vermeld werden ten dele reeds eerder gepubliceerd als korte mededelingen (MIDDELHOVEN, 1967, 1968) en als verslag (MIDDELHOVEN, 1965a). Volledige publikatie als tijdschriftartikel volgt (MIDDELHOVEN, 1970).

Dit hoofdstuk gaat over de derepressie van arginase en OTA die optreedt als gist gekweekt in een arginine-vrij medium, wordt verdergekweekt in voedingsmedium waaruit de N-bron is weggelaten (Figuur 4.1). De specifieke activiteiten van beide enzymen nemen dan snel toe, even snel en in dezelfde mate als wanneer in arginine-vrij medium gekweekte gist wordt geïnkubeerd in glucose-medium zonder vitaminen met arginine als enige N-bron (Figuur 4.2). Binnen 2 uur zijn de specifieke activiteiten ongeveer even groot geworden als die in gist gekweekt in glucose-pepton-medium. Omdat toevoeging van cycloheximide (5 μ g/ml) zowel aan het begin van de proef, als na 30 minuten, wanneer de derepressie juist duidelijk op gang gekomen is, de toeneming van de specifieke activiteiten onmiddellijk volledig remt (Figuur 4.1), wordt gekonkludeerd dat deze toeneming aan enzym synthese de novo is te danken. Omdat geen arginine aan de gist werd aangeboden, wordt hier niet van een inductie gesproken, maar van derepressie tijdens N-uitputting. Cycloheximide remt in eucaryotische cellen de aminozuur-overdracht van aminoacyl-transfer-RNA naar het groeiende polypeptide (SIEGEL en SISLER, 1964b). Cycloheximide wordt algemeen als specifieke remstof van de eiwitsynthese beschouwd. Sinds echter bekend geworden is, dat dit antibioticum in lage concentraties (1 μ g/ml) ook anaërobe reacties in de glucose-afbraak in gist remt (FERGUSON, BOLL en HOLZER, 1967), is enige voorzichtigheid bij het maken van gevolgtrekkingen uit proeven met

deze verbinding geboden. Omdat de remming van de glukose-afbraak door intacte gistcellen zich pas 30 minuten na toevoeging van cycloheximide voordoet, en de in dit onderzoek waargenomen remming van de toeneming der specifieke activiteiten onmiddellijk optreedt, mag het laatste proces veilig aan enzym-synthese de novo worden toegeschreven.

De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting komt bij 4 van de 10 onderzochte gistsoorten voor. Hierbij zijn zowel ascosporogene als asporogene soorten (Tabel 4.5). Van *S. cerevisiae* vertoonden de meeste onderzochte stammen, waaronder vele haploïde, auxotrofe mutanten het verschijnsel (Tabel 4.6).

Stikstof-uitputting van gist brengt, behalve derepressie van arginase en OTA, nog andere verschijnselen teweeg (Tabel 4.3). Het aantal cellen en de totale hoeveelheid DNA nemen tijdens de proef niet of nauwelijks toe, althans niet binnen de periode die nodig is voor voltooiing van de derepressie. Evenmin veranderen de totale hoeveelheid stikstof in de gist-massa en de totale hoeveelheid nucleïnezuren (in gist hoofdzakelijk ribosomaal RNA). Alleen het drooggewicht van de kultuur neemt tijdens de N-uitputting sterk toe, waarschijnlijk als gevolg van polysaccharide-synthese. Verder neemt de polypeptide-fractie toe ten koste van de fractie der vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden. Deze laatste fractie (bepaald als N) neemt tot ongeveer 60% af. Ook de hoeveelheid vrij arginine neemt sterk af. Kennelijk zijn de gederepresseerde enzymen erg werkzaam. Het vermogen tot derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting stelt de gist in staat, vrij arginine als N-reservestof te gebruiken. Of dit werkelijk van fysiologisch belang is, is niet bekend.

De derepressie tijdens N-uitputting is karakteristiek voor de enzymen van de arginine-afbraakweg. Andere enzymen, betrokken bij de afbraak van eiwit en aminozuren in gist, worden tijdens N-uitputting niet gederepresseerd (Tabel 4.4). Onderzocht zijn: een proteïnase, NAD-specifieke glutaminezuur-dehydrogenase, threonine-dehydratase, asparaginase en glutaminase. Kennelijk worden de enzymen van de arginine-afbraakweg op een andere manier gereguleerd dan andere enzymen met functies in de afbraak van aminozuren. Of dit samenhangt met een eventuele functie van arginine als N-reservestof, is niet onderzocht.

De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting is afhankelijk van de energievoorziening van de cel. Dit blijkt uit de remming van de derepressie door inhibitors van de aërobe en anaërobe koolhydraatafbraak (Tabel 4.1). Als gist wordt gekweekt met glukose als C- en energie-bron, blijkt het endogene reserve-materiaal voldoende te zijn voor een kleine maar duidelijke derepressie tijdens N-uitputting (Tabel 4.8 en Tabel 4.9). Bij gist gekweekt in melkzuur-medium is dit niet het geval. Een glukose-koncentratie van 50 mg per 50 ml in het medium waarin de N-uitputting wordt uitgevoerd is voldoende voor optimale derepressie van arginase en OTA in 1 g gist, gekweekt in melkzuur-(NH₄)₂-SO₄-medium (Tabel 4.2).

De derepressie van enzymen onder omstandigheden van N-uitputting is tot nu toe uitsluitend beschreven voor urease, in *Pseudomonas aeruginosa* (DE TURCK, 1955) en in *Hydrogenomonas* (KOENIG, KALTWASSER en SCHLEGEL, 1966).

Urease wordt in beide organismen door NH_4 -zouten gerepresseerd. KOENIG c.s. voeren de derepressie van urease tijdens N-uitputting aan als bewijsmateriaal voor de repressie van urease door NH_4 -zouten.

Het optreden van derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist is een aanwijzing dat deze beide enzymen niet onderworpen zijn aan repressie door glukose-katabolieten, omdat immers verwacht mag worden dat deze zich tijdens N-uitputting in de gist ophopen. In Hoofdstuk 3 werd deze konklusie reeds uit andere proeven getrokken. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt mogelijk veroorzaakt door het wegvallen van de repressie van deze enzymen door N-verbindingen. Het optreden van het verschijnsel is een aanwijzing voor zo'n repressie, maar in zichzelf geen voldoende bewijsmateriaal, zoals KOENIG, KALTWASSER en SCHLEGEL (1966) menen. De derepressie tijdens N-uitputting kan ook worden veroorzaakt door factoren die meer direkt verband houden met de stilstand van de groei, zoals de ophoping van eventueel inducerende katabolieten van de C-bron. Toch wordt ook in dit onderzoek het optreden van derepressie tijdens N-uitputting als bewijs beschouwd voor de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen. Dit geschiedt op grond van de volgende waarnemingen:

1. De derepressie van arginase en OTA treedt uitsluitend op tijdens N-uitputting. Als de gist wordt gebracht onder omstandigheden van sulfaat-, fosfaat- of Mg-deficiëntie blijft derepressie uit. Wel wordt een kleine derepressie waargenomen tijdens vitaminen-uitputting (Tabel 4.9). De derepressie is dus niet zonder meer het gevolg van stilstand van de groei, maar van de N-deficiëntie zelf.
2. De derepressie tijdens N-uitputting wordt niet beïnvloed door de aard van de C- en energie-bron in het kweekmedium (Tabel 4.7) of van die in het medium waarin de N-uitputting wordt uitgevoerd (Tabel 4.8), op voorwaarde dat de laatstgenoemde C-bron onmiddellijk assimileerbaar is. Omdat zeer verschillende C-bronnen de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist gekweekt in galaktose-medium in ongeveer gelijke mate bevorderen, is het onwaarschijnlijk dat deze derepressie zou worden veroorzaakt door zich ophopende, eventueel inducerend werkende katabolieten. Was dit wel het geval dan zouden tussen die C-bronnen, die alle op verschillende wijzen worden afgebroken, grote verschillen in werking moeten worden waargenomen.
3. De derepressie tijdens N-uitputting wordt sterk geremd door N-verbindingen. Deze remming treedt niet alleen op bij toevoeging van de meeste assimileerbare N-verbindingen (Tabel 4.11), maar ook met enkele niet-assimileerbare (Tabel 4.12). Als remmende N-verbindingen worden toegevoegd op een tijdstip dat de derepressie is begonnen maar nog niet voltooid, wordt verdere toeneming der specifieke enzymaktiviteiten binnen 10 minuten geheel verhindert (Figuur 4.3).

Uit deze waarnemingen blijkt dat de derepressie tijdens N-uitputting wordt veroorzaakt door het wegvallen van een repressie door N-verbindingen, als gevolg van de N-deficiëntie. Enkele N-verbindingen zijn, waarschijnlijk alleen na interactie met een hoog-moleculaire apo-repressor, in staat de synthese van

arginase en OTA te verhinderen. Of deze repressie plaats vindt op transkriptie-, dan wel op translatie-niveau, is een open vraag, waarop in Hoofdstuk 6 nader zal worden ingegaan. De repressie is reversibel en kan zowel door arginine als onder omstandigheden van N-deficiëntie worden opgeheven. In het laatste geval komt het boodschapper-RNA- of eiwit-vormende systeem vrij te liggen door loslaten van de N-repressor en dissociatie van de laatste. In de gist aanwezig vrij arginine zou zo nodig als inductor kunnen optreden, bij voorbeeld door binding aan de vrijgekomen apo-repressor.

Tot de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen wordt, behalve op grond van de derepressie van deze enzymen tijdens N-uitputting, ook gekoncludeerd op grond van de vermindering van de specifieke enzymaktiviteiten als gevolg van de toevoeging van goed assimileerbare N-bronnen aan een gist-kultuur in glukose-arginine-medium (Tabel 4.13).

Omdat derepressie van arginase en OTA behalve tijdens N-uitputting ook, zij het in mindere mate, optreedt onder omstandigheden van vitamine-deficiëntie (Tabel 4.9), moet worden aangenomen dat N-verbindingen beide enzymen slechts kunnen represseren in samenwerking met één of meer vitaminen. In Hoofdstuk 5 zal hierop nader worden ingegaan.

De aard van de N-verbindingen die in staat zijn de vorming van arginase en OTA te remmen, is niet precies bekend. De derepressie tijdens N-uitputting wordt door de meeste assimileerbare, maar ook door enkele niet- of zwak assimileerbare, overigens niet-toxische aminozuren geremd (Tabel 4.11, Tabel 4.12 en Figuur 4.3). Omdat deze laatste (β -alanine, DL- β -aminoboterzuur en glycine) door gist vermoedelijk niet worden omgezet, is het waarschijnlijk dat meer dan één N-verbinding, de vermelde niet- of zwak assimileerbare inbegrepen, als co-repressor van het systeem dienst kan doen. De synthese van OTA is gevoeliger voor remming dan die van arginase. Dit geldt ook voor de door arginine geïnduceerde enzym synthese (Tabel 4.13). De inductie van arginase door arginine kan slechts gedeeltelijk worden tegengegaan door enkele zeer goed assimileerbare N-bronnen, zoals $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-asparagine, L-asparaginezuur en DL-alanine. Niet door L-glutaminezuur, hoewel dit beter assimileerbaar is dan alanine. De inductie van OTA door arginine wordt behalve door de goed assimileerbare N-bronnen ook door andere N-verbindingen, waaronder het nauwelijks assimileerbare glycine, tegengegaan (Tabel 4.13). Uit deze gegevens blijkt dat de inducerende werking van arginine veel sterker is dan de represserende van andere N-verbindingen. Waarschijnlijk zijn de laatste van eenvoudige chemische structuur. Dit blijkt uit het feit dat niet- of moeilijk assimileerbare N-verbindingen als glycine, β -alanine en β -aminoboterzuur de synthese van arginase en OTA sterk remmen, terwijl goed assimileerbare N-bronnen van ingewikkelder structuur, zoals threonine, valine, proline en isoleucine dit in veel mindere mate doen (Tabel 4.11 en Tabel 4.12). Verder moet aan zeer goed assimileerbare N-bronnen een represserende werking worden toegekend, hetzij aan de verbindingen zelf, hetzij aan hun stofwisselingsprodukten. Welke N-verbindingen deel mogen nemen aan de repressie van arginase en OTA in gist, deze repressie is zeker geen eindprodukt-repressie, daar het eindprodukt van de

arginine-afbraakweg, glutaminezuur, vergeleken met andere goed assimileerbare N-bronnen slechts weinig represserende werking vertoont (Tabel 4.13).

4.9 SAMENVATTING

1. De specifieke activiteiten van arginase en OTA nemen sterk toe indien gist gekweekt in diverse arginine-vrije media wordt verdergekweekt in dezelfde media waaruit de N-bron is weggelaten. Dit verschijnsel wordt aangeduid met de naam derepressie tijdens N-uitputting. Deze derepressie is afhankelijk van de energie-voorziening van de cel en wordt door cycloheximide, een remstof van de eiwitsynthese, geremd.
2. Arginase en OTA worden tijdens N-uitputting even snel en in dezelfde mate gesynthetiseerd als wanneer dezelfde gist in glukose-medium zonder vitaminen, met arginine als enige N-bron wordt verdergekweekt.
3. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt door 4 van de 10 onderzochte gistsoorten vertoond. Verscheidene haploïde, auxotrofe mutanten van *S. cerevisiae* vertonen het verschijnsel ook.
4. Derepressie tijdens N-uitputting is karakteristiek voor arginase en OTA. De specifieke activiteiten van threonine-dehydratase, asparaginase, glutaminase, NAD-specifieke glutaminezuur-dehydrogenase en een proteïnase nemen tijdens N-uitputting niet toe.
5. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting gaat gepaard met toename van het drooggewicht der gistcultuur, van de hoeveelheid polysaccharide in de cellen en van de polypeptide-fractie. Het aantal cellen, de totale hoeveelheid stikstof, de nucleïnezuur-fractie en de hoeveelheid DNA blijven binnen de fouten van de bepaling konstant. De fractie der vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden neemt even sterk af als de polypeptide-fractie toeneemt (bepaald als N volgens KJELDAHL). Verder neemt de hoeveelheid vrij arginine sterk af.
6. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting treedt op, onverschillig met welke C-bron of N-bron de gist werd gekweekt; de enige voorwaarde is dat het kweekmedium geen arginine bevat.
7. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt door alle C-bronnen in het medium waarin de N-uitputting wordt uitgevoerd, in ongeveer even sterke mate bevorderd, mits deze C-bronnen onmiddellijk assimileerbaar zijn.
8. Geen derepressie van arginase en OTA treedt op indien in een volledig medium voorgekweekte gist wordt verdergekweekt in hetzelfde medium waaruit sulfaat, fosfaat of magnesium is weggelaten. Een kleine, maar significante derepressie treedt op bij verderkweken in medium zonder vitaminen.
9. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt niet veroorzaakt door stilstand van de groei of ophoping van eventueel inducerend werkende katabolieten van de C-bron, maar door het wegvallen van de repressie door N-verbindingen, als gevolg van de N-deficiëntie zelf. De veronderstelde repressie van arginase en OTA door N-verbindingen is in overeenstemming met waarnemingen, beschreven in Hoofdstuk 3.

10. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt door toevoeging van de meeste onderzochte assimileerbare, en van enkele niet-assimileerbare N-verbindingen sterk geremd. Daaruit wordt geconcludeerd dat niet slechts één, maar een groep van N-verbindingen in staat is als co-repressor van de arginase- en OTA-synthese te fungeren. Deze N-verbindingen zijn waarschijnlijk van eenvoudige chemische structuur. Ze worden gemakkelijk gevormd uit, of zijn identiek aan enkele zeer goed assimileerbare N-bronnen.
11. De inductie van arginase en OTA door arginine wordt slechts door zeer goed assimileerbare N-bronnen in beduidende mate tegengegaan. Het enzymvormend systeem heeft kennelijk meer affiniteit tot de induktor arginine, dan tot de represserende N-verbindingen.
12. De waarnemingen, die in dit hoofdstuk zijn beschreven, sluiten de mogelijkheid uit dat arginase en OTA in gist onderworpen zijn aan repressie door katabolieten van de C-bron. Verder is repressie door het eindproduct van de arginine-afbraakweg, glutaminezuur, onwaarschijnlijk omdat dit aminozuur, ondanks zijn goede assimileerbaarheid, de inductie door arginine slechts in geringe mate tegengaat.
13. Op grond van de beschikbare gegevens wordt gesteld dat arginase en OTA in gist worden geïnduceerd door L-arginine (of door L-ornithine) en gerepresseerd door een groep N-verbindingen. Deze repressie is afhankelijk van de aanwezigheid van één of meer vitaminen.

HOOFDSTUK 5

INVLOED VAN MYO-INOSITOL OP DE VORMING VAN ARGINASE EN OTA

5.1 INVLOED VAN VITAMINEN OP DE REPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA DOOR STIKSTOF-VERBINDINGEN

In Hoofdstuk 4 werd een model voor de regulatie van de synthese van arginase en OTA in gist voorgesteld. Volgens dat model bestaat deze regulatie uit een inductie van beide enzymen door arginine, en uit een repressie door diverse N-verbindingen. Het optreden van deze repressie werd gekonkludeerd uit de vermindering van de specifieke enzymaktiviteiten ten gevolge van toevoeging van zeer goed assimilerbare N-bronnen aan gistkultures groeiend met arginine als belangrijkste N-bron, en uit de derepressie van beide enzymen die optreedt als gist, gekweekt in diverse arginine-vrije media, wordt verdergekeeft in media waaruit de N-bron is weggelaten. Omdat een dergelijke derepressie behalve tijdens N-uitputting ook, zij het in mindere mate, optreedt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium zonder vitaminen, werd in Hoofdstuk 4 gekonkludeerd dat N-verbindingen hun represserende werking slechts in aanwezigheid van één of meer vitaminen kunnen uitoefenen.

De specifieke aktiviteiten van arginase en OTA nemen tijdens N-uitputting veel sneller en veel meer toe dan tijdens vitamine-uitputting. Dit blijkt uit Figuur 5.1 waarin het verloop van de specifieke aktiviteiten met de tijd is weergegeven. Aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium voorgekweekte gist werd in staande kultuur verdergekeeft in media waaruit óf de N-bron, óf alle vitaminen werden weggelaten. De derepressie tijdens N-uitputting begint na ongeveer 15 minuten en is binnen 2 uur voltooid. De derepressie in het medium zonder vitaminen vindt hoofdzakelijk plaats 2 tot 4 uur na het begin van de proef.

Welk vitamine de repressie door N-verbindingen bevordert, kan worden onderzocht door gist te suspenderen en verder te kweken in media, waaruit één of meer vitaminen werden weggelaten. In Tabel 5.1 zijn de resultaten van een dergelijke proef vermeld. Duidelijk is te zien dat weglating uit het kweekmedium van één der vier voor de groei essentiële vitaminen (biotine, pantothenaat, thiamine en myo-inositol) derepressie van arginase en OTA tot gevolg heeft. De gevolgen van inositol-deficiëntie zijn echter verreweg het meest ingrijpend. Het weglaten van myo-inositol alleen veroorzaakt een even grote derepressie als het weglaten van alle vitaminen tezamen, terwijl toevoeging van myo-inositol aan een overigens vitamine-vrij glukose-(NH₄)₂SO₄-medium de derepressie die in aanwezigheid van de N-bron kan optreden nagenoeg volledig remt. De waarnemingen van de proef van Tabel 5.1 wijzen erop dat myo-inositol het vitamine is dat de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen bevordert.

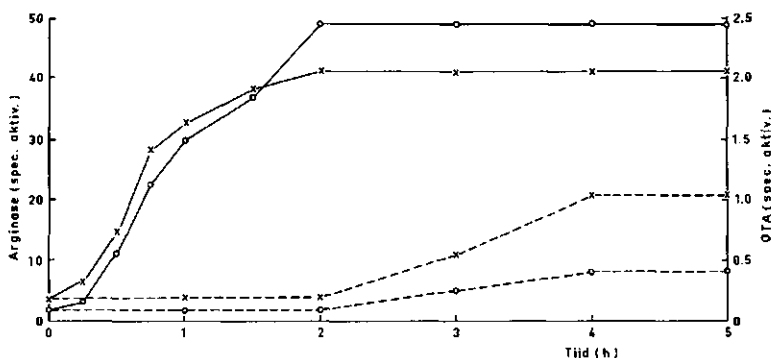


FIG. 5.1. Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting en tijdens vitamine-uitputting. Gist werd aëroob in glukose-(NH₄)SO₄-medium gekweekt (10 mg myo-inositol/l). Uitputting van de gist: in staande cultuur, 20 g gist/l 10% glukose-medium waaruit óf de N-bron, óf alle vitaminen werden weggelaten. De specifieke aktiviteiten van arginase en OTA werden in monsters van 50 ml (1 g gist) bepaald. —, specifieke aktiviteiten tijdens N-uitputting, - - -, idem tijdens vitamine-uitputting, x, arginase, o, OTA.

TABEL 5.1. Invloed van (NH₄)₂SO₄ en vitaminen op de derepressie van arginase en OTA.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium (10 mg myo-inositol/l) en vervolgens 5 uur geïnkubeerd (1 g gist/50 ml) met 10% glukose-(NH₄)₂SO₄-medium (20 mg myo-inositol/l) waaruit één of meer bestanddelen werden weggelaten.

	Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
Kontrole	3,0	0,03
Weggelaten bestanddelen:		
Geen	3,1	0,03
NH ₄ ⁺	51,0	1,75
NH ₄ ⁺ en alle vitaminen	48,3	1,65
Alle vitaminen	13,0	0,36
Myo-inositol	14,8	0,40
Biotine	5,0	0,05
Pantothenaat	4,8	0,06
Thiamine	5,5	0,04
Alle vitaminen behalve myo-inositol	5,8	0,05

5.2 INVLOED VAN MYO-INOSITOL OP DE DEREPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA

Myo-inositol is één der vier vitaminen die voor de groei van stam B essentieel zijn. Stam B vormt wat dit betreft een uitzondering, omdat de meeste stammen van *S. cerevisiae* en *S. carlsbergensis* wel in staat zijn kleine hoeveelheden myo-inositol te synthetiseren. De inositol-behoefte van stam B werd bepaald in glukose-medium, in staande cultuur met (NH₄)₂SO₄, L-glutaminezuur of L-arginine als N-bron (Tabel 5.2). In (NH₄)₂SO₄-medium en in arginine-medium blijkt de inositol-behoefte wat groter te zijn dan in glutaminezuur-medium; dit komt vooral bij lage inositol-koncentraties tot uiting. De optimale

groei van stam B in deze media wordt vrijwel bereikt bij inositol-koncentraties van resp. 8, 10 en 5 mg/l. Myo-inositol heeft in hogere concentraties echter een zwakke groei-bevorderende werking zodat van een duidelijk begrensde optimale concentratie niet kan worden gesproken.

TABEL 5.2. Inositol-behoefte van stam B in glukose-media met verschillende N-bronnen.

Hoeveelheden van 10 ml 10% glukose-medium (20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 40 mM L-glutaminezuur of 10 mM L-arginine-HCl, wisselende concentratie myo-inositol) werden geënt met 1 druppel van een 24-uurs kultuur van stam B in 10% glukose-20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium (10 mg myo-inositol/l). Na 48 uur schudden bij 30° in erlenmeyers van 100 ml werd de groei bepaald als het drooggewicht van de gevormde gist (g/l).

N-bron			
Myo-inositol (mg/l)	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	L-Arginine	L-Glutaminezuur
0	0,10	0,23	0,54
1,0	0,73	1,06	1,63
2,0	1,12	1,13	2,07
5,0	2,50	1,79	3,53
8,0	3,53	2,63	4,09
10,0	3,73	3,33	4,33
20,0	4,32	4,26	4,65

Remming van de derepressie in aanwezigheid van de N-bron door vitaminen in het algemeen en door myo-inositol in het bijzonder werd tot nu toe uitsluitend aangetoond in media met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ als enige N-bron. Myo-inositol kan in principe op drie manieren werken: 1. stimulerend bij eventuele processen die leiden tot vorming van co-repressors uit NH_4 -zouten; 2. bij de regulatie van boodschapper-RNA- of eiwitsynthese, als bestanddeel van de apo-repressor, als faktor bij de vorming van de laatste, of als faktor nodig voor de binding van co-repressors aan de apo-repressor; 3. als zelfstandige co-repressor bij de synthese van arginase en OTA. De invloed van inositol-deficiëntie op de specifieke enzymaktiviteiten in gistkultures die met andere N-bronnen groeien, zou informatie kunnen geven over de wijze waarop myo-inositol de repressie door N-verbindingen bevordert. Om dit te onderzoeken werd een proef genomen met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-glutaminezuur, L-asparagine of DL-alanine als N-bron (Tabel 5.3). In de kweekmedia werd de inositol-koncentratie iets lager gekozen dan gewoonlijk (7,5 in plaats van 10,0 mg/l), omdat gebleken was dat hierdoor de derepressie tijdens inositol-uitputting wordt bevordert. De gist werd verdergekweekt in media (dezelfde als waarin de gist werd gekweekt) waaruit resp. de N-bron, alle vitaminen, alleen myo-inositol, of sulfaat werd weggelaten. Na afloop van deze uitputtingsperiode is de gistmassa op zijn hoogst verdubbeld; de cellen moeten dan dus inderdaad zeer arm aan de betreffende componenten zijn. Duidelijk is te zien dat in alle gevallen inositol-deficiëntie en vitamine-deficiëntie een gelijk effect hebben op de derepressie van arginase. Opvallend is dat met L-asparagine en DL-alanine als N-bron het effect van inositol-defi-

TABEL 5.3. Invloed van NH_4^+ , vitaminen, myo-inositol en sulfaat op de specifieke activiteiten van arginase en OTA in gist die met verschillende N-bronnen werd gekweekt.

Gist werd in staande cultuur gekweekt in glukose-medium (verschillende N-bronnen, 7,5 mg myo-inositol/l). N-uitputting: in staande cultuur, 2 uur bij 30° , 1 g gist per 50 ml N-vrij glukose-medium. Inositol-, vitamine- en sulfaat-uitputting: in staande cultuur, 5 uur bij 30° met resp. 1,0, 1,0 en 0,5 g gist per 100 ml glukose-medium waaruit resp. myo-inositol, alle vitaminen en sulfaat werden weggelaten; N-bron: dezelfde als waarmee de gist werd gekweekt. De gegevens zijn de gemiddelden van 3 waarnemingen.

N-bron in kweekmedium:	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	L-Glutaminezuur	L-Asparagine	DL-Alanine
<i>Uitputtingsmedium</i>				
Arginase				
Kontrole	5,3	6,0	2,9	7,3
N-deficiënt	60,1	41,8	65,1	50,9
Vitamine-deficiënt	27,5	28,4	10,8	9,4
Inositol-deficiënt	30,1	25,0	11,8	11,2
Sulfaat-deficiënt	7,4	7,8	4,2	7,6
OTA				
Kontrole	0,27	0,17	0,20	0,11
N-deficiënt	1,51	1,30	1,36	0,44
Vitamine-deficiënt	0,58	0,25	0,14	0,13
Inositol-deficiënt	0,70	0,28	0,18	0,12
Sulfaat-deficiënt	0,16	0,15	0,04	0,05

ciëntie op de derepressie van arginase veel geringer is dan met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of L-glutaminezuur. Bij OTA vindt in dat geval in het geheel geen derepressie plaats. De derepressie in sulfaat-deficiënte gist is in alle gevallen onbetekenend; de gelijktijdige aanwezigheid van de N-bron en van vitaminen blijkt de derepressie dus te verhinderen, ook als de groei van de gistcultuur door sulfaat-deficiëntie tot stilstand komt. Uit de hier besproken proeven blijkt dat de invloed van vitaminen op de vorming van arginase en OTA niet beperkt is tot gist die in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium groeit.

Als gist aëroob wordt gekweekt in glukose-media met diverse N-bronnen, met een groei-beperkende hoeveelheid myo-inositol (2,5 mg/l), vindt een toename plaats van de specifieke enzymactiviteiten vanaf ongeveer het tijdstip dat de exponentiële groei in een lineaire overgaat (Figuur 5.2). Dit werd niet alleen waargenomen in een gistcultuur waarin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de N-bron is, maar ook indien L-glutaminezuur, L-asparagine of DL-alanine als enige N-bron fungeren. Bij vergelijkbare proeven waarin pantothenaat (50 $\mu\text{g/l}$) of biotine (0,5 $\mu\text{g/l}$) de beperkende groeifactor is van een gistcultuur in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium treedt ook een derepressie van beide enzymen op. Deze is veel minder dan tijdens inositol-deficiëntie wordt waargenomen, en treedt bovendien pas op geruime tijd na het beëindigen van de exponentiële groei (Figuur 5.2). Alleen N-deficiëntie en inositol-deficiëntie hebben derepressie van arginase en OTA tot onmiddellijk gevolg. Daarom moeten N-verbindingen en myo-

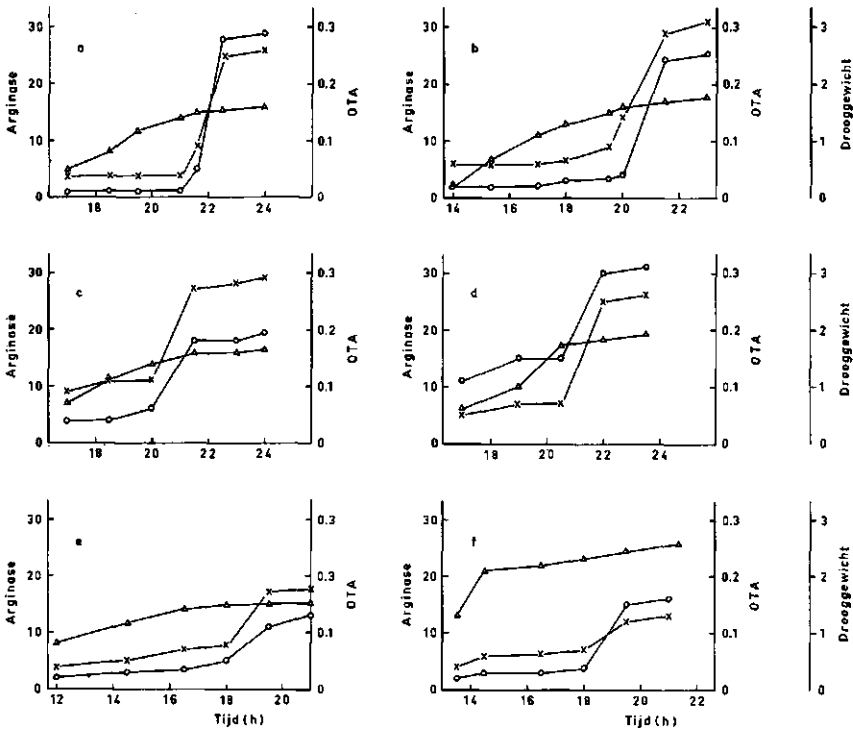


FIG. 5-2. Specifieke activiteiten van arginase en OTA in gistkultures waarin de groei door suboptimale vitamineconcentraties wordt beperkt. Gist werd aëroob gekweekt in glukose-medium met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-glutaminezuur, L-asparagine of DL-alanine als N-bron. De kultures werden geënt met 2 entogen stam B per l. Het verloop met de tijd van de specifieke enzymactiviteiten en van het drooggewicht (g/l) werd bepaald. a. 2,5 mg myo-inositol/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; b. idem, L-glutaminezuur; c. idem, L-asparagine; d. idem, DL-alanine; e. 0,5 μg biotine/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; f. 50 μg Ca-pantothenaat/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. x—x arginase, o—o OTA, Δ — Δ drooggewicht (g/l).

inositol worden beschouwd als de belangrijkste factoren bij de repressie van arginase en OTA.

De inositol-koncentratie in het kweekmedium is bepalend voor de mate van derepressie die tijdens inositol-uitputting van de daarin gekweekte gist optreedt. In de proeven van Tabel 5.4 werd stam B aëroob gekweekt in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium en in glukose-glutaminezuur-medium, zowel met een groei-beperkende inositol-koncentratie (2,5 mg/l), als met een overmaat myo-inositol (20 mg/l). De kweektijden waren onafhankelijk van de inositol-koncentratie; ze werden zodanig gekozen (zie Tabel 2.2) dat de inositol-rijke cultuur was dan reeds in de stationaire groeifase. Inositol-rijke gist heeft lage specifieke enzymactiviteiten, die wel na inkubatie in N-vrij, maar niet na verderkweken in inositol-vrij medium toenemen. In het laatste medium neemt de celmassa tijdens de inkuba-

tie met een faktor 3 toe. Blijkbaar beschikt gist na kweken in inositol-rijk medium over een reserve-voorraad van dit vitamine, die één of twee celdelingen in inositol-vrij medium mogelijk maakt, en derepressie van arginase en OTA in aanwezigheid van de N-bron verhindert (bij $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), resp. vermindert (bij glutaminezuur).

Gist die in inositol-arm medium werd gekweekt, gedraagt zich geheel anders (Tabel 5.4). De specifieke activiteiten van arginase en OTA zijn veel hoger dan in inositol-rijke gist. Bij verderkweken in inositol-vrij medium neemt de celmassa niet toe; de gist beschikt kennelijk niet over een inositol-reserve. De mate van derepressie tijdens verderkweken in N-vrij en in inositol-vrij medium varieert met de N-bron; bovendien gedragen arginase en OTA zich verschillend. In geval dat derepressie van één van beide enzymen optreedt, valt op dat deze in inositol-vrij medium vrijwel even groot is als in N-vrij medium. De resultaten van deze proef bevestigen dat de N-bron alleen niet in staat is de derepressie van beide enzymen te verhinderen, evenmin als alleen myo-inositol dat doet. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met de gepostuleerde rol van myo-inositol bij de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen.

TABEL 5.4. Invloed van de inositol-koncentratie in het kweekmedium op de derepressie van arginase en OTA.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-media (20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of 40 mM L-glutaminezuur, 2,5 of 20,0 mg myo-inositol/l). N-uitputting en inositol-uitputting: zie Tabel 5.2. De gegevens zijn de gemiddelden van 3 waarnemingen.

N-bron	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		L-Glutaminezuur	
	2,5	20,0	2,5	20,0
<i>Uitputtingsmedium</i>				
Arginase (spec. activ.)				
Kontrolle	12,1	2,3	26,6	12,4
N-deficiënt	17,1	62,8	57,9	58,4
Inositol-deficiënt	18,4	3,1	51,2	25,1
OTA (spec. activ.)				
Kontrolle	0,38	0,11	0,22	0,06
N-deficiënt	0,85	1,14	0,44	0,78
Inositol-deficiënt	0,72	0,17	0,36	0,23

5.3 DISKUSSIE

De in dit hoofdstuk vermelde proeven zullen ook als tijdschriftartikel worden gepubliceerd (MIDDELHOVEN, 1969c).

De reeds in Hoofdstuk 4 vermelde derepressie van arginase en OTA die in aanwezigheid van een N-bron optreedt in een gistkultuur die wordt verdergekweekt in een medium zonder vitaminen, blijkt door inositol-deficiëntie te worden veroorzaakt. Toevoeging van uitsluitend myo-inositol aan een gistkultuur in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium waaruit alle overige vitaminen werden weggelaten, is voldoende om deze derepressie geheel te verhinderen. Het weg-

laten van alleen myo-inositol uit glukose-(NH₄)₂SO₄-medium heeft voor de daarin groeiende gistkultuur een vrijwel even grote derepressie tot gevolg, als optreedt indien alle vitamines worden weggelaten (Tabel 5.1). Klaarblijkelijk is (NH₄)₂SO₄ alleen dan in staat arginase en OTA te represseren, en derepressie te verhinderen, indien myo-inositol aanwezig is. Myo-inositol heeft dit effect niet slechts indien (NH₄)₂SO₄ de N-bron van de gistkultuur is; ook in gistkultures met glutaminezuur, asparagine of alanine als enige N-bron treedt derepressie op onder omstandigheden van inositol-deficiëntie, onverschillig of die deficiëntie teweeggebracht wordt door inkubatie van de gist in inositol-vrij kweekmedium (Tabel 5.3), of dat het myo-inositol tijdens de groei in een inositol-arm kweek-medium opdraakt (Figuur 5.2). In het laatste geval treedt derepressie op, gelijktijdig met de overgang van de exponentiële groei in de lineaire. Indien de groei van een gistkultuur in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium door een suboptimale pantothenaat- of biotine-koncentratie wordt beperkt, vindt een zeer geringe derepressie plaats geruime tijd na beëindiging van de exponentiële groei (Figuur 5.2).

Myo-inositol is een essentiële groeifactor voor stam B. In tegenstelling tot de meeste stammen van *S. cerevisiae* en *S. carlsbergensis* groeit stam B in afwezigheid van myo-inositol niet (Tabel 5.2). Andere stammen vormen in het algemeen kleine hoeveelheden myo-inositol; de groeisnelheid van deze stammen wordt door myo-inositol echter sterk bevorderd. De in dit onderzoek aangetoonde functie van myo-inositol in de regulatie der enzym synthese is slecht in overeenstemming te brengen met de fysiologische werking van dit vitamine in gist en schimmels, zoals die tot nu toe uit de literatuur bekend is.

Sinds EASTCOTT (1928) de aanwezigheid van myo-inositol in het bios-complex vaststelde, zijn veel studies aan de functie van dit vitamine gewijd. In *Schizosaccharomyces pombe*, een gist die in afwezigheid van myo-inositol niet kan groeien, is met ¹⁴C gemerkt myo-inositol in enkele celfrakties aantoonbaar (YARBROUGH en CLARK, 1957). De grootste hoeveelheid (80%) is gebonden aan lipiden, 16 tot 20% is zeer vast gebonden aan in 4% NaOH onoplosbaar celmateriaal en een spoor aan de nucleoproteïne-fractie. Myo-inositol wordt door deze gist niet afgebroken. Evenmin wordt het tot fytine omgezet, dit in tegenstelling tot hogere planten, waarin deze fosfaat ester van myo-inositol een belangrijke rol speelt. In de gist *Kloeckera brevis*, waarvoor myo-inositol eveneens een essentiële groeifactor is, wordt deze verbinding gedeeltelijk omgezet tot galaktinol (myo-inositol-1- α -D-galaktopyranoside) (DWORSKY en HOFFMANN-OSTENHOFF, 1967). Deze verbinding, die niet door deze gist kan worden afgebroken, is door dezelfde auteurs ook in *S. cerevisiae* aangetoond.

Inositol-deficiëntie heeft bij *S. carlsbergensis* tot gevolg dat gisting en ademhaling worden geremd (RIDGEWAY en DOUGLAS, 1958; GHOSH en BHATTACHARYA, 1967). Volgens de laatstgenoemde auteurs treden deze deficiëntie-verschijnselen alleen op tijdens de exponentiële groei in inositol-vrij medium. *S. carlsbergensis* vormt kleine hoeveelheden myo-inositol. Inositol-deficiënte gist die tijdens de stationaire fase wordt geoogst, vertoont een normale gisting en ademhaling; de enige deficiëntie-verschijnselen zijn dan de vlokkige groei en de hoge

glukan/mannan-verhouding (cf. GHOSH, CHARALAMPOUS, SISON en BOHR, 1960). Een ander effect van inositol-deficiëntie op *S. carlsbergensis* is een verandering in de lipide-samenstelling: inositol-deficiënte gist bevat meer triglyceriden, minder fosfolipiden en minder inositol-fosfolipiden dan normale gist (SHAFAI en LEWIN, 1968). Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met die van LESTER en STEINER (1968), die aanwijzingen verkregen voor de aanwezigheid van difosfoinositiden en trifosfoinositiden in *S. cerevisiae*.

Inositol-fosfolipiden zijn belangrijke bestanddelen van celmembranen. MATILE (1966) toonde aan dat inositol-gebrek voor een inositol-behoefte *Neurospora*-mutant de dood tot gevolg heeft. Dit organisme bevat proteasen die normaliter binnen inositol-fosfolipide-bevattende membranen zijn opgesloten. Onder omstandigheden van inositol-deficiëntie worden lekkende membranen gemaakt, zodat de schimmel aan autolyse te gronde gaat.

In kulturen van dierlijke KB-cellen heeft inositol-deficiëntie tot gevolg dat de nucleotide-synthese vanuit glycine en serine, en het actieve aminozuur-transport worden verstoord (LEMBACH en CHARALAMPOUS, 1967a en b).

De derepressie van arginase en OTA die in gist onder omstandigheden van inositol-deficiëntie optreedt is moeilijk te verklaren uit de literatuurgegevens over de functie van dit vitamine. Dat verstoring van de gisting en de ademhaling een rol zou spelen bij het optreden van deze derepressie is erg onwaarschijnlijk, omdat eerder is gebleken dat de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting door remstoffen van gisting en ademhaling wordt verhinderd (Tabel 4.1). Evenmin is het waarschijnlijk dat een verandering van de glukan/mannan-verhouding in de gist van invloed zou zijn op de derepressie van arginase en OTA. Er is trouwens van dit deficiëntie-verschijnsel niets gebleken: de vlokkige groei die aan een hoge glukan/mannan-verhouding gepaard gaat, is niet waargenomen. Van een functie van inositol-fosfolipiden en van de membranen waarvan deze deel uitmaken, bij de regulatie van de enzymsynthese is nooit iets gebleken, zeker niet waar het oplosbare enzymen betreft. Dat de arginase en OTA van gist oplosbare enzymen zijn (niet gebonden aan partikels) blijkt uit het feit dat na centrifugering van celextrakten bij 20.000 g gedurende 30 minuten beide enzymactiviteiten slechts in de bovenstaande vloeistof aantoonbaar zijn (ongepubliceerde waarnemingen).

De waarnemingen die in dit hoofdstuk zijn beschreven, kunnen het best worden verklaard door aan te nemen dat myo-inositol of zijn stofwisselingsproducten een rol spelen bij de regulatie van de vorming van arginase en OTA, hetzij als bestanddeel van de apo-repressor, als faktor bij de vorming van de laatste, als faktor nodig voor het totstandkomen van de binding tussen apo-repressor en represserende N-verbindingen of als zelfstandige co-repressor. Deze veronderstelde functie van myo-inositol in de regulatie van de enzymsynthese vindt enige steun in de waarnemingen van YARBROUGH en CLARK (1957), die in *Schizosaccharomyces pombe* sporen myo-inositol aantoonden in de nucleoproteïnefractie.

5.4 SAMENVATTING

1. De derepressie van arginase en OTA in aanwezigheid van $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in vitamine-vrij medium wordt door inositol-deficiëntie veroorzaakt. Myo-inositol is het enige vitamine dat deze derepressie verhindert.
2. Ook in aanwezigheid van glutaminezuur, asparagine of alanine heeft inositol-deficiëntie derepressie van arginase, en soms ook van OTA, tot gevolg.
3. Uit deze waarnemingen wordt geconcludeerd dat de aanwezigheid van myo-inositol noodzakelijk is voor de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen.

HOOFDSTUK 6

HET MECHANISME VAN DE REPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA DOOR STIKSTOF-VERBINDINGEN

6.1 INLEIDING

In Hoofdstuk 1 werd uitvoerig ingegaan op de wijzen waarop laag-moleculaire verbindingen specifiek invloed kunnen uitoefenen op de vorming van enzymen. Deze processen kunnen gedacht worden geheel plaats te vinden op transkriptie-niveau. Dat wil zeggen, dat de vorming van met het gerepresseerde of geïnduceerde enzym overeenkomend boodschapper-RNA wordt beïnvloed door tussenkomst van de apo-repressor, het hoog-moleculaire produkt van een voor de betreffende structurele genen specifiek regulator-gen. Dit type regulatie van de enzymvorming wordt in het operon-model (JACOB en MONOD, 1961) beschreven. Volgens andere modellen kan de regulatie ook tot stand komen op translatie-niveau. In dat geval beïnvloeden laag-moleculaire effectors al of niet na interactie met een apo-repressor, specifiek de groei van een polypeptide-keten op het polysoom, het loslaten daarvan, of het totstandkomen van de voor de enzymactiviteit noodzakelijke tertiaire structuur (ENGLANDER en PAGE, 1965; GRUBER en CAMPAGNE, 1965). Volgens de modulatie-theorie van AMES en HARTMAN (1963), nader uitgewerkt door STENT (1964), zijn transkriptie en translatie obligaat aan elkaar gekoppeld, en wordt door regulatie van de translatie-snelheid tegelijk de snelheid van de transkriptie bepaald.

Het mechanisme van de enzym synthese in gist werd door SYLVEN c.s. (1959) en door TAURO, HALVORSON en EPPSTEIN (1968) bestudeerd in synchrone gistkultures. Het bleek dat de vorming van een bepaald enzym niet gedurende de gehele groeicyclus plaatsvindt, maar slechts tijdens een korte periode. Klaarblijkelijk is het gehele genoom niet doorlopend voor transkriptie beschikbaar, maar geschiedt de transkriptie van de in één chromosoom gelegen structurele genen in een vaste volgorde. Als deze waarnemingen aan synchrone gistkultures ook van toepassing zijn op omstandigheden van N-uitputting, zou dit betekenen dat de dan optredende synthese van arginase en OTA niet in alle gistcellen plaatsvindt, maar slechts in een klein deel van het totale aantal. En wel in die cellen waarin de transkriptie van het structurele gen van één der beide enzymen juist voltooid is, of juist staat te gebeuren, op het tijdstip dat de N-uitputting begint. Dit alles, vooropgezet dat de derepressie tijdens N-uitputting van gelijktijdige boodschapper-RNA-synthese afhankelijk is.

De vraag op welke van de hierboven genoemde wijzen laag-moleculaire verbindingen ingrijpen in de synthese van bepaalde enzymen, kan slechts worden beantwoord indien men de beschikking heeft over mutanten waarin de regulatie is verstoord, of indien men in staat is de enzym synthese in vitro te bestuderen. Omdat gistmutanten met een ontregelde enzymvorming niet beschikbaar

waren, en omdat van de enzym synthese in vitro grote moeilijkheden zijn te verwachten, temeer omdat het in dit onderzoek om enzymen gaat die een cofactor bevatten (bij arginase Fe^{2+} -ionen en bij OTA pyridoxal-5-fosfaat) werd ervan afgezien het probleem van het mechanisme van de regulatie der enzymvorming op één van deze beide wijzen tot een oplossing te brengen.

Van proeven met intacte gistcellen kan niet worden verwacht dat ze de oplossing van dit probleem zullen geven, maar wel dat ze er enig licht op zullen werpen. Een nadere bestudering van de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting lijkt in dit opzicht nuttig, in het bijzonder de beantwoording van de vraag of deze derepressie noodzakelijk samengaat met de vorming van voor arginase en OTA specifiek boodschapper-RNA. Anders gesteld: of de derepressie tijdens N-uitputting geschiedt dank zij reeds in de gist aanwezig boodschapper-RNA, of dat dit RNA pas tijdens de N-uitputting wordt gemaakt.

Het antwoord op deze vraag wordt in het algemeen gezocht in proeven met actinomycine D. Dit antibioticum remt specifiek de DNA-afhankelijke RNA-synthese. Omdat actinomycine D door intacte gistcellen, en ook door gistprotoplasten, slechts langzaam wordt opgenomen, is het voor dit onderzoek niet geschikt.

Enkele aanwijzingen over de wijze waarop N-verbindingen arginase en OTA represseren, werden reeds verkregen in de proef waarin N-verbindingen werden toegevoegd aan een gistcultuur, 30 minuten na het begin van N-uitputting (Figuur 4.3). Deze N-verbindingen blijken dan de op dat tijdstip reeds op gang zijnde derepressie van arginase en OTA binnen 10 minuten volledig te remmen. Deze snelle repressie is slechts dan te verklaren indien de repressie plaatsvindt, óf op transkriptie-niveau, maar dan alleen indien het met arginase en OTA overeenkomende boodschapper-RNA tijdens de enzym synthese zeer snel wordt afgebroken, óf op translatie-niveau.

Op de vraag of de derepressie tijdens N-uitputting al of niet noodzakelijk samengaat met boodschapper-RNA-synthese, werd een antwoord gezocht met behulp van proeven met uracil- en adenine-analogen, van proeven met gist die vóór de N-uitputting langdurig werd uitgeput of bewaard, en van proeven waarin het effect van N-uitputting op gist gekweekt in arginine-houdende media wordt nagegaan.

6.2 INVLOED VAN URACIL- EN ADENINE-ANALOGEN OP DE DEREPRESSIE TIJDENS STIKSTOF-UITPUTTING

Strukturele analogen van in de natuur voorkomende purine- en pyrimidine-basen zijn veelal in staat de nucleïnezuur-stofwisseling te verstoren. Deze basen kunnen vaak tot de overeenkomstige nucleosiden en nucleotiden worden omgezet. Als zodanig remmen ze dan de vorming van natuurlijke nucleotiden en nucleïnezuren. Ook worden ze wel in nucleïnezuren ingebouwd; mis-codering is hiervan vaak het gevolg. Voor remming van de RNA-synthese zijn uracil-analogen het meest geschikt, omdat uracil slechts in RNA en niet in DNA aanwezig is.

De groei van gisten wordt door de uracil-analogen 5-fluoruracil en 6-azaüracil en door het adenine-analoog 6-methylpurine geremd. De giftigheid van 5-fluoruracil voor *Candida utilis* wordt veroorzaakt door remming van de synthese van ribosomaal RNA en door verschuivingen in de samenstelling van de aminozuur-voorraad (KEMPNER en MILLER, 1963). Muize-lymfocellen zetten 6-azaüracil om tot 6-azaüridylzuur, dat een remstof is van orotidylaat-decarboxylase en als zodanig van de synthese van pyrimidine-basen; het wordt niet in RNA ingebouwd (HANDSCHUMACHER en PASTERNAK, 1958). Door 6-methylpurine wordt in *Candida utilis* de vorming van guanosine-monofosfaat uit adenosine-monofosfaat geremd; bovendien remt het de RNA-synthese (MILLER en KEMPNER, 1963).

De drie genoemde purine-en pyrimidine-analogen zijn voor stam B giftig. Deze toxiciteit komt tot uitdrukking in remming van de groei, vooral indien wordt waargenomen hoeveel tijd nodig is voor het zichtbaar troebel worden van een licht-geënte gistcultuur. De concentraties van de drie anti-metabolieten die nodig zijn voor het verhinderen van het binnen 4 dagen optreden van zichtbare troebeling in een gistcultuur worden in Tabel 6.1 weergegeven. Indien wordt geënt met veel gist (100 mg nat) en daarna in aanwezigheid van de anti-metabolieten 6 uur wordt geïnkubeerd onder de omstandigheden beschreven in Tabel 6.1, blijken deze verbindingen, althans in concentraties tot 1 mg/ml, niet in staat de eerste deling van de gist te verhinderen. Dit werd waargenomen door bepaling van het drooggewicht. Dit resultaat behoeft niet in tegenstelling te zijn met de uitkomsten van de proef vermeld in Tabel 6.1, omdat in die proef een beperkt aantal celdelingen niet kon worden waargenomen. Het uitblijven van een snelle groei-remmende werking van de drie anti-metabolieten in de proef met veel gist zou erop kunnen wijzen dat deze verbindingen langzaam door de gist worden opgenomen of hun werking pas na enkele uren uitoefenen. Het hoeft dan ook geen verbazing te wekken dat het effect op de derepressie tijdens N-uitputting zeer gering is (Tabel 6.2). Merkwaardig genoeg heeft 6-methylpurine, het minst giftige van de drie, de grootste remmende werking. Omdat van een adenine-analoog mag worden verwacht dat het allerlei processen beïnvloedt waarbij adenosine-fosfaatesters zijn betrokken, mag aan deze waarneming niet teveel gewicht worden toegekend. De beide uracil-analogen hebben, ook in concentraties die ver uitgaan boven die welke noodzakelijk zijn

TABEL 6.1. De gevoeligheid van stam B voor uracil- en adenine-analogen.

10 ml 4% glukose-(NH₄)₂SO₄-medium in een erlenmeyer van 100 ml werd geënt met één druppel van een 24-uur oude voorkultuur in hetzelfde medium, en bij 30° geschud. De gevoeligheid van stam B voor enkele anti-metabolieten wordt uitgedrukt als de concentratie die nodig is voor het verhinderen van het binnen 4 dagen optreden van zichtbare troebeling.

Anti-metabooliet	Koncentratie (mg/l)
6-methylpurine	1000
5-fluoruracil	<5
6-azaüracil	1

TABEL 6.2. Remming van de derepressie tijdens N-uitputting door uracil- en adenine-analogen.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur in glukose-medium (1 g gist per 50 ml, 2 uur bij 30°), al of niet in aanwezigheid van de vermelde anti-metabolieten.

		Arginase spec. aktiv.	OTA spec. aktiv.
Kontrole		3,8-4,5	0,08-0,20
Toegevoegde stof	mg/l		
6-Methylpurine	0	68,5	1,65
	20	60,6	1,08
	100	75,0	1,05
	500	49,3	0,91
	1000	45,7	0,56
5-Fluoruracil	0	55,5	2,46
	20	52,0	2,40
	100	51,3	2,30
6-Azaüracil	0	84,3	1,27
	10	76,1	1,20
	100	68,9	1,09
	1000	65,4	1,20

voor groeiremming op langere termijn (Tabel 6.1), nauwelijks invloed op de derepressie. Deze waarnemingen zijn in overeenstemming met die van DE KLOET (1968), die in *S. cerevisiae* geen remming door 6-azaüracil en 5-fluoruracil van de door maltose geïnduceerde α -glukosidase-synthese aantoonde. Wel werd de ribosoom-synthese door deze verbindingen geremd.

Omdat voor het tot uitdrukking komen van de groeiremming van gist door 6-methylpurine, 5-fluoruracil en 6-azaüracil zoveel tijd nodig is, kan uit het onvermogen van deze verbindingen de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting te verhinderen, geen konklusie worden getrokken over het al of niet noodzakelijk zijn van boodschapper-RNA-synthese tijdens die derepressie.

6.3 INVLOED VAN STIKSTOF-UITPUTTING OP GIST DIE IN ARGININE-HOUDENDE MEDIA WERD GEKWEKT

Tot nu toe werd in dit onderzoek de derepressie van arginase en OTA bestudeerd tijdens N- of inositol-uitputting van gist die in diverse media zonder arginine werd gekweekt. Steeds waren slechts geringe arginase- en OTA-aktiviteiten in de gist aanwezig, voordat de N-uitputting begon. Voor bestudering van het mechanisme van de derepressie tijdens N-uitputting is het van belang te weten welk effect N-uitputting heeft op gist die werd gekweekt onder omstandigheden die leiden tot inductie van arginase en OTA. Gist werd daartoe gekweekt met pepton of arginine als enige N-bron, zowel in glukose- als in melkzuur-

medium, en vervolgens aan N-uitputting blootgesteld (Tabel 6.3). Het blijkt dat de specifieke activiteiten op hun aanvankelijke hoge niveau blijven, en tijdens N-uitputting niet verder toenemen. De toeneming van de specifieke activiteiten van arginase en OTA met 30 tot 80, resp. 1,5 tot 2,5 eenheden per mg eiwit, zoals die wordt waargenomen in gist die werd gekweekt onder voor die enzymen represserende omstandigheden, blijft achterwege als beide enzymen voordat de N-uitputting begint reeds geïnduceerd waren. Twee verklaringen zijn hiervoor te geven:

TABEL 6.3. Invloed van N-uitputting op de specifieke activiteiten van arginase en OTA in gist gekweekt in arginine-houdende media.

Gist werd aëroob gekweekt met de aangegeven C- en N-bron. De N-uitputting werd gedurende 2 uur bij 30° uitgevoerd (1 g gist per 50 ml geaëreerd N-vrij glukose-medium).

Kweekmedium		Arginase spec. aktiv.		OTA spec. aktiv.	
C-bron	N-bron	Kontrolle	N-deficiënt	Kontrolle	N-deficiënt
Glukose	Arginine	43- 95	52- 96	2,30-5,75	2,80-5,40
Glukose	Pepton	27- 60	34- 53	1,70-2,74	1,75-2,00
Melkzuur	Arginine	120-155	89-116	3,30-4,26	3,37-4,40
Melkzuur	Pepton	110	117	1,77	1,66
Glukose	(NH ₄) ₂ SO ₄	2- 5	40- 90	0,04-0,20	1,20-2,80

1. De specifieke activiteiten zijn aan een maximum gebonden, waarboven verdere enzymvorming onmogelijk is. Dit zou kunnen worden veroorzaakt door remming van de enzym synthese door hoge enzymconcentraties, bij voorbeeld in die zin dat een enzym in hoge concentratie in staat zou zijn te verhinderen dat pas gevormde enzym-molekulen van het polysoom loslaten. Omdat een dergelijk gedrag van makromolekulen moeilijk is in te denken, lijkt deze verklaring onwaarschijnlijk. Zulks te meer omdat bij voorbeeld in een *E. coli*-mutant waarin de vorming van β -galaktosidase is ontregeld, dit enzym in zulke grote hoeveelheden wordt gemaakt, dat het 25% van het totale eiwit van de bacterie kan uitmaken (NOVICK en HORIUCHI, 1961). Een andere tegenwerping is, dat in gist gekweekt in pepton-medium de specifieke activiteiten niet maximaal zijn, en dat desondanks derepressie tijdens N-uitputting uitblijft.
2. Boodschapper-RNA dat met arginase of OTA overeenkomt wordt tijdens de enzymvorming zeer snel afgebroken. Het verschil tussen geïnduceerde en gerepresseerde gist is dan dat in de eerstgenoemde vrijwel geen, in de laatste wel boodschapper-RNA aanwezig is dat als matrijs voor de arginase- en OTA-synthese dienst kan doen. Deze verklaring houdt in, dat de derepressie van beide enzymen tijdens N-uitputting slechts kan verlopen als boodschapper-RNA voor het begin van de N-uitputting in de gist aanwezig is. Deze verklaring klinkt aannemelijker dan de vorige, maar is onvoldoende als bewijsmateriaal voor het niet-betrokken zijn van boodschapper-RNA-synthese bij de derepressie tijdens N-uitputting.

6.4 INVLOED VAN VOORBEHANDELING VAN DE GIST OP DE
DEREPRESSIE TIJDENS STIKSTOF-UITPUTTING

Op de vraag of de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist verloopt met tevoren in de cellen aanwezig boodschapper-RNA, kan een antwoord worden gezocht door de gistcellen voor ze aan N-uitputting bloot te stellen gedurende lange tijd te bewaren of uit te putten. In de proeven, vermeld in Tabel 6.4 werd aëroob in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium gekweekte gist in centrifugebuizen bij verschillende temperaturen bewaard, of in medium zonder C- en N-bron uitgeput. Duidelijk blijkt dat het vermogen tot derepressie van arginase en OTA gedurende 72 uur bij 5°, 24 uur bij 30° en 1 uur bij een temperatuur niet hoger dan 42° bewaard blijft, evenals na langdurige uitputting in al of niet geaëreerd medium zonder C- en N-bron. Dit zou erop kunnen wijzen dat de aanwezigheid van met arginase en OTA overeenkomend boodschapper-RNA bij het begin van de N-uitputting niet noodzakelijk is voor de derepressie van die enzymen. Mocht deze noodzaak wel bestaan, dan moet men aannemen dat deze boodschapper-RNA-molekulen zeer stabiel zijn zolang ze in rustende cellen niet voor enzym synthese worden verbruikt.

TABEL 6.4. Invloed van bewaren, verwarmen en uitputten van gist op de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting.

Gist werd aëroob gekweekt in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium en vervolgens bewaard of verwarmd in porties van 1 g (onder een rubberstop in een centrifugebuis, na centrifugeren en afschenken van de bovenstaande vloeistof). Een andere behandeling was uitputting in kweekmedium zonder C- en N-bron (1 g gist per 100 ml), dat werd geaëreerd of zachtjes geschud. De N-uitputting werd uitgevoerd in staande kultuur (1 g gist per 50 ml N-vrij glukose-medium, 2 uur bij 30°).

	Spec. aktiv. vóór N-uitputting		Spec. aktiv. na N-uitputting		
	Arginase	OTA	Arginase	OTA	
Kontrole	4,5	0,08	60	3,00	
Bewaren en verwarmen:					
Tijd (h)	Temperatuur				
24	30°	4,8	0,09	56	3,00
48	30°	4,3	0,07	18	1,25
72	5°	4,5	0,07	56	2,67
24	37°	3,7	0,06	11,5	0,50
1	42°	4,5	0,08	50	4,10
1	50°	4,5	0,08	7,9	0,46
Uitputten:					
Tijd (h)	Temperatuur				
20, geaëreerd	30°	17	0,35	47	2,30
24, geschud	30°	6,5	0,12	78	4,18
48, geschud	30°	5,5	0,11	41	2,60

6.5 DISKUSSIE

De in dit hoofdstuk vermelde proeven werden opgezet met de bedoeling een antwoord te krijgen op de volgende vragen:

1. Vindt de repressie van arginase en OTA door N-verbindingen plaats op transkriptie-niveau dan wel op translatie-niveau?
2. Is voor de derepressie tijdens N-uitputting van arginase en OTA de gelijktijdige vorming van boodschapper-RNA noodzakelijk, of verloopt deze enzymsynthese met behulp van reeds in de gist aanwezig boodschapper-RNA?

De korte tijd die N-verbindingen nodig hebben voor het onderbreken van een reeds op gang zijnde maar nog onvoltooid derepressie tijdens N-uitputting (Figuur 4.3), is een aanwijzing dat N-verbindingen de enzymvorming op translatie-niveau beïnvloeden. Zouden ze hun invloed uitoefenen op transkriptie-niveau, dan moet worden aangenomen dat de met arginase en OTA overeenkomende boodschapper-RNA-molekulen tijdens de enzymsynthese zeer snel worden verbruikt en geïnactiveerd.

De proeven waarin werd nagegaan of de derepressie tijdens N-uitputting door uracil- of adenine-analogen wordt geremd (Tabel 6.3), geven geen antwoord op de tweede vraag, omdat deze analogen hun groeiremmende werking op gist pas na verloop van tijd uitoefenen. Uit de andere in dit hoofdstuk vermelde proeven kan geen rechtstreeks antwoord op beide vragen worden afgeleid. Wel kan een model worden opgesteld waarmee de waargenomen verschijnselen zo goed mogelijk worden verklaard.

Het uitblijven van derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting van gist die met arginine of pepton als N-bron werd gekweekt (Tabel 6.3), is het best te verklaren door aan te nemen dat boodschapper-RNA vóór het begin van de N-uitputting in de gist aanwezig moet zijn en dat dit boodschapper-RNA tijdens de arginase- en OTA-synthese snel door verbruik onwerkzaam wordt gemaakt. Deze konklusie is in tegenspraak met de waarneming dat gist gekweekt in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium gedurende lange tijd kan worden bewaard of uitgeput zonder verlies van het vermogen tot derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting (Tabel 6.4). Laatstgenoemd resultaat zou erop kunnen wijzen dat boodschapper-RNA niet voor het begin van de N-uitputting aanwezig is. Zou de derepressie toch afhankelijk zijn van reeds aanwezig boodschapper-RNA, dan moet worden aangenomen dat dit RNA uitermate stabiel is in rustende gistcellen waarin het niet voor enzymsynthese wordt verbruikt. Alleen als dat het geval is, zijn de resultaten van beide proeven met elkaar in overeenstemming.

De waargenomen verschijnselen kunnen het best worden verklaard met het volgende model: N-verbindingen remmen in samenwerking met myo-inositol de vorming van arginase en OTA aan het polysoom, of het loslaten van deze enzymen daarvan; de derepressie van beide enzymen tijdens N-uitputting is afhankelijk van boodschapper-RNA dat vóór het begin van de N-uitputting in de gist aanwezig was. Voorwaarden voor geldigheid van dit model zijn: snelle inactivering van boodschapper-RNA tijdens de synthese van arginase en OTA, en grote stabiliteit van boodschapper-RNA in rustende cellen waarin

geen arginase en OTA worden gevormd. De juistheid van dit model kan slechts worden onderzocht door bestudering van het enzym-vormend systeem in vitro.

6.6 SAMENVATTING

1. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting wordt door hoge concentraties 5-fluoruracil en 6-azaüracil niet, en door 6-methylpurine slechts zwak geremd. De groeiremming door deze verbindingen treedt pas op enkele uren na hun toevoeging aan een gistcultuur.
2. Geen derepressie van arginase en OTA wordt waargenomen na N-uitputting van gist die met arginine of pepton als N-bron werd gekweekt.
3. Het vermogen tot derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting blijft behouden na langdurig bewaren of uitputten van de gist.
4. Uit de waargenomen verschijnselen kan niet rechtstreeks een model van de regulatie van de arginase- en OTA-vorming worden afgeleid. Ze kunnen het best worden verklaard door aan te nemen dat N-verbindingen in samenwerking met myo-inositol beide enzymen op translatie-niveau represseren, en dat de derepressie tijdens N-uitputting afhankelijk is van vóór de N-uitputting in de gist aanwezig boodschapper-RNA. Het laatste moet de volgende eigenschappen hebben: het moet door verbruik tijdens de enzym synthese snel onwerkzaam worden gemaakt, en het moet in rustende gistcellen waarin geen enzym synthese plaatsvindt uitermate stabiel zijn.

HOOFDSTUK 7

ANDERE MECHANISMEN IN DE REGULATIE DER ARGININE-AFBRAAK

7.1 INLEIDING

Stofwisselingsprocessen worden beheerst door veranderingen in het enzympatroon van de cel en door beïnvloeding van enzymactiviteiten. In de voorgaande hoofdstukken werd vooral aan de eerste groep regulatie-mechanismen aandacht besteed, in het bijzonder aan inductie en repressie. In dit hoofdstuk zullen proeven worden beschreven waarin werd nagegaan of arginase en OTA gevoelig zijn voor remming door reactie-produkten en andere N-verbindingen. Verder zal worden ingegaan op de betekenis van inaktiveringsrepressie voor de regulatie van de arginine-afbraak in gist.

7.2 REMMING VAN ARGINASE EN OTA DOOR AMINOZUREN EN ANDERE STIKSTOF-VERBINDINGEN

Anders dan in de regulatie van biosynthetische processen het geval is, speelt allosterische eindproductremming in biologische afbraakprocessen een ondergeschikte rol. Tot nu toe werd eindproductremming in een afbraakweg slechts in *Pseudomonas putida* aangetoond (HUGH, ROTH en HUNTER, 1968). In deze bacterie remt succinaat het tweede enzym van de histidine-afbraakweg, urocanase, competitief. Histidine wordt door dit organisme via urocaanzuur en glutaminezuur tot barnsteenzuur afgebroken.

Leverarginase wordt door vele aminozuren geremd (HUNTER en DOWNS, 1945). Ter verkrijging van een juist beeld van de regulatie der arginine-afbraak is het van belang na te gaan in hoeverre gistarginase voor remming door aminozuren en andere N-verbindingen gevoelig is. Omdat gistarginase in vivo Fe^{2+} -ionen als prosthetische groep bevat (zie MIDDELHOVEN, 1965a en b, 1969b, en Hoofdstuk 8 van dit proefschrift) werd remming door N-verbindingen niet nagegaan bij Mn-arginase, maar bij in vitro bereide Fe-arginase (zie 8.2) en bij gistarginase die de natuurlijke cofactor bevatte (natieve arginase). Deze laatste werd door voorzichtige extractie van fosfaat-arme gist geïsoleerd (zie onder 8.3). In Tabel 7.1 is te zien dat α -aminoboterzuur, de alifatische aminozuren met vertakte keten, asparaginezuur en lysine sterk remmen. Geen remming werd waargenomen met NH_4Cl , alanine, asparagine, fenylalanine, glutamaat, glutamine, glycine, histidine, homoserine, methionine, proline, serine en threonine. Omdat gistarginase door glutamaat, NH_4Cl , glutamine en asparagine niet wordt geremd, moet worden aangenomen dat eindproductremming geen rol speelt bij de regulatie van de arginase-reaktie. Het fysiologisch belang van de remming door andere aminozuren voor deze regulatie is onduidelijk. Er werd aan deze remming verder geen aandacht besteed.

TABEL 7.1. Remming van gistarginase door aminozuren.

Natieve gistarginase en in vitro bereide Fe-arginase werden bij pH 8,5 in 100 mM Tris-HCl-buffer bepaald (50 mM L-arginine pH 8,5, 1 uur bij 30°, 5 enzymeenheden per 2 ml) in aanwezigheid van aminozuren (10 mM, L-isomeer, pH 8,5).

Toegevoegd aminozuur	Percentage remming	
	Natieve arginase	Fe-arginase
Geen	0	0
DL- α -Aminoboterzuur	35-40	30-60
L-Asparaginezuur	35-50	20-50
L-Isoleucine	35-50	30
L-Leucine	35-50	35
L-Lysine-HCl	20-25	35-50
L-Valine	40-50	30

Ook OTA is gevoelig voor remming door aminozuren. In de proef van Tabel 7.2 zijn deze in een concentratie van 20 mM aan het gebruikelijke inkubatiemengsel toegevoegd (concentraties L-ornithine en 2-oxoglutaraat eveneens 20 mM). Zeer sterk wordt het enzym door homocysteïne-thiolakton en door cysteïne geremd. Verder door de alifatische aminozuren met vertakte keten (evenals arginase) en door histidine. Door lysine wordt de enzymwerking bevorderd: dit aminozuur wordt zelf echter niet getransamineerd. In inkubatiemengsels als voor de OTA-bepaling die lysine in plaats van ornithine bevatten, werd althans geen geel pigment gevormd. Geen remming van OTA werd waargenomen met alanine, asparagine, aspartaat (tot 160 mM), fenyalanine, glutamaat (tot 160 mM), glutamine, glycine, homoserine, kadaverine, methionine, proline, putrescine, serine, threonine, tryptofan en tyrosine. Evenmin als arginase wordt OTA door eindproducten van de arginine-afbraak geremd. Het fysiologisch belang van de remming door andere aminozuren en van de bevorderende werking van lysine, is onduidelijk. Er werd geen verdere aandacht aan geschonken.

TABEL 7.2. Remming van OTA door aminozuren.

OTA werd op de gebruikelijke wijze bepaald in een celextrakt van bij een bakker gekochte gist, dat aan gelfiltratie over Sephadex G-25 was onderworpen (10 mM kaliumfosfaat pH 7,5). Inkubatie: totaal volume 1,0 ml, 2,9 mg eiwit, 2 1/2 uur 30°, 20 mM L-ornithine, 20 mM 2-oxoglutaraat, 20 mM remmend aminozuur (L-isomeer).

Toegevoegd aminozuur	OTA	
	Spec. aktiv.	% aktiviteit
Geen	0,41	100
L-Cysteïne	0,11	28
L-Histidine-HCl	0,24	57
DL-Homocysteïne-thiolakton	0,03	7
L-Isoleucine	0,21	52
L-Leucine	0,21	52
L-Lysine-HCl	0,83	205
L-Valine	0,23	55

7.3 REMMING VAN ARGINASE DOOR REAKTIE-PRODUKTEN

Enzymen met een katabolische functie worden vaak geremd door de produkten van de reactie welke door hen wordt gekatalyseerd. Vaak is deze remming van het kompetitieve type; het remmende reactie-produkt konkurreert met het substraat om de aktieve plaats op het enzymoppervlak. Het belang van dit verschijnsel voor de regulatie van de stofwisseling is duidelijk: het substraat wordt tegen ongewenste afbraak beschermd indien een reactie-produkt wegens stagnatie van de verdere verwerking ophoopt. De remming van leverarginase door ornithine werd reeds door GROSS (1920) aangetoond en sindsdien door tal van auteurs aan de hand van arginases uit verschillende bronnen bevestigd. Arginase van kippelever en van *Neurospora* wordt door ornithine zuiver kompetitief geremd (MORA, TARRAB en BOJALIL, 1966); de remming van arginase uit ratte- of runderlever door ornithine is zowel kompetitief als niet-kompetitief (zelfde auteurs, HUNTER en DOWNS, 1945). Proeven die in het volgende hoofdstuk (onder 8.5) worden beschreven, wijzen uit dat alle werkzame metaalkomplexen van gistarginase door ornithine zeer sterk worden geremd. De remming is zuiver kompetitief en de affiniteit van het enzym tot ornithine is ongeveer twee tot vier maal zo groot als die tot het substraat (zie Tabel 8.4).

Om na te gaan of arginase door ureum wordt geremd is het noodzakelijk de enzymbepaling niet langer te baseren op bepalingen van dit reactie-produkt, maar op die van ornithine. In de proef van Tabel 7.3 werd gistarginase in aanwezigheid van ureum bepaald, zowel na aktivering met CoCl_2 (zie onder 3.4) als na aktivering met MnCl_2 . Ornithine werd bepaald met zuur ninhydrine-reagens (CHINARD, 1952) volgens RATNER (1962). Het was noodzakelijk aan de ornithine-standaard evenveel arginine en glycine toe te voegen als in de monsters aanwezig was. Duidelijk is te zien dat ureum vrijwel geen remmende werking op Co- en Mn-arginase heeft. Ook HUNTER en DOWNS (1945) toonden aan dat met Co^{2+} geaktiveerde runderleverarginase bij pH 8,4 door ureum in konzentraties tot 89 mM niet wordt geremd. Waarschijnlijk wordt ook de in vivo werkzame vorm van gistarginase, Fe-arginase, door ureum niet geremd.

TABEL 7.3. Remming van gistarginase door ureum.

Een celextrakt van bij een bakker gekochte gist werd zowel met CoCl_2 als met MnCl_2 geaktiveerd (zie onder 3.4). Enzymbepaling vond plaats in 100 mM kaliumfosfaat pH 6,7, resp. in 100 mM Na-glycinaat pH 9,5; beide 50 mM L-arginine, wisselende ureum-konzentratie, 1 uur 30°, max. 5 enzymeenheden per 2 ml inkubatie-mengsel. Enzymaktiviteit: aantal μmol ornithine gevormd per uur per mg eiwit.

Konzentratie ureum mM	Mn-arginase pH 9,5	Co-arginase pH 6,7
0	42,0	8,1
5	41,4	
20	40,8	
100	40,8	7,9

7.4 INAKTIVERINGSREPRESSIE

Bij overbrengen van cellen naar omstandigheden waaronder een bepaald enzym wordt gerepresseerd, treedt behalve remming van de vorming soms afbraak of inaktivering van dat enzym op. Literatuur over dit verschijnsel werd reeds in Hoofdstuk 1 (onder 1.3.6) gegeven. Of dit mechanisme bij de regulatie van de arginine-afbraak in gist een rol speelt, kan worden nagegaan door gist van glukose-pepton-medium over te brengen naar glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. In het eerste medium worden arginase en OTA immers geïnduceerd, in het tweede gerepresseerd. In de proef van Tabel 7.4 (MIDDELHOVEN, 1969a) werden beide specifieke activiteiten gedurende 4 uur (twee delingstijden) gevolgd. Ze nemen duidelijk af tijdens de groei in het minimale medium. Om na te gaan of deze vermindering aan enzym-afbraak dan wel aan verdunning met nieuw-gevormd eiwit was te wijten, werden de waargenomen specifieke activiteiten vermenigvuldigd met het overeenkomstige drooggewicht van de kultuur. De zo verkregen waarden zijn evenredig aan de totale hoeveelheid enzym in de kultuur, mits het eiwitgehalte van de gist tijdens de proef konstant is. Duide-lijk is te zien dat de totale hoeveelheden van arginase en OTA in de kultuur binnen de bepalingfouten konstant zijn, zodat mag worden gekonkludeerd dat beide enzymen niet aan inaktiveringsrepressie zijn onderworpen.

TABEL 7.4. Het verloop van de repressie van arginase en OTA met de tijd.

Gist werd aëroob in glukose-pepton-medium gekweekt en daarna gesuspendeerd (5 g per l) en geaëreerd in glukose-(NH₄)₂SO₄-medium. Op gezette tijden werden monsters genomen ter bepaling van het drooggewicht en van specifieke enzymactiviteiten.

Tijd min.	Droog- gewicht g/l	Arginase spec. aktiv.	idem, × droog-gewicht	OTA spec. aktiv.	idem, × droog-gewicht
0	1,25	68,5	85,5	3,46	4,32
30	1,32	70,5	93,0	3,60	4,76
60	1,40	57,5	80,5	2,88	4,03
90	1,80	42,0	75,5	2,38	4,26
120	2,36	34,2	90,0	1,84	4,84
180	3,65	27,9	102	1,27	4,63
240	4,91	16,4	80,5	0,86	4,22

7.5 DISKUSSIE

In dit hoofdstuk zijn proeven beschreven waarin werd nagegaan in hoeverre arginase en OTA gevoelig zijn voor remming door stofwisselingsprodukten, in het bijzonder aminozuren en andere N-verbindingen. Gistarginase wordt sterk door ornithine geremd (zie Tabel 8.4). Op deze remming, die van het kompetitieve type is, en die onmiskienbaar van groot belang is voor de regulatie van de arginine-afbraak in gist, zal in het volgende hoofdstuk (onder 8.5) nader worden ingegaan. Het andere produkt van de arginase-reaktie, ureum, heeft in konzentraties tot 100 mM geen remmende werking op met Co²⁺- of Mn²⁺-ionen geaktiveerde gistarginase (Tabel 7.3). Dit is in overeenstemming met

waarnemingen van HUNTER en DOWNS (1945) aan met Co^{2+} -zouten geactiveerde runderleverarginase.

Gistarginase in de natieve vorm (geactiveerd door de natuurlijke cofactor, Fe^{2+}) en in vitro bereide Fe-arginase worden bij pH 8,5 door 10 mM α -aminoboterzuur, aspartaat, isoleucine, leucine, lysine en valine voor 30 tot 50% geremd (arginiekoncentratie 50 mM). Tal van andere N-verbindingen waaronder NH_4Cl , glutamaat, proline, glutamine en asparagine remmen gistarginase onder deze omstandigheden niet (Tabel 7.1). Sterke competitieve remming door lysine en sterke niet-competitieve remming door leucine, isoleucine, valine, norvaline en α -aminoboterzuur van met Co^{2+} -ionen geactiveerde runderleverarginase werd bij pH 8,4 waargenomen door HUNTER en DOWNS (1945); asparaginezuur bleek runderleverarginase slechts zwak, niet-competitief te remmen.

OTA wordt geremd door sulphydryl-aminozuren (homocysteïne en cysteïne, het eerste als thiolakton toegediend), leucine, isoleucine, valine en histidine als deze aminozuren in gelijke concentratie (20 mM) als ornithine aan de inkubatiemengsels voor de enzymbepaling worden toegevoegd; lysine stimuleert de transaminering van ornithine, zonder zelf te worden getransamineerd. Geen remming van OTA wordt waargenomen met andere N-verbindingen, waaronder aspartaat en glutamaat (beide in concentraties tot 160 mM), putrescine en proline (Tabel 7.2).

Uit deze waarnemingen kan worden gekonkludeerd dat eindproduktremming geen rol speelt in de regulatie van de arginine-afbraak. Was dit wel het geval, dan had sterke remming van arginase door NH_4Cl , glutamaat, glutamine of asparagine moeten zijn waargenomen. De gevonden remming van gistarginase door aminozuren stemt goed overeen met de waarnemingen van HUNTER en DOWNS (1945) aan runderleverarginase. Klaarblijkelijk is er in dit opzicht grote verwantschap tussen de arginases uit beide bronnen. De eventuele rol van deze remming bij de regulatie van de arginine-afbraak is niet geheel duidelijk. De remming van arginase en OTA door betrekkelijk lage concentraties valine, leucine en isoleucine, en de remming van arginase door lysine zijn aanzienlijk. De concentraties van valine, isoleucine en lysine in de vrije-aminozoorvoorraad van gist variëren echter betrekkelijk weinig. SPIEGELMAN, HALVORSON en BEN-ISHAÏ (1955) vonden dat de gehalten aan vrij valine, isoleucine en lysine in gist van glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium, voor en na 12 uur stikstofuitputting in N-vrij glukose-medium 1,57, 0,64 en 4,3, resp. 0,68, 0,35 en 1,78 μmol per 100 mg gist waren. De gehalten aan asparaginezuur en arginine waren onder deze omstandigheden 3,6 en 1,20 resp. 0,62 en 0,36 μmol per 100 mg gist. Bovendien bleek dat het asparaginezuur-gehalte van N-deficiënte gist 15 minuten na toevoeging van NH_4Cl de normale waarde vrijwel bereikt had. Omdat het gehalte van de gist aan vrij asparaginezuur zo sterk en zo snel kan schommelen, is de remming van arginase door aspartaat wellicht van groter belang voor de regulatie van deze reactie dan die door de andere remmende aminozuren.

Het is interessant een vergelijking te maken tussen de remmende invloed van aminozuren op de werking van arginase en OTA (Tabel 7.1 en Tabel 7.2), en

die op de synthese van deze beide enzymen zoals waargenomen wordt na toediening van aminozuren aan gist onder omstandigheden van N-uitputting (Tabel 4.11 en Tabel 4.12). Van de aminozuren die de werking van arginase remmen, veroorzaken asparaginezuur en leucine een sterke remming van de derepressie tijdens N-uitputting, valine, isoleucine en α -aminoboterzuur een zwakke, terwijl lysine in het geheel niet remt, evenmin als histidine dat OTA wel remt. Tal van N-verbindingen die de derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting remmen, blijken zonder invloed op de enzymwerking.

Afbraak of inaktivering van enzymen met katabolische functie onder voor die enzymen represserende omstandigheden, zoals die in gist vaak wordt waargenomen (zie onder 1.3.6), maakt geen deel uit van de regulatie van de arginineafbraak. Arginase en OTA worden niet afgebroken indien gist van glukose-pepton-medium naar glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium wordt overgebracht (Tabel 7.4). De tijdens groei in het laatstgenoemde medium waargenomen vermindering der specifieke enzymaktiviteiten moet uitsluitend aan verdunning met nieuw-gevormd eiwit worden toegeschreven. Beide enzymen zijn klaarblijkelijk niet aan inaktiveringsrepressie onderworpen.

7.6 SAMENVATTING

1. Gistarginase in de natieve vorm (met Fe^{2+} -ionen geactiveerd) wordt behalve sterk kompetitief door ornithine, duidelijk geremd door α -aminoboterzuur, aspartaat, isoleucine, leucine, lysine en valine. Geen remming treedt op door toevoeging van tal van andere N-verbindingen, waaronder NH_4Cl , glutamaat, proline, asparagine, glutamine en ureum.
2. OTA wordt sterk geremd door de sulfhydryl-aminozuren homocysteïne en cysteïne, verder door histidine, valine, leucine en isoleucine; lysine stimuleert het enzym zonder zelf te worden getransamineerd. Geen remming van OTA wordt waargenomen na toevoeging van glutamaat of aspartaat (in hoge concentraties), of van putrescine, proline en tal van andere N-verbindingen.
3. Indien glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium wordt geënt met een grote hoeveelheid gist gekweekt in glukose-pepton-medium, blijven de totale hoeveelheden arginase en OTA in de kultuur gedurende twee delingen gelijk; inaktiveringsrepressie treedt niet op.

HOOFDSTUK 8

OVER DE COFAKTOR VAN GISTARGINASE IN VIVO

8.1 INLEIDING

In hoofdstuk 3 is beschreven hoe de aanwezigheid van arginase in bakkergist werd aangetoond. De activiteit van dit enzym blijkt zowel door MnCl_2 als door CoCl_2 te worden bevorderd. Uit de waarneming dat tussen de specifieke activiteiten van Mn-arginase bij pH 9,5 en Co-arginase bij pH 6,7 een konstante verhouding bestaat, werd gekonkludeerd dat beide enzymactiviteiten bij één enzymeiwit behoren. Deze konklusie werd bevestigd door de onmogelijkheid beide enzymactiviteiten door middel van gebruikelijke technieken van enzymfraktionering te scheiden.

Reeds door EDLBACHER en BAUR (1938) werd waargenomen dat gistarginase in vitro door verscheidene metaalionen wordt geactiveerd. Zij vonden stimulering van de enzymactiviteit van een gedialyseerd preparaat door de bivalente kationen van Mn, Zn, Co, Ni en Cd; die van Fe, Cu, Mg en Ca bleken zonder invloed op de enzymactiviteit. De genoemde kationen werden door EDLBACHER en BAUR in een concentratie van 1 mM aan het enzympreparaat toegevoegd, gelijktijdig met het substraat (0,28 M L-arginine pH 9,5). Gistarginase gelijkt, wat betreft de aard van de aktiverende metaalionen, op leverarginase (HELLERMAN en PERKINS, 1935; MOHAMMED en GREENBERG, 1945) en op de arginase van *Canavalia*-bonen (STOCK, PERKINS en HELLERMAN, 1938; ANDERSON, 1945), die beide door Mn, Co, Ni en Fe worden geactiveerd.

In Hoofdstuk 1.4 werd reeds vermeld dat de vraag, welk van de kationen die arginase in vitro kunnen aktiveren, in vivo als aktivator optreedt, onbeslist is, zeker wat betreft gistarginase. Daarom werd het nodig gevonden bij het onderzoek naar eventuele remming van arginase door aminozuren en reaktieprodukten (zie Hoofdstuk 7), rekening te houden met de aard van het metaalion dat gistarginase in vivo aktiveert. Onderzoek hierover is uitvoerbaar omdat het hier niet gaat om een snel dissociërend coënzym, maar om een chemisch gebonden prosthatische groep. Uit literatuurgegevens (zie onder 1.4) blijkt dat leverarginase-metaalkomplexen tamelijk stabiel zijn, en dialyse enige tijd kunnen verdragen. De natuurlijke leverarginase kan zelfs gedeeltelijk worden gezuiverd (RICHARDS en HELLERMAN, 1940).

Fe^{2+} -ionen blijken in vivo de cofaktor van gistarginase te zijn. Het onderzoek dat tot deze konklusie leidde was in de eerste plaats gericht op de bereiding van celextrakten, waarin zonder toevoeging van metaalzouten grote arginase-aktiviteit aantoonbaar is. De eigenschappen van deze arginase-aktiviteit werden vergeleken met die van in vitro bereide arginase-metaalkomplexen van bekende samenstelling. Bestudeerd werden: pH-aktiviteitskrommen, de gevoeligheid voor bepaalde remstoffen en enkele kinetische konstanten. Bovendien werd

nagegaan welk effect Fe-deficiëntie heeft op de eigenschappen van gistarginase, en of bij dit enzym Fe^{2+} -ionen onder omstandigheden van CoCl_2 - of MnCl_2 -vergiftiging in vivo door Co^{2+} - of Mn^{2+} -ionen kunnen worden vervangen.

8.2 pH-AKTIVITEITSKROMMEN VAN DIVERSE ARGINASE-METAALKOMPLEXEN

Met behulp van een enzympreparaat dat tevoren geheel van aktiverende metaalionen was bevrijd, werd onderzocht welke metaalionen in staat zijn gistarginase in vitro te aktiveren. Dit enzympreparaat werd bereid door aan een celextrakt van bij een bakker gekochte gist, of van gist die aëroob in glukose-pepton-medium werd gekweekt, dinatrium-ethyleendiaminetetraäcetaat (EDTA) toe te voegen in een concentratie van 10 mM. Na 10 minuten reaktie bij kamertemperatuur (pH 7,5 tot 8,5) werden laagmoleculaire bestanddelen uit het celextrakt verwijderd door gelfiltratie over een kolom Sephadex G 25, die tevoren met 10 mM Tris-HCl pH 8,5 in evenwicht was gebracht (zie 2.4). In op deze wijze geïnaktiveerde celextrakten was tussen pH 5,0 en pH 11,0 geen arginase-aktiviteit aantoonbaar. De mogelijkheid met metaalzouten te reaktiveren werd nagegaan door inkubatie bij 30°, gedurende enkele uren, van 0,10 ml geïnaktiveerd celextrakt (ongeveer 1,0 mg eiwit), 10 μmol metaalzout (meestal chloride) en 20 μmol Tris-HCl-buffer pH 7,5, in een totaal volume van 0,5 ml. Na deze aktivering werd arginase-aktiviteit aangetoond na toevoeging van 1,0 ml 200 mM Tris-HCl pH 8,0 en 0,5 ml 200 mM L-arginine pH 8,0. Na 1 uur werd de reaktie onderbroken (zie 2.5.2) en werd ureum bepaald (zie 2.6.6). Arginase-aktiviteit werd uitsluitend aangetoond na aktivering van het enzym met MnCl_2 , CoCl_2 , NiCl_2 , FeCl_2 en, in mindere mate, met MgCl_2 . Toevoeging van andere tweewaardige kationen, zoals die van Ba, Be, Ca, Cd, Cu, Hg, Pb, Pd, Sn, Sr, UO_2 , Zn en ZrO_2 , en van driewaardige kationen (die van Al, Ce, Fe en La) aktiveerde het enzym niet. Gistarginase komt, wat betreft de aard van de aktiverende kationen, vrijwel geheel overeen met leveren *Canavalia*-arginase. Aktivering van gistarginase door Cd- en Zn-zouten, zoals door EDLBACHER en BAUR (1938) werd vermeld, kon niet worden aangetoond. Merkwaardig genoeg werd wel aktivering door MgCl_2 verkregen. Mg^{2+} -ionen zijn nooit eerder als werkzame cofaktor van arginase beschreven.

Voor optimale aktivering van gistarginase bleken hogere zoutconcentraties en hogere inkubatie-temperaturen nodig. Aan 1 ml op de bovenbeschreven wijze geïnaktiveerd celextrakt werd 100 μmol metaalzout en 100 μmol Tris-HCl pH 7,5 toegevoegd (totaal volume 2,5 ml). Daarna werd 15 minuten geïnkubéerd in een waterbad van 45° (CoCl_2 , FeCl_2 en NiCl_2) of bij 50° (MgCl_2 en MnCl_2). De aktivering met MnCl_2 en met CoCl_2 bleek zeer goed reproduceerbaar. Aktivering met andere kationen geeft enigszins variabele resultaten. Mn-arginase is het meest aktief (pH-optimum 9,5). Daarom werden de aktiviteiten van de arginase-metaalkomplexen in een celextrakt uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5 (Tabel 8.1).

Het verband tussen de pH en de specifieke aktiviteit van, op de bovenbeschreven wijze bereide, arginase-metaalkomplexen werd bepaald door inku-

TABEL 8.1. Relatieve specifieke activiteiten van verschillende gistarginase-metaalkomplexen. De werkwijzen werden in de tekst beschreven. Specifieke activiteiten werden uitgedrukt in % van de specifieke activiteit van Mn-arginase in glycinaat-buffer pH 9,5.

Cofactor	pH	Buffer	% Specifieke activiteit
Mn	9,5	Glycinaat	100
Mg	9,5	Glycinaat	5-15
Co	9,5	Glycinaat	31
Co	8,5	Tris	20
Fe	8,5	Tris	15-25
Ni	7,0	Fosfaat	10-20

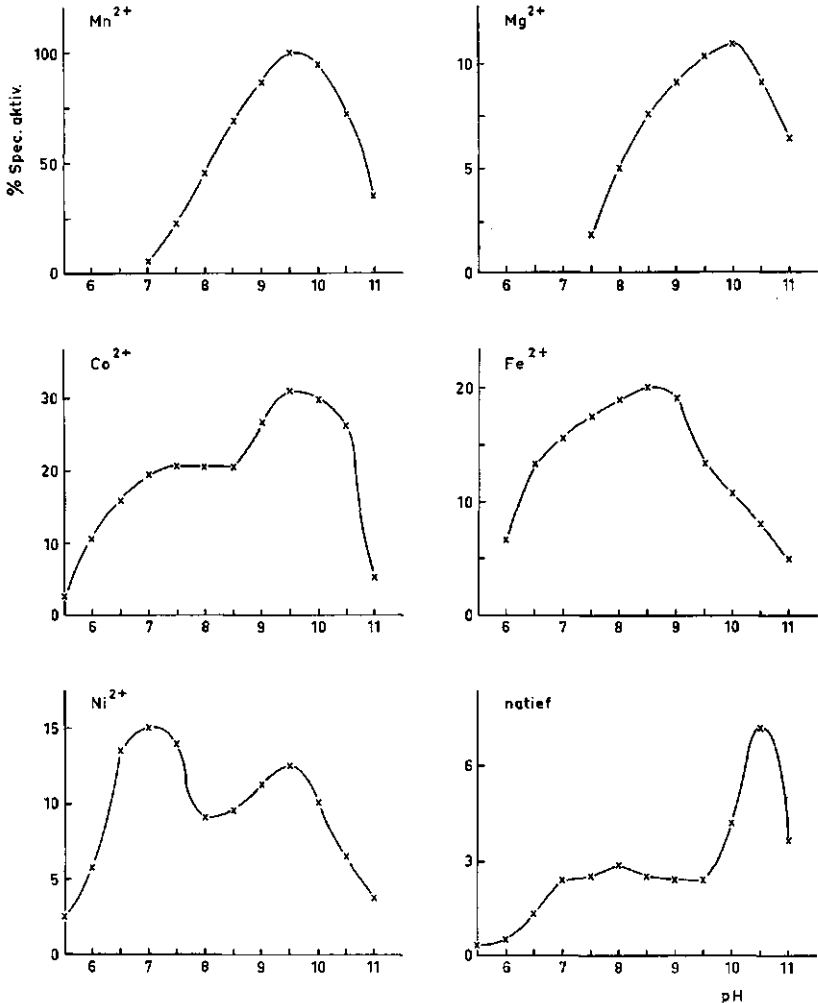


FIG. 8.1. pH-activiteitskrommen van gistarginase na activering met verschillende tweewaardige kationen, en van native arginase van uit de handel verkregen bakkersgist. De werkwijzen zijn in de tekst beschreven. De enzymactiviteit wordt uitgedrukt in % van de specifieke activiteit van Mn-arginase bij pH 9,5.

batie van enzym met 100 mM buffer en 50 mM L-arginine-HCl (op de gewenste pH gebracht met NaOH). Verdere experimentele bijzonderheden zijn te vinden onder 2.5.2. Als buffers werden gebruikt: voor pH 5,0, 5,5 en 6,0 natriumsuccinaat; voor pH 7,5, 8,0, 8,5 en 8,75 Tris-HCl; en voor pH 9,0 en hoger natriumglycinaat. Voor Ni-arginase werd kaliumfosfaat-buffer gebruikt bij pH 6,5, 7,0 en 7,5; voor de overige werd bij pH 6,5 en 7,0 natriumcacodylaat gebruikt. De pH-aktiviteitskrommen van 5 arginase-metaalkomplexen zijn in Figuur 8.1 afgebeeld. De specifieke aktiviteiten werden uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5. De pH-optima variëren sterk met het aktiverende metaalion; voor Mn-, Mg- en Fe-arginase liggen deze bij resp. pH 9,5, 10,0 en 8,5. Co-arginase heeft een ingewikkelde pH-aktiviteitskromme met een optimum bij pH 9,5 en een schouder van pH 7 tot pH 8,5. Het optimum van Ni-arginase ligt bij pH 7,0 in fosfaatbuffer. Deze arginase wordt door cacodylaat en door Tris-buffer geremd, hetgeen de twee-topigheid van de kromme verklaart. De aktiviteit neemt hij toenemende pH langzaam af. De omstandigheid dat de verschillende arginase-metaalkomplexen aan hun pH-aktiviteitskrommen zijn te onderscheiden, is van groot belang voor de identifikatie van de prosthetische groep van natuurlijke gistarginase.

8.3 NATIEVE GISTARGINASE

In celextrakten van bakkergist is, ook na gelfiltratie, arginase-aktiviteit aantoonbaar zonder dat aktiverende metaaljonen worden toegevoegd (natieve arginase). Omdat deze enzymaktiviteit door EDTA en door 8-hydroxyquinoline wordt geremd, moet ze van een meerwaardig kation afhankelijk zijn. Daar arginase-metaalkomplexen vrij stabiel zijn en moeilijk worden gevormd, is het waarschijnlijk dat natieve arginase identiek is aan de gistarginase zoals die in vivo voorkomt. De pH-aktiviteitskromme van natieve arginase is in Figuur 8.1 weergegeven. Deze kromme werd bepaald met celextrakten die bereid werden door bij een bakker gekochte gist met fosfaatbuffer pH 7,0 en glasparels te schudden (zie onder 2.4). De kromme vertoont een scherp optimum bij pH 10,5 en daarnaast een zwakkere aktiviteit die tussen pH 7 en 9 optimaal is. Ten opzichte van de specifieke aktiviteiten van in vitro bereide arginase-metaalkomplexen is de aktiviteit van deze natieve arginase erg klein. Hoewel redelijkerwijs verwacht mag worden dat natieve arginase aan één der arginase-metaalkomplexen van bekende samenstelling identiek is, blijkt uit de pH-aktiviteitskrommen geen enkele verwantschap.

Toevallig werd waargenomen dat natieve arginase door fosfaat wordt geremd. In celextrakten van bij een bakker gekochte gist, die met Tris-buffer pH 7,5 en glasparels werd geschud, was vooral de natieve arginase-aktiviteit bij pH 8,5 groter dan in met fosfaatbuffer bereide celextrakten. Omdat bakkergist zeer rijk aan fosfaat is, en verwacht mag worden dat daardoor de natieve arginase tijdens de bereiding van de celextrakten geïnaktiveerd wordt, werd fosfaat-arme gist aëroob gekweekt in glukose-pepton-medium, met 2 mM natriumglycerolfosfaat als enige fosfaatbron. De groeisnelheid en de opbrengst

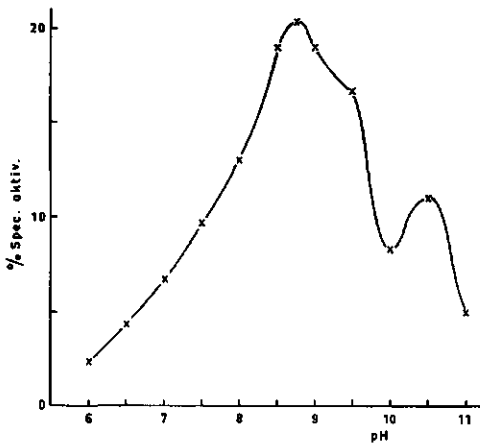


Fig. 8-2. pH-aktiviteitskromme van natieve arginase van fosfaat-arme gist. Gist werd aëroob gekweekt in glukose-pepton-glycerolfosfaat-medium. Voor bereiding van het celextrakt en bepaling van de enzymaktiviteit, zie tekst. De specifieke aktiviteiten werden uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5.

waren dezelfde als in normaal glukose-pepton-medium. In Figuur 8.2 is te zien dat de natieve arginase in celextrakten van fosfaat-arme gist veel aktiever is. De kromme vertoont een scherp optimum bij pH 8,75 en een ander optimum bij pH 10,5. In deze proef werd het celextrakt bereid door sonische desintegratie, in aanwezigheid van 1 % NaHCO_3 (zie onder 2.4). Het ruwe celextrakt werd onderworpen aan gelfiltratie over een kolom Sephadex G 25, die met 10 mM Tris-HCl pH 8,5 in evenwicht was gebracht. De inkubatietijd voor de enzymbepaling was 12 minuten. Bij langere inkubatietijden zijn de specifieke aktiviteiten bij ongunstige pH's relatief lager, waarschijnlijk wegens instabiliteit van het enzym.

Pogingen de natieve arginase te zuiveren, mislukten doordat de enzymaktiviteit niet bestand is tegen precipitatie met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ of koude acetone bij pH 8,5, indien geen der aktiverende metaalzouten wordt toegevoegd. Kennelijk is de gistarginase geen echt metallo-enzym volgens de criteria van VALLEE (1955). Deze auteur maakt onderscheid tussen metallo-enzymen en enzym-metaalkomplexen. De eerste zijn bestand tegen dialyse en fraktionering, de laatste zijn dissociabel. Gistarginase ligt in eigenschappen tussen beide groepen in.

Natieve gistarginase is slecht bestand tegen pH's die ver van de optimale af liggen. In de proef vermeld in Tabel 8.2 werd natieve arginase gedurende 30 minuten bij 30° bij verschillende pH's geïnkubeerd en daarna bij pH 8,5 bepaald. Duidelijk is te zien dat de enzymaktiviteit vooral bij een pH kleiner dan 8 sterk terugloopt. Het is daarom van groot belang dat tijdens de bereiding van celextrakten de pH omstreeks 8,5 blijft. De aanwezigheid van NaHCO_3 is daar voldoende waarborg voor.

De pH-aktiviteitskromme van natieve arginase (Figuur 8.2) van fosfaat-arme gist lijkt meer op die van Fe-arginase dan op die der andere arginase-metaalkomplexen (Figuur 8.1). Beide vertonen optima bij pH 8,5 tot 8,75. Natieve arginase bezit echter bovendien een piek bij pH 10,5 die bij Fe-arginase ontbreekt. Verder is bij hoge en lage pH de aktiviteit van Fe-arginase veel groter dan die van natieve arginase. Omdat werd vermoed dat dit zijn oorzaak zou

TABEL 8.2. Stabiliteit van natieve arginase.

Een celextrakt van fosfaat-arme gist werd gedurende 30 minuten bij 30° geïnkubeerd in aanwezigheid van 20 mM buffer. Daarna werd de specifieke activiteit van natieve arginase bepaald bij pH 8,5. De resultaten zijn uitgedrukt in enzyme-eenheden per ml celextrakt, en in % van de controle (onbehandeld celextrakt).

pH	Buffer	Eenheden per ml	% Aktiviteit
6,0	Succinaat	400	21
7,0	Cacodylaat	1360	71,5
8,0	Tris	1730	91
8,5	Tris	1900	100
9,0	Glycinaat	1770	93
10,0	Glycinaat	1820	96
11,0	Glycinaat	1520	80
Kontrole		1900	100

kunnen hebben in de bescherming van Fe-arginase bij ongunstige pH door de overmaat Fe^{2+} -ionen in de inkubatiemengsels, werd nagegaan welke invloed verwijdering van die overmaat op de vorm van de pH-aktiviteitskromme heeft. Gelfiltratie over een kolom Sephadex G 25, 10 mM Tris pH 8,5, bleek hiertoe niet geschikt, omdat de enzymaktiviteit verloren ging, vermoedelijk wegens adsorptie van het enzym aan in de kolom neergeslagen $Fe(OH)_2$. Als de Fe^{2+} -ionen onmiddellijk voor de gelfiltratie door natriumcitraat werden gebonden (200 μ mol per 100 μ mol $FeSO_4$), werd de Fe-arginase in bevredigende opbrengst van de kolom geëluëerd. De pH-aktiviteitskromme van dit preparaat (Figuur 8.3) vertoont sterke gelijkenis met die van natieve arginase (Figuur 8.2). Niet alleen is het optimum bij pH 8,5 veel scherper dan bij Fe-arginase (Figuur 8.1), ook de piek bij pH 10,5 treedt op. Deze gelijkenis in de pH-aktiviteitskrommen wijst erop dat Fe^{2+} -ionen in vivo de prosthetische groep van arginase zijn.

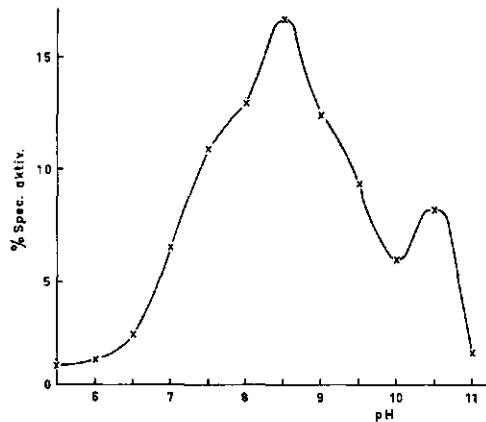


FIG. 8-3. pH-aktiviteitskromme van Fe-arginase, nadat de overmaat Fe^{2+} -ionen werd verwijderd. De specifieke aktiviteiten werden uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5.

8.4 INVLOED VAN REMSTOFFEN OP GISTARGINASE

Arginase wordt sterk geremd door verbindingen die meerwaardige kationen binden, zoals EDTA en 8-hydroxyquinoline. Ook natieve gistarginase wordt door deze verbindingen geïnactiveerd. De genoemde reagentia zijn onspecifiek; ze reageren met alle meerwaardige metaalionen. Er zijn evenwel ook reagentia die specifiek op bepaalde groepen kationen inwerken. Deze verbindingen kunnen van belang zijn voor opheldering van de aard van de kationen die deel uitmaken van natieve gistarginase.

In de proef vermeld in Tabel 8.3 werden natieve arginase en diverse arginase-metaalkomplexen van bekende samenstelling, alle uit hetzelfde celextract bereid, gedurende 30 minuten bij pH 7,5 blootgesteld aan de inwerking van verschillende kationbindende agentia (concentratie metaalzout 0,4 mM). Daarna werd de arginase-activiteit (μmol ureum uit arginine gevormd per uur per mg eiwit) bepaald (eindconcentratie aktiverend metaalzout 0,1 mM; Fe-, Co-, Ni- en natieve arginase in Tris-buffer pH 8,5; Mn- en Mg-arginase in glycinaatbuffer pH 9,5). Duidelijk is te zien dat arginase in alle vormen door een lage concentratie 8-hydroxyquinoline volledig wordt geremd. Natieve arginase wordt, evenals Fe-, Co- en Ni-arginase bovendien sterk door Na_2S en dimethylglyoxim geremd. Mn-arginase wordt door deze verbindingen zwak, en Mg-arginase in het geheel niet geremd. Verder zijn natieve en Fe-arginase de enige die voor remming door fosfaat gevoelig zijn. Dit is een verdere aanwijzing dat natieve en Fe-arginase gelijk zijn.

TABEL 8.3. Remming van gistarginase door kation-bindende agentia.

De proefomstandigheden werden in de tekst beschreven. De enzymactiviteit werd uitgedrukt als het aantal eenheden per mg eiwit.

Aktiverend kation:	Natief	Fe ²⁺	Co ²⁺	Ni ²⁺	Mn ²⁺	Mg ²⁺
Remstof						
Geen (kontrole)	14	18,5	22	16	110	9
1 mM 8-Hydroxyquinoline	0	0	0	0	0	0
0,4 mM Na ₂ S	0	0	0	0	75	8
4 mM Dimethylglyoxim	3	0	0	0	60	6
20 mM Kaliumfosfaat pH 7,5	3	1	22	16	110	9

8.5 KINETISCHE KONSTANTEN VAN GISTARGINASE

Voor de snelheid waarmee enzymreacties verlopen is de affiniteit van substraat tot enzym van groot belang. Een belangrijk onderdeel van het door een enzym gekatalyseerde proces bestaat immers uit het totstandkomen van een binding tussen substraat en enzym. Meestal wordt de affiniteit van substraat tot enzym uitgedrukt als de MICHAELIS-konstante (K_m). Deze is gelijk aan de substraat-koncentratie waarbij de snelheid van de door het enzym gekatalyseerde reactie de helft is van de maximale. Deze laatste wordt bij oneindig hoge substraatconcentratie, als het enzym volledig verzadigd is, bereikt.

Leverarginase wordt door ornithine kompetitief geremd (HUNTER en DOWNS,

1945). Het konkurreert met arginine om de actieve plaats op het enzymoppervlak. Deze remming van arginase door één der reactie-producten is stellig van belang voor de regulatie van de arginine-afbraak. De affiniteit van ornithine tot arginase wordt uitgedrukt als de dissociatie-konstante van het complex ornithine-arginase (K_{orn}).

De K_m en K_{orn} van alle werkzame arginase-metaalkomplexen van bekende samenstelling werden bij verschillende pH's bepaald, mede met de bedoeling uit de waargenomen waarden konklusies te trekken over de aard van het kation dat gistarginase in vivo aktiveert. De bereiding van de enzymoplossing werd uitgevoerd zoals boven beschreven is. De meting van de K_m geschiedde volgens de methode van LINEWEAVER en BURK (1934). Eenzelfde hoeveelheid enzym werd toegevoegd aan een serie buizen, waarin zich buffer en opklimmende hoeveelheden arginine bevonden. Na 1 uur bij 30° werd de reactie op de gebruikelijke wijze onderbroken en werd ureum bepaald. Elke arginine-koncentratie werd ten minste in drievoud ingezet. De bij elke substraat-koncentratie (s) behorende reaktiesnelheid (v) werd uitgerekend. Volgens de MICHAELIS-MENTEN-theorie, uitgewerkt door LINEWEAVER en BURK (1934) is het verband tussen v en s :

$$1/v = 1/V + K_m/s.V,$$

waarin V de maximale reaktiesnelheid is, die wordt bereikt bij oneindig grote s . Als $1/v$ tegen $1/s$ wordt uitgezet (Figuur 8.4) is K_m grafisch te berekenen. De rechte lijn door de punten snijdt de $1/s$ -as theoretisch bij $-1/K_m$.

Ten behoeve van de bepaling van K_{orn} werd parallel aan de serie voor de bepaling van K_m , een serie ingezet waaraan 5 mM L-ornithine werd toegevoegd. Ook van deze serie werd $1/v$ tegen $1/s$ uitgezet. Indien de remming zuiver kompetitief is, snijdt deze lijn de lijn van de K_m -bepaling in de $1/v$ -as; de $1/s$ -as wordt gesneden bij $-1/K_p$ (DIXON en WEBB, 1964). Uit K_p is K_{orn} te berekenen volgens de formule:

$$K_p = K_m(1 + i/K_{orn}),$$

waarin i de inhibitor-koncentratie, in dit geval dus 5 mM, is.

De gevonden waarden van K_m en K_{orn} zijn in Tabel 8.4 vermeld. In alle gevallen was de remming door ornithine van het zuiver kompetitieve type. Bij vier verschillende pH's zijn de konstanten voor Fe-arginase en voor natieve arginase binnen de fouten van de bepaling dezelfde. Bij pH 9,5 wijken ze dui-

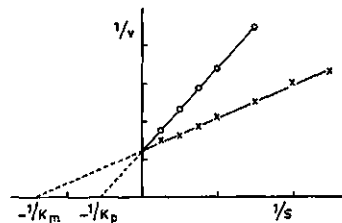


FIG. 8-4. Bepaling van de K_m en K_{orn} van arginase door grafisch uitzetten van $1/v$ tegen $1/s$ volgens LINEWEAVER en BURK (1934).

x—x, zonder ornithine; o—o, 5 mM ornithine.

TABEL 8.4. K_m en K_{orn} van gistarginase.

Aktiverend kation	pH	Buffer	K_m (mM)	K_{orn} (mM)
Co^{2+}	6,7	Fosfaat	6,0-7,0	2,7
Natief	7,0	Cacodylaat	4,3	1,5
Fe^{2+}	7,0	Cacodylaat	4,1-5,0	1,5-2,1
Co^{2+}	7,0	Cacodylaat	6,2	1,9
Natief	7,5	Tris	4,0	1,4
Fe^{2+}	7,5	Tris	4,0	1,2
Natief	8,5	Tris	3,3	0,8
Fe^{2+}	8,5	Tris	3,3	0,75
Natief	9,5	Glycinaat	4,3	1,6
Fe^{2+}	9,5	Glycinaat	3,3	1,5
Co^{2+}	9,5	Glycinaat	2,15	1,0
Ni^{2+}	9,5	Glycinaat	1,3-1,6	1,3-2,1
Mn^{2+}	9,5	Glycinaat	5,0-7,7	2,0
Mg^{2+}	9,5	Glycinaat	7,0-9,0	4,5

delijk af van die der andere arginase-metaalkomplexen. Bij pH 9,5 varieert de affiniteit van arginine tot arginase sterk met het aktiverende kation. De K_m neemt af in de volgorde: Mg-, Mn-, natieve en Fe-, Co- en Ni-arginase. De K_{orn} is ongeveer evenredig aan de K_m , nl. 25 tot 50% van de laatste. Arginase heeft dus grotere affiniteit tot ornithine dan tot arginine. Bij Fe- en natieve arginase valt op dat de K_m bij de optimale pH minimaal is. Eenzelfde waarneming werd door ROHOLT en GREENBERG (1956) gedaan aan met $MnCl_2$ geaktiveerde leverarginase. De gegevens van Tabel 8.4 bevestigen de konklusie over de gelijksoortigheid van natieve en Fe-arginase.

8.6 INVLOED VAN IJZER-DEFICIËNTIE OP NATIEVE GISTARGINASE

Onder de kweekomstandigheden die tot nu toe in dit onderzoek werden toegepast, blijken in vivo uitsluitend Fe^{2+} -ionen als prosthetische groep van gistarginase op te treden. De vraag doet zich voor of dit onder alle omstandigheden het geval is, met andere woorden: is het mogelijk dat ook andere in vitro aktiverende ionen in vivo als cofaktor van arginase kunnen funktioneren? In het bijzonder lijkt een rol van Mn^{2+} - en Co^{2+} -ionen in dit opzicht waarschijnlijk, wegens de grote specifieke aktiviteit van Mn-arginase en de relatief grote aktiviteit van Co-arginase in neutraal milieu. Het in vivo werkzaam zijn van Mg- en Ni-arginase is minder waarschijnlijk wegens het hoge pH-optimum en de grote K_m van de eerste en wegens het sporadisch voorkomen van Ni in levend materiaal. Kweekomstandigheden waarvan mag worden verwacht dat ze de vervanging van Fe^{2+} -ionen door Co^{2+} -of Mn^{2+} -ionen in vivo bevorderen, zijn Fe-deficiëntie en de aanwezigheid van groei-remmende hoeveelheden Co- of Mn-zouten. Omdat het gebruikelijke glukose-pepton-medium wegens zijn gekompliceerdheid moeilijk van Fe-zouten kan worden bevrijd, werd naar een eenvoudiger medium gezocht. De keuze viel op een medium met melkzuur als

C- en energiebron, L-glutaminezuur en L-arginine als N-bron en glycerolfosfaat als fosfaatbron. De overwegingen die tot deze keuze leidden, waren:

1. Melkzuur wordt door gist uitsluitend via aërobe processen afgebroken. Het beschikbare Fe zal daarom bij voorkeur voor de vorming van cytochromen worden verbruikt, en de Fe-behoefte van gist zal groter zijn dan in glukose-medium.

2. L-Arginine induceert arginase, zodat gemakkelijk celextrakten met hoge enzymactiviteit kunnen worden bereid. L-Glutaminezuur is een goede N-bron voor gist, die de inductie van arginase slechts weinig tegengaat (Tabel 4.13). In arginine-glutaminezuur-medium is gistarginase dus geïnduceerd, maar voor de N-voorziening niet essentieel. Ook als Co-en Mn-arginase in vivo niet in staat zijn arginine efficiënt af te breken, behoeft dit geen groeiremming tot gevolg te hebben.

3. Het gebruik van glycerolfosfaat voorkomt inaktivering van de natieve arginase tijdens de isolatie.

De samenstelling en de bereiding van het Fe-deficiënte kweekmedium werden onder 2.2.3 beschreven. De gistopbrengst in op deze wijze bereide porties medium, gemeten als droge stof na 48 uur groei bij 30°, varieerde van 30 tot 60% van die in hetzelfde medium, waaraan per liter 2 mg Fe (als FeSO₄) was toegevoegd. Voor de enzymproeven werd aan het Fe-deficiënte medium zoveel FeSO₄ toegevoegd dat de gistopbrengst 80% van die met overmaat Fe bedroeg. De totale concentratie Fe wordt dan geschat op 0,5 mg per liter.

Van dit medium werd 100 ml geënt met 1 ml van een 24-uur oude Fe-deficiënte cultuur. De cultuur werd gedurende 24 uur geschud bij 30° in een erlenmeyer van 1 liter, waarna de gist werd geoogst; het medium was dan nog niet uitgeput terwijl de pH in het algemeen lager was dan 5. De gistopbrengst bedroeg 1 tot 1½ g (vers gewogen) per 100 ml. De maximale opbrengst die werd bereikt na een kweektijd van 48 uur, was ongeveer 2 g per 100 ml. In aanwezigheid van groei-remmende concentraties Mn en Co (toegediend als MnSO₄·H₂O of CoCl₂·6H₂O pro analysi) waren kweektijden van 40 tot 48 uur noodzakelijk voor het bereiken van een gistopbrengst van 1,5 g per 100 ml.

De aard van de cofactor van natieve arginase in celextrakten van gist gekweekt in Fe-deficiënt medium werd nagegaan aan de hand van de pH-activiteitskromme. Ook werd nagegaan in hoeverre de natieve arginase gevoelig was voor remming door fosfaat (10 minuten bij 20° in 100 mM kaliumfosfaat pH 6,0, voordat het enzym bij pH 8,75 in Tris-buffer werd bepaald). Verder werd in de celextrakten op de eerder beschreven wijze de totale hoeveelheid arginase bepaald als Mn-arginase bij pH 9,5 in glycinaatbuffer.

De pH-activiteitskromme van natieve arginase van Fe-deficiënte gist is in Figuur 8.5a weergegeven. De kromme blijkt niet af te wijken van die van natieve arginase van fosfaat-arme gist met voldoende Fe (Figuur 8.2). Ook de remming door fosfaat en de verhouding tussen de specifieke activiteiten van totale arginase en natieve arginase zijn normaal (Tabel 8.5). Klaarblijkelijk is arginase, ook onder omstandigheden van gematigde Fe-deficiëntie, in gist uitsluitend als Fe-arginase aanwezig. Noch voor de aanwezigheid van andere arginase-metaal-

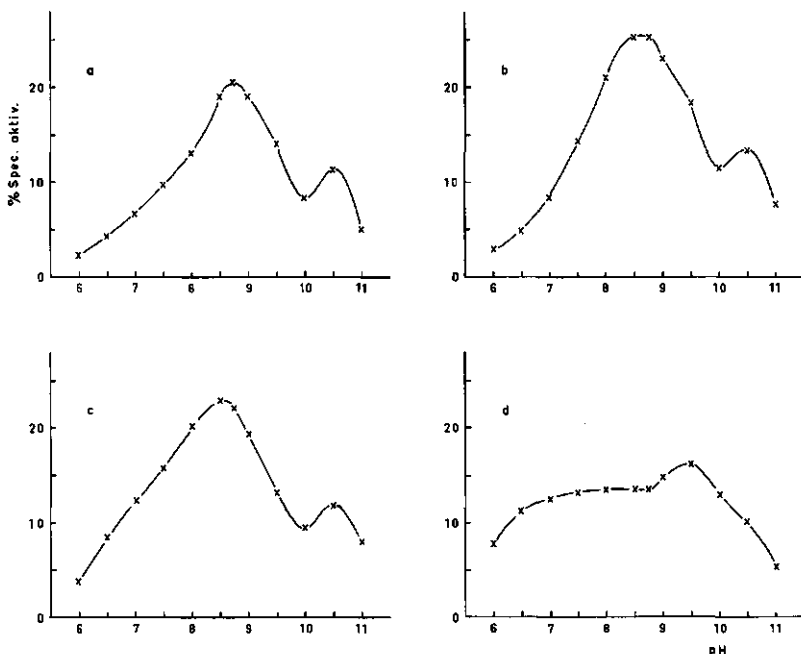


FIG. 8-5. pH-aktiviteitskrommen van natieve arginase van Fe-deficiënte gist. a. Fe-deficiënt; b. als a, 600 mg Mn (als MnSO_4) per liter; c. als a, 10 mg Co (als CoCl_2) per liter; d. als a, 40 mg Co (als CoCl_2) per liter. De specifieke aktiviteiten worden uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5.

complexen, noch voor die van ongebonden apo-arginase zijn aanwijzingen verkregen. Hetzelfde geldt indien aan het Fe-deficiënte medium 600 mg Mn per liter (als MnSO_4) of 10 mg Co per liter (als CoCl_2) worden toegevoegd (Figuur 8.5b en c; Tabel 8.5). Het is evenwel van groot belang dat de Mn-bevatende kultuur in een jong stadium wordt geoogst, zolang de pH kleiner dan 6,5 is. In oudere kultures sterven de cellen af (worden gemakkelijk door methyleenblauw gekleurd); de natieve arginase vertoont dan kenmerken van Mn-arginase.

Indien per liter Fe-deficiënt medium 40 mg Co wordt toegevoegd, is de pH-aktiviteitskromme van natieve arginase afwijkend (Figuur 8.5d). Ze vertoont de kenmerken die van een mengsel van Co- en Fe-arginase te verwachten zijn, namelijk een optimum bij pH 9,5 en een schouder bij pH 7 tot 9, hoger dan die in de kromme van Co-arginase (Figuur 8.1). Ook de betrekkelijke ongevoeligheid van deze natieve arginase voor fosfaat wijst op de aanwezigheid van Co^{2+} -ionen in het enzym (Tabel 8.5). Voorts moet ook ongebonden apo-arginase aanwezig zijn, omdat de verhouding tussen de specifieke aktiviteiten van totale arginase (als Mn-arginase bepaald) en natieve arginase veel groter dan 5 is (Tabel 8.5). Dit kan uit de incorporatie van Co^{2+} -ionen in natieve arginase niet worden verklaard, omdat de specifieke aktiviteiten van Co- en Fe-arginase bij pH 8,75 ongeveer gelijk zijn (Figuur 8.1). De aanwezigheid van ongebonden

TABEL 8.5. De arginase van gist gekweekt in media met wisselende minerale samenstelling.

De gist werd gekweekt in Fe-deficiënt melkzuur-arginine-glutaminezuur-glycerolfosfaat-medium, waaraan $MnSO_4$, $CoCl_2$ of $FeSO_4$ was toegevoegd. In celextrakten van deze gist werden specifieke arginase-activiteiten, de remming van native arginase door fosfaat, en de pH-activiteitskromme van native arginase (zie Figuur 8.5 en Figuur 8.6) bepaald.

Toevoeging aan Fe-deficiënt kweekmedium:	geen	600 mg Mn/l	10 mg Co/l	40 mg Co/l	2 mg Fe + 40 mg Co/l
Kweektijd (h)	24	48	40	48	36
Opbrengst (g gist/100 ml)	1,0	1,3	1,4	1,1	1,2
Totale arginase (spec. aktiv. Mn-arginase)	31	30	25,5	32	28
Natieve arginase (spec. aktiv. bij pH 8,75)	6,3	7,5	5,1	4,3	6,9
% Remming native arginase door fosfaat	85	83	80	59	70
Relatieve spec. aktiv. native arginase (% van totale arginase)	21	25	20	13,5	24,5

apo-arginase in de celextrakten wijst erop dat het primaire effect van Co-vergiftiging op de arginase remming van de inbouw van Fe^{2+} -ionen in dit enzym is. De vorming van apo-arginase door ontleding van Co-arginase tijdens de bereiding van het celextrakt, is onwaarschijnlijk, omdat laatstgenoemd complex meer bestand is tegen verwarming en tegen bewaren bij 5° dan Fe-arginase (ongepubliceerde waarnemingen). De aanwezigheid van Co-arginase in de celextrakten is waarschijnlijk een secundair effect. Gist hoopt veel Co uit het medium op; de celextrakten zijn zelfs rood gekleurd. Vorming van Co-arginase uit apo-arginase en $CoCl_2$ tijdens de bereiding van de celextrakten is daarom de meest waarschijnlijke verklaring.

Toevoeging van 40 mg Co per liter melkzuur-arginine-glutaminezuur-medium dat 2 mg Fe per liter bevat, heeft voor de native arginase van de in dat medium gekweekte gist veel minder gevolgen. De pH-activiteitskromme (Figuur 8.6) vertoont geen kenmerken van Co-arginase. Meer dan op die van na-

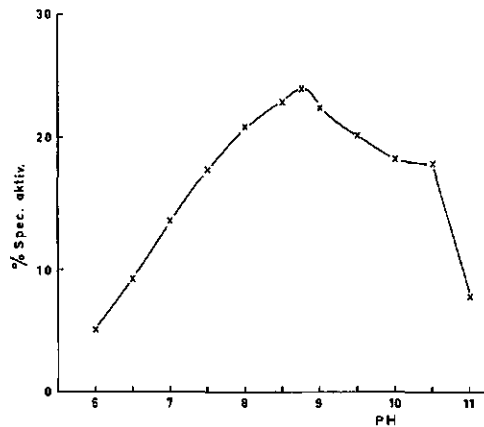


FIG. 8-6. pH-activiteitskromme van native arginase in gist gekweekt in aanwezigheid van 40 mg Co en 2 mg Fe per liter. De specifieke activiteiten werden uitgedrukt in % van die van Mn-arginase bij pH 9,5.

tieve arginase gelijk ze op die van Fe-arginase (Figuur 8.1). Mogelijk stabiliseren Co^{2+} -ionen de natieve arginase. Ook de remming door fosfaat en de verhouding tussen de specifieke aktiviteiten van totale arginase en natieve arginase zijn normaal (Tabel 8.5). De verstoring door Co^{2+} -ionen van de vorming van Fe-arginase in vivo treedt kennelijk slechts onder omstandigheden van Fe-deficiëntie op.

Als Co^{2+} -ionen inderdaad verhinderen dat arginase in vivo in de aktieve vorm wordt omgezet, mag worden verwacht dat CoCl_2 in Fe-deficiënt medium giftiger is naarmate de N-voorziening van de gist meer van de arginine-assimilatie afhankelijk is. Om dit te onderzoeken werden aan series kolfjes met Fe-deficiënt melkzuur-arginine-medium, met en zonder glutaminezuur, opklimmende hoeveelheden CoCl_2 toegevoegd (Tabel 8.6). Duidelijk is te zien dat CoCl_2 in medium zonder glutaminezuur, waarin arginine de enige N-bron is, veel giftiger is dan in medium met glutaminezuur. Deze waarneming is geheel in overeenstemming met de konklusie dat Co^{2+} -ionen in vivo de vorming van arginase remmen.

TABEL 8.6. Remming van de groei van *S. cerevisiae*, stam B door CoCl_2 in Fe-deficiënt melkzuur-arginine-medium met en zonder glutaminezuur.

Hoeveelheden van 10 ml medium werden geënt met 1 druppel van een 24-uur oude kultuur in Fe-deficiënt medium. Na 60 uur schudden bij 30° in een erlenmeyer van 100 ml werd het drooggewicht van de kultuur bepaald (mg per 10 ml).

Glutaminezuur-koncentratie		0	40 mM
Toevoeging:			
FeSO ₄ (mg Fe per l)	2	25,8	36,0
	0	21,6	30,0
CoCl ₂ (mg Co per l)	10	15,7	25,2
	20	11,1	25,9
	30	9,5	18,9
	40	3,2	15,2

8.7 DISKUSSIE

De resultaten die in dit hoofdstuk zijn vermeld, werden eerder gepubliceerd als korte mededeling (MIDDELHOVEN, 1965b) en als verslag (MIDDELHOVEN, 1965a). De identifikatie van de cofaktor van gistarginase in vivo, en de invloed van Fe-deficiëntie en Co- of Mn-vergiftiging op de eigenschappen van natieve arginase vormen de onderwerpen van andere publikaties (MIDDELHOVEN, 1969b; MIDDELHOVEN, DE WAARD en MULDER, 1969).

Gistarginase die van de natuurlijke cofaktor is bevrijd, blijkt in vitro uitsluitend werkzaam te zijn na aktivering door de tweewaardige kationen van Mn, Co, Fe, Ni of Mg. De bivalente kationen van Zn en Cd, die door EDL-BACHER en BAUR (1938) ook als cofaktor van gistarginase werden vermeld, bevorderen de werking van het enzym niet. Stimulering van arginase-aktiviteit

door Mg-ionen is nooit eerder waargenomen. Van de andere kationen is sinds lang bekend dat ze in vitro de werking van leverarginase (HELLERMAN en PERKINS, 1935; MOHAMMED en GREENBERG, 1945) en van *Canavalia*-arginase (STOCK PERKINS en HELLERMAN, 1938; ANDERSON, 1945) bevorderen. Gistarginase vormt met de activerende metaalionen tamelijk stabiele complexen, die dialyse en gefiltratie enige tijd weerstaan. De verschillende gistarginase-metaalkomplexen zijn naar de vorm van de pH-activiteitskromme te onderscheiden (Figuur 8.1); ook hun specifieke activiteiten lopen uiteen (Tabel 8.1). Deze eigenschappen maken de isolatie en nadere karakterisering van het in vivo werkzame arginase-metaalkomplex mogelijk.

De bereiding van celextrakten waarin zonder toevoeging van activerende metaalionen grote arginase-activiteit aantoonbaar is, gelukt slechts indien de fosfaat-koncentratie laag wordt gehouden. Deze enzymactiviteit wordt natieve arginase genoemd; ze wordt door fosfaat sterk geremd. Omdat gist veel anorganisch fosfaat ophoopt, is het noodzakelijk 2 mM glycerolfosfaat in plaats van 10 mM kaliumfosfaat als fosfaatbron aan het kweekmedium toe te voegen, indien de daarin gekweekte gist als uitgangsmateriaal voor de bestudering van natieve arginase dienst moet doen. Omdat arginase-metaalkomplexen slechts langzaam bij hoge concentraties metaalionen worden gevormd, is natieve arginase zeer waarschijnlijk identiek aan de in vivo werkzame gistarginase. Uitwisseling van metaalionen tijdens de bereiding der celextrakten is onwaarschijnlijk onder normale proefomstandigheden. Het identiek zijn van natieve gistarginase en in vitro bereide Fe-arginase blijkt uit de volgende waarnemingen:

1. De pH-activiteitskrommen vertonen grote gelijkenis, vooral indien uit de Fe-arginase-oplossing de overmaat Fe^{2+} -ionen wordt verwijderd (Figuur 8.2 en Figuur 8.3).
2. Beide worden door fosfaat geremd; Mn-, Mg-, Co- en Ni-arginase zijn ongevoelig voor fosfaat (Tabel 8.3).
3. De MICHAELIS-konstante (K_m) en de inhibitie-konstante voor ornithine (K_{orn}) stemmen bij 4 verschillende pH's overeen. Bij pH 9,5 wijken ze duidelijk af van die der overige arginase-metaalkomplexen (Tabel 8.4).
4. De specifieke activiteiten van natieve arginase, en van uit hetzelfde celextrakt in vitro bereide Fe-arginase zijn vrijwel even groot. Klaarblijkelijk is het overgrote deel van gistarginase in vivo in de vorm van Fe-arginase aanwezig.
5. Ook de natieve arginase van gist die in Fe-deficiënt medium in aanwezigheid van groei-remmende hoeveelheden MnCl_2 of CoCl_2 is gekweekt, vertoont de eigenschappen van Fe-arginase, ondanks het feit dat gist Mn- en Co-zouten ophoopt en dat deze dientengevolge tijdens de bereiding van de celextrakten in hogere concentratie aanwezig zijn dan Fe-zouten (Figuur 8.5 en Tabel 8.5).

De pH-activiteitskrommen van natieve arginase en van in vitro bereide Fe-arginase waaruit de overmaat Fe^{2+} -ionen werd verwijderd, vertonen twee maxima: één bij pH 8,5 en één bij pH 10,5 (Figuur 8.2 en Figuur 8.3). De eerste activiteit is de grootste. De tweede is weinig actief, maar betrekkelijk ongevoelig voor remming door fosfaat, gezien het feit dat in de pH-activiteitskromme van fosfaat-rijke bakkersgist (Figuur 8.1) de piek bij pH 10,5 overheerst. De

natieve arginase-activiteit bij pH 10,5 lijkt fysiologisch van weinig belang te zijn, wegens het hoge pH-optimum en de geringe specifieke activiteit. Ze moet vermoedelijk ook aan Fe-arginase worden toegeschreven; de mogelijkheid is niet uitgesloten dat ze bij een andere apoarginase behoort.

Onverschillig door welk metaalion gistarginase wordt geactiveerd, of bij welke pH het remmingstype wordt nagegaan, blijkt ornithine het enzym competitief ten opzichte van arginine te remmen. Evenals de K_m varieert de K_{orn} met de proefomstandigheden. Steeds is de K_{orn} ongeveer 25 tot 50% van de K_m (Tabel 8.4). Ornithine heeft dus grotere affiniteit tot gistarginase dan arginine. De remming van het enzym door één der reactie-produkten is stellig van groot belang voor de regulatie van de arginine-afbraak in gist. In Hoofdstuk 7 werd hier reeds aandacht aan besteed.

Door MORA, TARRAB en BOJALIL (1966) werd een vergelijkende studie gemaakt van de leverarginases van uricotelische (kippen) en ureotelische (ratten) dieren. Zij vonden dat kipeleverarginase van ratteleverarginase is te onderscheiden onder meer door een hoger moleculair gewicht, grotere gevoeligheid voor remming door p-chloormercuribenzoaat en α -aminoboterzuur, en vooral door een veel grotere K_m (100–200 mM, resp. 10–20 mM). De enzymen stemden overeen in pH-optimum en in het feit dat beide Mn^{2+} -ionen nodig hebben voor volledige ontplooiing van hun werkzaamheid. Verder remt ornithine kipeleverarginase zuiver competitief en ratteleverarginase zowel competitief als niet-competitief. Merkwaardig genoeg vonden MORA c.s. (1966) dat de arginase van *Neurospora crassa* in al deze eigenschappen met die van kipelever overeenstemt. Hoeveel in het hier beschreven onderzoek over gistarginase niet al deze eigenschappen werden bestudeerd, mag op grond van de K_m -waarde (Mn-arginase pH 9,5) van 5,0 tot 7,7 mM grotere verwantschap met ratte- en runderleverarginase dan met kipeleverarginase worden veronderstelt. De K_m van runderleverarginase is lager dan die van ratteleverarginase. Bij pH 9,5 werden waarden van 5,75 mM (BACH en WHITEHOUSE, 1954) en ongeveer 3,8 mM (ROHOLT en GREENBERG, 1956) waargenomen. Overigens zijn er geen aanwijzingen verkregen dat de remming van gistarginase door ornithine van gemengd type zou zijn; ze werd daarom als zuiver competitief beschouwd. Geheel in overeenstemming met de resultaten van ROHOLT en GREENBERG (1956) met Mn-runderleverarginase, is de waarneming dat de K_m van Fe-gistarginase bij de optimale pH minimaal is, en zowel bij hogere als bij lagere pH toeneemt.

Een matige Fe-deficiëntie van de gist heeft geen invloed op de natieve arginase. Er werden geen aanwijzingen verkregen dat onder die omstandigheden andere metaalionen in arginase worden ingebouwd, of dat zich dan ongebonden apo-arginase in de cel bevindt. Dezelfde waarnemingen werden gedaan als gist in Fe-deficiënt medium met groei-remmende concentraties $MnCl_2$ (tot 600 mg Mn per l) of zwak groei-remmende hoeveelheden $CoCl_2$ (tot 10 mg Co per l) werd gekweekt (Figuur 8.5a, b, c en Tabel 8.5). Evenzo na toevoeging van 40 mg Co (als $CoCl_2$) aan kweekmedium dat overmaat Fe (2 mg Fe per l) bevatte (Figuur 8.6 en Tabel 8.5). Alleen na toevoeging van 40 mg Co per liter

Fe-deficiënt medium werd waargenomen dat de natieve arginase van de daarin gekweekte gist voor een deel uit ongebonden apo-arginase bestaat en daarnaast Co-arginase bevat (Figuur 8.5d en Tabel 8.5). Omdat Co-arginase stabiel is dan in vitro bereide Fe-arginase, zowel bij verwarming als na bewaren bij pH 7,5 bij 5°, moet worden aangenomen dat de ongebonden apo-arginase niet door dissociatie van Co-arginase is ontstaan, maar veeleer dat Co-arginase spontaan tijdens de bereiding van het celextrakt uit apo-arginase en Co^{2+} -zouten is gevormd. Het primaire effect van Co-vergiftiging op de arginase zou dan een remming zijn van de incorporatie van Fe^{2+} -ionen. Deze zienswijze is in overeenstemming met waarnemingen over het mechanisme van Co-vergiftiging bij *Neurospora*. Door HEALY, CHANG en MCELROY (1955) werd waargenomen dat Co-vergiftiging bij deze schimmel verschijnselen teweegbrengt die lijken op Fe-deficiëntie. PADMANABAN en SARMA (1966) toonden aan dat in aanwezigheid van hoge Co-koncentraties door *Neurospora* Fe^{2+} -ionen goed worden opgenomen, maar dat deze niet in katalase en in andere haem-eiwitten worden ingebouwd. Bovendien wordt de uitscheiding van verbindingen die de opneming van Fe vergemakkelijken (siderochroom) door Co^{2+} bevorderd.

Door CURDEL (1966) werd gepoogd het Zn dat in gist als prosthetische groep deel uitmaakt van D-melkzuur-dehydrogenase, in vivo te vervangen door Co. Het bivalente kation van dit metaal kan in vitro Zn vervangen zonder verlies van enzymaktiviteit. Na kweken van gist in Zn-deficiënt medium met overmaat Co slaagde Curdel er inderdaad in, Co-bevattende melkzuur-dehydrogenase aan te tonen. Deze verschilde echter van in vitro bereid Co-enzym. De resultaten van het hier beschreven onderzoek wijzen erop dat de relatie van gist-arginase en Fe^{2+} in vivo meer specifiek is dan die tussen melkzuur-dehydrogenase en zijn metallische prosthetische groep.

8.8 SAMENVATTING

1. Gistarginase bevrijd van de natuurlijke cofactor, is in vitro uitsluitend werkzaam na activering door de tweewaardige kationen van Mn, Co, Fe, Ni of Mg.
2. De diverse in vitro bereide arginase-metaalkomplexen zijn te onderscheiden naar de vorm van de pH-aktiviteitskromme, de specifieke activiteit, de MICHAELIS-konstante, de inhibitie-konstante voor ornithine en de gevoeligheid voor kation-bindende agentia.
3. Celextrakten waarin zonder toevoeging van aktiverende kationen hoge arginase-aktiviteit aantoonbaar is (natieve arginase) kunnen worden bereid uit gist die in fosfaat-arm medium werd gekweekt.
4. Tot het gelijk zijn van natieve arginase en Fe-arginase wordt besloten op grond van een vergaande overeenkomst in alle onder 2. genoemde eigenschappen.
5. Natieve arginase moet identiek zijn aan in vivo voorkomende arginase omdat onder gunstige omstandigheden isolatie in de hoogst mogelijke opbrengst slaagt. De vorming van Fe-arginase tijdens de bereiding van celextrakt-

ten is onwaarschijnlijk, omdat voor een dergelijke reactie hoge Fe^{2+} -concentraties en lange inkubatietijden nodig zijn.

6. Ornithine is een sterke, competitieve remstof voor alle bestudeerde arginase-metaalkomplexen.
7. Fe^{2+} in natieve arginase wordt in vivo niet door andere kationen vervangen onder omstandigheden van gematigde Fe-deficiëntie of in aanwezigheid van groei-remmende concentraties MnCl_2 of CoCl_2 . Alleen na groei in media met een extreme $\text{Co}^{2+}/\text{Fe}^{2+}$ -verhouding zijn in de celextrakten beduidende hoeveelheden ongebonden apo-arginase en Co-arginase aantoonbaar.
8. In overeenstemming met laatstgenoemde waarneming is de grotere giftigheid van CoCl_2 in Fe-deficiënt melkzuur-arginine-medium, vergeleken met die in melkzuur-arginine-glutaminezuur-medium.

ALGEMENE DISKUSSIE EN SAMENVATTING

9.1 DE ARGININE-AFBRAAKWEG IN GIST

De afbraak van arginine tot glutaminezuur verloopt in bakkersgist met ornithine en Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat als tussenprodukten (MIDDELHOVEN, 1964). Arginase en ornithine-transaminase (OTA) zijn hierbij als enzymen betrokken. Ornithine en ureum worden in equimolaire hoeveelheden uit arginine gevormd. Door transaminering van ornithine wordt Δ^1 -pyrroline-5-carboxylaat gevormd (Schema 1). Het laatste wordt door dehydrogenering tot glutaminezuur omgezet (BECHET en WIAME, 1964). Arginase werd in gist reeds eerder aangetoond door EDLBACHER en BAUR (1938), OTA door SCHER en VOGEL (1957). Het betrokken zijn van beide enzymen bij de afbraak van arginine wordt bewezen door de induceerbaarheid van arginase en, in het bijzonder, van OTA door arginine (Tabel 3.1; Figuur 4.2). De arginase-weg is ook aangetoond in *Bacillus subtilis* (DEHAUWER, LAVALLÉ en WIAME, 1964), *Bacillus licheniformis* (RAMALEY en BERNLOHR, 1966) en *Neurospora crassa* (CASTAÑEDA, MARTUSCELLI en MORA, 1967).

In tegenstelling tot waarnemingen van ROCHE en LACOMBE (1952) kon in gist geen arginine-deïminase worden aangetoond. Ook onder omstandigheden die door deze auteurs worden aangegeven, wordt arginine blijkbaar uitsluitend tot ornithine en ureum omgezet.

De wijze waarop ureum door gist wordt afgebroken is onopgehelderd. Bakkersgist bevat geen urease.

9.2 EIGENSCHAPPEN VAN GISTARGINASE

Bij pogingen de eerste stap der arginine-afbraak in gist op te helderen, werden celextrakten met arginine geïnkubeerd zowel onder omstandigheden die door EDLBACHER en BAUR (1938) werden voorgeschreven voor het aantonen van arginase (pH 9,5 na toevoeging van $MnCl_2$), als onder omstandigheden door ROCHE en LACOMBE (1952) voorgeschreven voor het aantonen van arginine-deïminase (pH 6,5 na toevoeging van $CoCl_2$). Onder beide omstandigheden bleek arginine kwantitatief tot ornithine en ureum te worden omgezet. De verhouding tussen de specifieke arginase-aktiviteiten, bepaald volgens beide methoden, is konstant (Tabel 3.1). Op grond van deze waarneming, en op grond van het falen van gebruikelijke technieken voor enzymfraktionering beide aktiviteiten te scheiden, werd gekonkludeerd dat beide arginase-aktiviteiten bij één enzymeiwit behoren.

Evenals leverarginase (HELLERMAN en PERKINS, 1935; MOHAMMED en GREENBERG, 1945) en *Canavalia*-arginase (STOCK, PERKINS en HELLERMAN, 1938;

ANDERSON, 1945) wordt gistarginase in vitro door de tweewaardige kationen van Mn, Co, Fe en Ni gestimuleerd. Bovendien kunnen Mg-ionen als werkzame prosthatische groep van gistarginase optreden; deze functie van Mg-ionen werd nooit eerder vermeld. Arginase-metaalkomplexen zijn tamelijk stabiel; ze zijn enige tijd bestand tegen dialyse en gelfiltratie. Onderling verschillen ze sterk in eigenschappen (MIDDELHOVEN, 1969b), zoals de vorm van de pH-aktiviteitskromme (Figuur 8.1), de specifieke activiteit (Tabel 8.1), de gevoeligheid voor kation-bindende agentia (Tabel 8.3), de MICHAELIS-konstante en de inhibitiekonstante voor ornithine (Tabel 8.4).

Uit fosfaat-arme gist kunnen celextrakten worden bereid die zonder toevoeging van activerende metaalionen grote arginase-aktiviteit bezitten. De pH-aktiviteitskromme (Figuur 8.2) van deze natieve arginase lijkt sterk op die van een Fe-arginase-preparaat waaruit de overmaat Fe^{2+} -zouten was verwijderd (Figuur 8.3). Ook in andere eigenschappen komt dit enzym met Fe-arginase overeen (Tabel 8.3; Tabel 8.4; MIDDELHOVEN, 1965a, 1965b, 1969b). Zelfs natieve arginase van Fe-deficiëntie gist die in aanwezigheid van groei-remmende concentraties $CoCl_2$ en $MnCl_2$ werd gekweekt (Figuur 8.5; Figuur 8.6; Tabel 8.5; MIDDELHOVEN, DE WAARD en MULDER, 1969) vertoont alle eigenschappen van Fe-arginase tenzij de verhouding tussen de concentraties van $CoCl_2$ en van Fe^{2+} -zouten zeer hoog is. In dat geval bevat de natieve arginase naast Fe-arginase ook veel ongebonden apo-enzym en Co-arginase (Figuur 8.5; Figuur 8.6; Tabel 8.5).

De konklusie dat Fe^{2+} -ionen in vivo de prosthatische groep van gistarginase zijn, is in tegenspraak met de algemeen gangbare mening. Sinds de waarneming werd gedaan dat Mn-deficiëntie van proefdieren verminderde leverarginase-aktiviteit tot gevolg heeft (BOYER, SHAW en PHILLIPS, 1942; SHILS en MCCOLLUM, 1943; SMITH en ELLIS, 1947) wordt algemeen aangenomen dat Mn^{2+} -ionen in vivo de enige prosthatische groep van arginase zijn. Ook het feit dat in vitro Mn-arginase aktiever en stabiel is dan andere arginase-metaalkomplexen wordt als bewijsmateriaal beschouwd dat Mn^{2+} -ionen arginase in vivo aktiveren. Ook gistarginase vertoont na aktivering door Mn^{2+} -zouten de grootste aktiviteit en stabiliteit (Tabel 8.1). Om deze reden werd ook in dit onderzoek arginase in de celextrakten bepaald na aktivering door $MnCl_2$. Een mogelijke oorzaak van de slechte aktivering van leverarginase door Fe^{2+} in vitro (EDLBACHER en ZELLER, 1936; RICHARDS en HELLERMAN, 1940) kan het gebruik van fosfaat-buffers zijn, waardoor natieve en Fe-gistarginase in tegenstelling tot de overige arginase-metaalkomplexen sterk worden geremd (Tabel 8.3).

De pH-aktiviteitskromme van natieve gistarginase (Figuur 8.2) vertoont twee maxima, één bij pH 8,5 en één bij pH 10,5. De aktiviteit van het laatste is gering, maar is meer bestand tegen remming door fosfaat (Figuur 8.1). Zij moet eveneens aan een Fe-arginase worden toegeschreven (Figuur 8.3), en behoort mogelijk bij een apo-arginase verschillend van die bij het maximum van pH 8,5 behoort. Wegens het extreme pH-optimum en de relatief geringe specifieke aktiviteit is het fysiologisch belang twijfelachtig. Er werd daarom verder geen aandacht aan besteed.

9.3 REGULATIE VAN DE ARGININE-AFBRAAK DOOR ENZYMRemming

Alle werkzame metaalkomplexen van gistarginase worden door ornithine sterk kompetitief geremd (Tabel 8.4). De MICHAELIS-konstante van natieve en Fe-arginase bij de optimale pH 8,5 bedraagt 3,3 mM. De inhibitie-konstante voor ornithine is onder die omstandigheden 0,75 to 0,80 mM. Ornithine heeft dus een veel grotere affiniteit tot het enzym dan arginine. Dit verschijnsel is duidelijk van groot belang voor de regulatie van de arginine-afbraak in gist. De voorraad arginine wordt zo tegen afbraak beschermd, indien de verwerking van ornithine stagneert.

Het andere reactie-produkt van arginase, ureum, heeft geen remmende werking op het enzym (Tabel 7.3), evenmin als N-verbindingen die als eindprodukten van de arginine-afbraakweg zijn te beschouwen, zoals NH_4Cl , glutaminezuur, glutamine, asparagine en proline (Tabel 7.1). Wel wordt gistarginase door betrekkelijk lage concentraties lysine, asparaginezuur, α -aminoboterzuur, valine, leucine en isoleucine geremd (Tabel 7.1). Ook deze remmingen zijn mogelijk van belang voor de regulatie. De waargenomen remming van gistarginase door aminozuren stemt goed overeen met waarnemingen van HUNTER en DOWNS (1945) bij runderleverarginase.

Ook OTA wordt door sommige aminozuren geremd, vooral door mercapto-aminozuren (homocysteïne en cysteïne), door histidine en door valine, leucine en isoleucine die ook arginase remmen; OTA wordt door lysine gestimuleerd (Tabel 7.2).

9.4 INDUKTIE VAN ARGINASE EN OTA DOOR ARGININE

De inductie van enzymen van de arginine-afbraakweg door arginine en ornithine blijkt uit de waarneming dat de specifieke enzymactiviteiten in gist groter zijn bij kweken in media die arginine, ornithine of pepton bevatten (Tabellen 3.1, 3.2, 4.13 en 6.3; MIDDELHOVEN, 1964), dan in media met $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabel 3.1; Tabel 3.2) of een enkel aminozuur (Tabel 4.10) als enige N-bron. Bovendien blijkt deze inductie uit de snelle enzym synthese die optreedt wanneer in glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium gekweekte gist naar glukose-arginine-medium wordt overgebracht (Figuur 4.2).

De vraag of arginase en OTA door arginine, ornithine of een derivaat van deze aminozuren worden geïnduceerd, kan niet met zekerheid worden beantwoord, zolang geen arginase-negatieve gistmutanten beschikbaar zijn. De sterkere inductie van OTA door arginine, vergeleken met die door ornithine (Tabel 3.1; MIDDELHOVEN, 1964) zou erop kunnen wijzen dat arginine zelf de inductor is, ware het niet dat arginine door gist sneller wordt opgenomen dan ornithine, zodat bij groei met arginine de inwendige ornithine-koncentratie hoger kan zijn dan bij groei met ornithine.

9.5 KATABOLIET-REPRESSIE EN INAKTIVERINGSREPRESSIE

Hoewel de C- en energiebron duidelijk invloed heeft op de specifieke activiteiten, blijken arginase en OTA in aanwezigheid van zeer verschillende C-bronnen door arginine te worden geïnduceerd (Tabel 3.2). In het geval dat in aanwezigheid van een C-bron de inductie door arginine zwak is, blijkt de opnemng van arginine sterk verminderd (Tabel 3.2; MIDDELHOVEN, 1969a). Omdat C-bronnen die in $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ -medium de grootste represserende werking lijken uit te oefenen, de inductie door arginine niet tegengaan (Tabel 3.2), mag de beïnvloeding van de specifieke activiteiten door de C-bron niet aan kataboliet-repressie worden toegeschreven. Regulatie van de vorming van arginase en OTA door kataboliet-repressie is temeer onwaarschijnlijk omdat tijdens stikstof-uitputting, wanneer de omstandigheden ideaal zijn voor kataboliet-repressie wegens de te verwachten ophoping van katabolieten in gist, juist sterke derepressie van beide enzymen optreedt (Figuur 4.1; MIDDELHOVEN, 1968). Ook indien gist aan inositol-gebrek lijdt, treedt derepressie van arginase en OTA op (Tabellen 4.9, 5.1 en 5.3; Figuur 5.2; MIDDELHOVEN, 1969c).

Arginase en OTA zijn, in tegenstelling tot vele andere gistenzymen, niet onderworpen aan inaktiveringsrepressie. Dit blijkt uit het feit dat de totale hoeveelheden van deze enzymen gedurende twee generatietijden niet verminderen indien gist van glukose-pepton-medium wordt overgebracht naar glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium (Tabel 7.4; MIDDELHOVEN, 1969a).

Door het ontbreken van repressie door katabolieten van de C-bron wijkt de regulatie van de vorming van arginase en OTA in gist sterk af van die in andere organismen. In *Bacillus licheniformis* worden alle 3 enzymen van de arginase-weg sterk door glukose en glycerol gerepresseerd (LAISHLEY en BERNLOHR, 1966, 1968) en door arginine geïnduceerd. Ze worden gederepresseerd indien in een arginine-vrije kultuur de C-bron opraakt en de spore-vorming begint (RAMALEY en BERNLOHR, 1966). In CHANG's levercellen wordt de inductie van arginase door arginine tegengegaan door hoge concentraties glukose of succinaat (ELIASSON, 1965); verder wordt het enzym gerepresseerd door produkten van de arginine-afbraak en hun derivaten, vooral door proline (ELIASSON en STRECKER, 1966; ELIASSON, 1967).

9.6 REPRESSIE VAN ARGINASE EN OTA DOOR STIKSTOF-VERBINDINGEN EN MYO-INOSITOL

De inductie van arginase en OTA door arginine in gist wordt tegengegaan door N-verbindingen in plaats van door katabolieten van de C-bron. Dit blijkt uit de sterk verlaagde specifieke activiteiten indien gistkultures die arginine als N-bron bevatten, tevens $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Tabel 3.1) of goed assimileerbare aminozuren (Tabel 4.13) ontvangen. Verder blijkt dit uit een studie van de toeneming der specifieke activiteiten onder omstandigheden van stikstof- of vitamine-gebrek.

Indien een gistkultuur wordt overgebracht naar een medium zonder N-verbindingen nemen de specifieke activiteiten van arginase en OTA snel toe, even

snel en in dezelfde mate als wanneer gist in medium met arginine als enige N-bron wordt gesuspenseerd (Figuur 4.2). Deze ongeïnduceerde toeneming der specifieke activiteiten (derepressie) wordt verklaard door de veronderstelling dat de repressie door N-verbindingen wegvalt als gevolg van de N-deficiëntie. De volgende waarnemingen hebben geleid tot de konklusie dat arginase en OTA door N-verbindingen in samenwerking met myo-inositol worden gerepresseerd (MIDDELHOVEN, 1965a, 1967, 1968, 1969c, 1970):

1. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting is een enzymsynthese de novo. Dit blijkt uit het feit dat cycloheximide de toeneming der specifieke enzymactiviteiten onmiddellijk en volledig remt (Figuur 4.1), terwijl het verschijnsel afhankelijk is van de energievoorziening van de gist (Tabel 4.1; Tabel 4.2).
2. Ongeïnduceerde toeneming der specifieke enzymactiviteiten wordt uitsluitend waargenomen onder omstandigheden van stikstof- of inositol-deficiëntie (Tabellen 4.9, 5.1 en 5.3; Figuur 5.2). Gebrek aan fosfaat, magnesium of sulfaat heeft geen derepressie tot gevolg (Tabel 4.9; Tabel 5.3). Stilstand van de groei en ophoping van metabolieten zijn klaarblijkelijk geen voldoende voorwaarden voor derepressie.
3. Derepressie tijdens N-uitputting treedt op onverschillig met welke C- en energiebron (Tabel 4.7) of N-bron (Tabel 4.10) de gist werd gekweekt. De enige voorwaarde is dat het kweekmedium geen arginine bevat; anders blijft derepressie uit (Tabel 6.3).
4. De derepressie tijdens N-uitputting wordt niet beïnvloed door de aard van de C-bron in het medium waarin de N-uitputting wordt uitgevoerd, mits deze onmiddellijk assimileerbaar is (Tabel 4.8). Deze derepressie mag daarom niet aan eventuele inductie door zich ophopende katabolieten van de C-bron worden toegeschreven.
5. De derepressie tijdens N-uitputting wordt sterk geremd door de meeste als enige N-bron geschikte N-verbindingen (Tabel 4.11) en door enkele niet-giftige N-verbindingen (Tabel 4.12), die niet als enige N-bron geschikt zijn. Toevoeging van deze verbindingen op een tijdstip dat de derepressie in volle gang is, heeft binnen 10 minuten volledige remming van de enzymsynthese tot gevolg (Figuur 4.3).
6. Gebrek aan myo-inositol heeft, in tegenstelling tot gebrek aan andere voorstam B essentiële vitamines, duidelijke derepressie tot gevolg (Tabel 5.1; Figuur 5.2). Toevoeging van uitsluitend myo-inositol aan een gistsuspensie in vitamine-vrij glukose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -medium is voldoende om deze derepressie te verhinderen (Tabel 5.1).
7. Ook in glukose-media met glutaminezuur, alanine of asparagine als N-bron heeft inositol-deficiëntie derepressie tot gevolg (Tabel 5.3). Deze treedt op gelijktijdig met het ophouden van de exponentiële groei (Figuur 5.2).
8. De inductie van arginase door arginine wordt slechts door zeer goed assimileerbare N-bronnen gedeeltelijk tegengegaan; die van OTA ook door minder goed assimileerbare N-bronnen, waaronder het niet als enige N-bron geschikte glycine (Tabel 4.13).

De aard van de represserende N-verbindingen is niet precies bekend. Waarschijnlijk is een groep N-verbindingen van betrekkelijk eenvoudige chemische structuur tot repressie van arginase en OTA in staat. Onder deze groep vallen goed assimileerbare N-bronnen (NH_4 -zouten, alanine, asparaginezuur en asparagine) of hun stofwisselingsprodukten, en enkele niet als enige N-bron geschikte N-verbindingen (glycine, β -alanine en β -aminoboterzuur). Glutaminezuur behoort hier zeer waarschijnlijk niet bij, daar het de inductie door arginine relatief slechts weinig tegengaat (Tabel 4.13).

De repressie door N-verbindingen kan worden opgeheven door toediening van arginine en onder omstandigheden van N-gebrek. Arginine induceert beide enzymen zeer sterk; de inductie wordt zelfs door zeer goed assimileerbare N-bronnen slechts ten dele opgeheven (Tabel 4.13). Omdat behalve N-gebrek, ook inositol-deficiëntie derepressie tot gevolg heeft, zulks in tegenstelling tot gebrek aan andere essentiële vitaminen en nutriënten, moet worden aangenomen dat ook myo-inositol een rol speelt bij de regulatie van de vorming van arginase en OTA in gist. De onderzochte stam B heeft, in tegenstelling tot de meeste andere stammen van *S. cerevisiae* en *S. carlsbergensis*, myo-inositol voor zijn groei nodig (Tabel 5.2). De repressie van arginase en OTA door NH_4 -zouten en andere assimileerbare N-bronnen is van myo-inositol afhankelijk (Tabel 5.3; Figuur 5.2). De derepressie ten gevolge van inositol-gebrek is veel geringer dan die tijdens N-uitputting, terwijl beide derepressies niet additief zijn indien men gist zowel aan N-uitputting als aan vitamine-uitputting blootstelt (Tabel 4.9). Het is niet duidelijk of myo-inositol of zijn derivaten zelf co-repressors zijn, of dat ze een rol spelen bij de vorming van de apo-repressor of bij de binding van co-repressors aan de apo-repressor.

9.7 MECHANISME VAN DE REGULATIE DER ENZYMFORMING

Arginase en OTA worden, onder zeer verschillende omstandigheden, gelijktijdig geïnduceerd of gerepresseerd. De regulatie-mechanismen voor de vorming van beide enzymen zijn klaarblijkelijk in grote trekken gelijk, maar onafhankelijk van elkaar. De verhouding tussen de specifieke enzymactiviteiten varieert immers sterk, vooral doordat OTA gevoeliger is voor repressie door N-verbindingen dan arginase. Beide structurele genen bevinden zich daarom waarschijnlijk niet in één operon, maar liggen verspreid in het genoom van de gist.

De repressie van arginase en OTA vindt vermoedelijk plaats op translatie-niveau, dat wil zeggen: niet de vorming van boodschapper-RNA, maar de vorming van enzym-polypeptide wordt door N-verbindingen geremd. De derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting verloopt vermoedelijk dank zij reeds in de gist aanwezig boodschapper-RNA. Synthese van het laatste tijdens N-uitputting is niet noodzakelijk. Met arginase en OTA overeenkomend boodschapper-RNA moet, wil het voorgestelde model geldig zijn, tijdens enzymsynthese door verbruik snel geïnactiveerd worden, maar in rustende cellen waarin geen arginase en OTA worden gesynthetiseerd, uitermate stabiel zijn. Helaas konden voor dit model geen rechtstreekse aanwijzingen worden verkregen. Po-

gingen het al of niet noodzakelijk zijn van boodschapper-RNA-synthese voor de derepressie met behulp van adenine- en uracil-analogen na te gaan, mislukten (Tabel 6.2), omdat bleek dat deze anti-metabolieten pas enkele uren na hun toevoeging de groei van gist remmen.

Een aanwijzing voor de veronderstelde repressie door N-verbindingen op translatie-niveau is vooral de waarneming dat toediening van deze verbindingen de derepressie tijdens N-uitputting binnen 10 minuten doet ophouden (Fig. 4.3). Zou deze repressie op transkriptie-niveau plaatsvinden, dan zou zo'n snelle remming van de enzymsynthese onwaarschijnlijk zijn. Derepressie van arginase en OTA treedt niet op indien gist gekweekt in arginine-houdende media, die grote hoeveelheden arginase en OTA bevat, aan N-uitputting wordt blootgesteld (Tabel 6.3). Deze waarneming leidt tot de veronderstelling dat met arginase en OTA overeenkomend boodschapper-RNA in de gist aanwezig moet zijn vóór de N-uitputting begint, wil derepressie optreden, terwijl dit boodschapper-RNA door verbruik snel wordt geïnactiveerd. Overigens moet worden aangenomen dat dit boodschapper-RNA in rustende cellen waarin geen enzym wordt gevormd zeer stabiel is, daar gist gedurende lange tijd kan worden bewaard of uitgeput (in medium zonder C- en N-bron) zonder verlies van het vermogen tot derepressie tijdens N-uitputting (Tabel 6.4).

In de vorige paragraaf werd reeds gesteld dat de repressie door N-verbindingen van myo-inositol afhankelijk is. De wijze waarop het vitamine dit proces beïnvloedt is nog onduidelijk.

9.8 INVLOED VAN STIKSTOF-UITPUTTING OP GIST

Derepressie van arginase en OTA tijdens N-uitputting komt niet uitsluitend bij *S.cerevisiae*, stam B voor. Ook stammen van enkele andere gistsoorten (Tabel 4.5; MIDDELHOVEN, 1968) en haploïde, auxotrofe mutanten van *S.cerevisiae* (Tabel 4.6) vertonen het verschijnsel. Wel schijnt in stam B derepressie tijdens N-uitputting voornamelijk tot enzymen van de arginine-afbraakweg beperkt te blijven; 5 andere enzymen die betrokken zijn bij de afbraak van eiwit of aminozuren, worden onder die omstandigheden niet gederepresseerd (Tabel 4.4; MIDDELHOVEN, 1968). Deze enzymen zijn: een proteïnase, NAD-specifieke glutaminezuur-dehydrogenase, threonine-dehydratase, asparaginase en glutaminase. Derepressie van het systeem voor actieve opname van proline tijdens N-uitputting werd onlangs waargenomen bij *Saccharomyces chevalieri* (SCHWENCKE en MAGAÑA-SCHWENCKE, 1969).

Gelijktijdig met de derepressie van arginase en OTA treden tijdens N-uitputting nog andere verschijnselen bij gist op (Tabel 4.3; MIDDELHOVEN, 1970). Het drooggewicht neemt toe, dank zij polysaccharide-synthese. Verder neemt de polypeptide-fractie toe ten koste van die der vrije aminozuren, peptiden en nucleotiden. Binnen de dubbele tijd nodig voor maximale derepressie van arginase en OTA blijven het totale aantal gistcellen, en de totale hoeveelheden stikstof, nucleïnezuuren en DNA echter konstant. De hoeveelheid vrij arginine in de gist neemt zeer sterk af, hetgeen wijst op een grote werkzaamheid van de gede-

represeerde enzymen. De derepressie van arginase en OTA onder omstandigheden van N-gebrek stelt gist in staat arginine als stikstof-reservemateriaal te benutten. Dit kan van fysiologisch belang zijn, omdat gist, ook na kweken in minimaal medium, aanzienlijk hoeveelheden vrij arginine bevat (Tabel 3.2; Tabel 4.3; MIDDELHOVEN, 1969a, 1970).

9.9 SAMENVATTING

1. De afbraak van arginine in *Saccharomyces cerevisiae* wordt ingeleid door de werking van arginase en ornithine-transaminase.
2. Gistarginase bevat in vivo Fe^{2+} -ionen als prosthetische groep. Deze kunnen in vitro worden vervangen door de tweewaardige kationen van Mn, Co, Ni of Mg.
3. Arginase en OTA worden door arginine en, in mindere mate, door ornithine geïnduceerd.
4. Beide enzymen zijn niet gevoelig voor repressie door katabolieten van de koolstofbron, evenmin als voor inaktiveringsrepressie.
5. Beide enzymen worden door een groep stikstof-verbindingen gerepresseerd; deze repressie is afhankelijk van myo-inositol. Ze worden in gist gederepresseerd onder omstandigheden van stikstof- of inositol-gebrek.
6. Tot de represserende stikstof-verbindingen moeten worden gerekend: zeer goed assimileerbare stikstofbronnen (NH_4 -zouten, asparagine, asparaginezuur en alanine) en/of hun stofwisselingsprodukten, en enkele verbindingen die niet of slechts in geringe mate als enige stikstofbron kunnen dienen (β -alanine, β -aminoboterzuur en glycine).
7. Behalve door de onder 3 en 5 genoemde mechanismen wordt de arginine-afbraak in gist gereguleerd door een sterke competitieve remming van arginase door ornithine. Arginase wordt verder geremd door asparaginezuur, α -aminoboterzuur en alifatische aminozuren met vertakte keten. OTA wordt ook door enkele aminozuren geremd.

GENERAL DISCUSSION AND SUMMARY

9.1 THE PATHWAY OF ARGININE BREAKDOWN IN YEAST

Ornithine and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate are the intermediates in the degradation of arginine to glutamate in baker's yeast (MIDDELHOVEN, 1964). The enzymes involved are arginase and ornithine transaminase (OTA). Ornithine and urea are produced from arginine in equimolar amounts. The Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate results from transamination of ornithine (Scheme 1), and is converted into glutamate by dehydrogenation (BECHET and WIAME, 1964). The presence of arginase in yeast was previously demonstrated by EDLBACHER and BAUR (1938), that of OTA by SCHER and VOGEL (1957). The involvement of both enzymes in the arginine degradation has been proved by the inducibility of arginase and, particularly, of OTA by arginine (Table 3.1; Figure 4.2). The arginase pathway has also been demonstrated in *Bacillus subtilis* (DEHAUWER, LAVALLÉ and WIAME, 1964), *Bacillus licheniformis* (RAMALEY and BERNLOHR, 1966) and *Neurospora crassa* (CASTAÑEDA, MARTUSCELLI and MORA, 1967).

In contrast with observations of ROCHE and LACOMBE (1952), no arginine deiminase was demonstrated in yeast. Also under conditions indicated by these authors, arginine is apparently converted by cell-free extracts of yeast exclusively into ornithine and urea.

The mechanism of urea breakdown in yeast is still unclear. Urease does not occur in yeast.

9.2 PROPERTIES OF YEAST ARGINASE

To elucidate the first step of arginine breakdown in yeast, cell-free extracts were incubated with arginine under conditions prescribed by EDLBACHER and BAUR (1938) for demonstration of arginase (pH 9.5 after addition of $MnCl_2$) as well as under conditions for demonstration of arginine deiminase (pH 6.7 after addition of $CoCl_2$) according to ROCHE and LACOMBE (1952). Arginine appeared to be stoichiometrically converted into ornithine and urea under both of these conditions. The ratio of specific arginase activities, estimated according to both methods, is constant (Table 3.1). On account of this observation, and on account of the failure of usual techniques of enzyme fractionation to separate these activities, it was concluded that both arginase activities belong to one enzyme protein.

Yeast arginase is stimulated *in vitro* by the bivalent cations of Mn, Co, Fe and Ni, similar to liver arginase (HELLERMAN and PERKINS, 1935; MOHAMMED and GREENBERG, 1945) and jack bean (*Canavalia*) arginase (STOCK, PERKINS and HELLERMAN, 1938; Anderson, 1945). Moreover, Mg ions were found to be

able to function as prosthetic group of yeast arginase, an observation not been reported before. Arginase-metallo complexes are rather stable: they resist dialysis and gel filtration for some time. They are readily distinguished from each other by various properties (MIDDELHOVEN, 1969b), e.g. the shape of the pH-activity curve (Figure 8.1), the specific activity (Table 8.1), the sensitivity to cation-binding agents (Table 8.3), the MICHAELIS constant and the inhibition constant for ornithine (Table 8.4).

Cell-free extracts with high arginase activity in the absence of added activating cations can be prepared from yeast poor in phosphate. The pH-activity curve (Figure 8.2) of this native arginase strongly resembles that of a Fe-arginase preparation from which the excess of Fe^{2+} was removed (Figure 8.3). This resemblance to Fe-arginase is shown in other properties as well (Table 8.3; Table 8.4; MIDDELHOVEN, 1965a, 1965b, 1969b). Even native arginase of Fe-deficient yeast grown in the presence of inhibitory concentrations of CoCl_2 or MnCl_2 (Figure 8.5; Figure 8.6; Table 8.5; MIDDELHOVEN, DE WAARD and MULDER, 1969) shows all of the properties of Fe-arginase, unless the concentration ratio of CoCl_2 and Fe^{2+} salts is very high. In the latter case the native arginase contains much unbound apo-enzyme and Co-arginase in addition to Fe-arginase (Figure 8.5; Figure 8.6; Table 8.5).

The conclusion that Fe^{2+} ions function as the prosthetic group of yeast arginase *in vivo* is in contrast with the general opinion in the literature. Since the observation was made that Mn deficiency in laboratory animals results in decreased liver arginase activity (BOYER, SHAW and PHILLIP, 1942; SHILS and MCCOLLUM, 1943; SMITH and ELLIS, 1947), it is generally assumed that Mn^{2+} ions represent the sole prosthetic group of arginase *in vivo*. The higher specific activity and the greater heat stability of Mn-arginase as compared with those of other metallo-arginases, are also considered as evidence supporting the assumption that Mn^{2+} activates arginase *in vivo*. Yeast arginase also shows the highest activity and the greatest stability after Mn^{2+} activation (Table 8.1). For this reason arginase was assayed in the present investigation after activation of the cell-free yeast extracts with MnCl_2 . The inferior activation of liver arginase by Fe^{2+} ions *in vitro* (EDLBACHER and ZELLER, 1936; RICHARDS and HELLERMAN, 1940) may have been caused by the use of phosphate buffers, which are inhibitory to native yeast arginase and to Fe-arginase (Table 8.3).

The pH-activity curve of native yeast arginase (Figure 8.2) shows two maxima, one at pH 8.5 and one at pH 10.5. The activity of the latter is the lower, but is the most resistant to inhibition by phosphate (Figure 8.1); it should be ascribed to a Fe-arginase as well (Figure 8.3). The physiological importance of this activity is dubious, however, in view of its extreme pH optimum and its relatively small specific activity. Therefore, no further attention has been paid to it.

9.3 REGULATION OF ARGININE BREAKDOWN BY ENZYME INHIBITION

All of the active metallo-complexes of yeast arginase are strongly competitively inhibited by ornithine (Table 8.4). The MICHAELIS constant of native and of Fe-arginase at the optimal pH 8.5 is 3.3 mM. The inhibition constant for ornithine under the same conditions is 0,75–0,80 mM, showing that the affinity of ornithine to the enzyme is much greater than that of arginine. This phenomenon is obviously of great significance for the regulation of arginine breakdown in yeast. The arginine reserve is protected against degradation in this way, when the utilization of ornithine stagnates.

The other reaction product of arginase, urea, does not inhibit the enzyme (Table 7.3), nor do nitrogen compounds which can be considered as end products of the arginine degradative pathway, *e.g.* NH_4Cl , glutamate, glutamine, asparagine and proline (Table 7.1). However, yeast arginase is inhibited by relatively small concentrations of lysine, aspartate, α -aminobutyrate, valine, leucine and isoleucine (Table 7.1). These inhibitions too may be of significance for the regulation. The observed inhibitions of yeast arginase by amino acids are in good agreement with the data of HUNTER and DOWNS (1945) concerning bovine liver arginase.

OTA is also inhibited by some amino acids, especially by mercapto amino acids (homocysteine and cysteine), by histidine, and by valine, leucine and isoleucine, the latter three being inhibitors of arginase as well; OTA is stimulated by lysine (Table 7.2).

9.4 INDUCTION OF ARGINASE AND OTA BY ARGININE

The induction of enzymes of the arginine degradative pathway by arginine and ornithine appears from the observation that the specific enzyme activities in yeast are higher when the latter is grown in media with arginine, ornithine or peptone (Tables 3.1, 3.2, 4.13 and 6.3; MIDDELHOVEN, 1964) than when $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Table 3.1; Table 3.2) or a single amino acid (Table 4.10) is the sole nitrogen source of the nutrient medium. Moreover, this induction appears from the rapid enzyme synthesis occurring after the transfer of yeast from glucose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium to glucose-arginine medium (Figure 4.2).

The question whether arginase and OTA are induced by arginine, ornithine or a derivative of these amino acids, cannot be answered with certainty as long as no arginase-negative yeast mutants are available. The superior induction of OTA by arginine (Table 3.1; MIDDELHOVEN, 1964) may point to arginine being the inducer itself. However, the uptake of arginine by yeast is much faster than that of ornithine, so that during growth with arginine the internal ornithine concentration may be higher than during growth with ornithine.

9.5 CATABOLITE REPRESSION AND INACTIVATION REPRESSION

Although the carbon and energy source exerts a pronounced effect on the specific activities, arginase and OTA appear to be induced by arginine in the presence of different carbon sources (Table 3.2). When a carbon source adversely

affects this induction, the uptake of arginine is strongly reduced (Table 3.2; MIDDELHOVEN, 1969a). As the induction by arginine is not inhibited by carbon sources which seem to exert the strongest repressive action in $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium, the effect of carbon sources upon specific arginase and OTA activities should not be ascribed to catabolite repression. Moreover, regulation of arginase and OTA formation by catabolite repression is improbable, as a strong derepression of both enzymes occurs during nitrogen starvation (Figure 4.1; MIDDELHOVEN, 1968). These conditions would be ideal for catabolite repression because of the expected accumulation of catabolites in the yeast. Derepression of arginase and OTA is also observed under conditions of inositol deficiency (Tables 4.9, 5.1 and 5.3; Figure 5.2; MIDDELHOVEN, 1969c).

Arginase and OTA, in contrast with many other yeast enzymes, are not subject to inactivation repression. This appears from the fact that the total amounts of these enzymes in the yeast do not decrease during two generation periods after transfer of the cells from glucose-peptone medium to glucose- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ medium (Table 7.4; MIDDELHOVEN, 1969a).

The regulation of arginase and OTA production in yeast is at variance with that in other organisms, mainly because of the insensitivity to repression by catabolites of the carbon source. In *Bacillus licheniformis* all of the three enzymes of the arginase pathway are strongly repressed by glucose and by glycerol (LAISHLEY and BERNLOHR, 1966, 1968); they are induced by arginine. Derepression in arginine-free medium occurs at a time when the carbon source is depleted and the sporulation begins (RAMALEY and BERNLOHR, 1966). In CHANG's liver cells the induction of arginase by arginine is counteracted by high concentrations of glucose or of succinate (ELIASSON, 1965). Moreover, the enzyme is repressed by products of arginine breakdown and their derivatives, especially by proline (ELIASSON and STRECKER, 1966; ELIASSON, 1967).

9.6 REPRESSION OF ARGINASE AND OTA BY NITROGEN COMPOUNDS AND MYO-INOSITOL

The induction of arginase and OTA by arginine in yeast is counteracted by nitrogen compounds, instead of by catabolites of the carbon source. This appears from the decreased specific activities when yeast cultures with arginine or peptone as the nitrogen source in addition receive $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Table 3.1) or readily assimilable amino acids (Table 4.13). Furthermore this appears from a study of the increase of specific activities under conditions of nitrogen or vitamin deficiency.

Transfer of a yeast culture to a medium without nitrogenous compounds results in a rapid increase of the specific activities of arginase and OTA equaling the enzyme synthesis in medium with arginine as the sole nitrogen source both in rate and in amount (Figure 4.2). This uninduced increase of specific activities (derepression) is explained by the assumption that the repression by nitrogenous compounds is released as a result of the nitrogen deficiency. Evidence as to the repression of arginase and OTA by nitrogen compounds in co-

operation with myo-inositol is found in the following observations (MIDDELHOVEN, 1965a, 1967, 1968, 1969c, 1970):

1. The derepression of arginase and OTA during nitrogen starvation is an enzyme synthesis *de novo*. This appears from the fact that cycloheximide immediately and completely inhibits the increase of specific activities (Figure 4.1). Moreover, the phenomenon is dependent on the energy supply of the yeast cells (Table 4.1; Table 4.2).
2. Uninduced increase of specific enzyme activities is exclusively observed under conditions of nitrogen or inositol deficiency (Tables 4.9, 5.1 and 5.3; Figure 5.2). Deprivation of phosphate, magnesium or sulfate does not result in derepression (Table 4.9, Table 5.3). Cessation of growth and accumulation of metabolites obviously are no sufficient terms for derepression.
3. Derepression during nitrogen starvation occurs regardless of the carbon and energy source (Table 4.7) or the nitrogen source (Table 4.10) of the culture medium in which the yeast was grown. The only stipulation is that the growth medium contains no arginine; otherwise the enzymes fail to be derepressed (Table 6.3).
4. Derepression during nitrogen starvation is not affected by the nature of the carbon source in the nitrogen starvation medium, provided that the latter is immediately assimilable (Table 4.8). For this reason, this derepression should not be ascribed to an eventual induction by any accumulating catabolite of the carbon source.
5. The derepression during nitrogen starvation is strongly inhibited by most nitrogen compounds which can serve as the sole nitrogen source (Table 4.11) and by some non-toxic nitrogen compounds (Table 4.12) which cannot serve as the sole nitrogen source. Addition of these compounds at a time when the derepression is in progress, results in complete inhibition of enzyme production within 10 minutes (Figure 4.3).
6. Deprivation of myo-inositol, in contrast to that of other vitamins essential for the growth of strain B, results in a pronounced derepression of arginase and OTA (Table 5.1, Figure 5.2). The mere addition of myo-inositol to a yeast suspension in vitamin-free glucose-(NH₄)₂SO₄ medium is sufficient to prevent this derepression (Table 5.1).
7. Derepression of arginase and OTA (Table 5.3) simultaneously with the cessation of exponential growth (Figure 5.2), as a result of inositol deficiency, also occurs in glucose medium with either glutamic acid, alanine or asparagine as the nitrogen source.
8. The induction of arginase and OTA by arginine is partly inhibited only by very readily assimilable nitrogen sources; that of OTA also by less readily assimilable nitrogen compounds, *e.g.* by glycine that cannot serve as the sole nitrogen source (Table 4.13).

The nature of the repressing nitrogen compounds is not exactly known. Probably a group of nitrogen compounds with relatively simple chemical structure is capable of repressing arginase and OTA. This group comprises readily assimilable nitrogen sources (NH₄ salts, alanine, aspartic acid and asparagine) or

their metabolites, and some nitrogen compounds (glycine, β -alanine and β -aminobutyrate) which cannot serve as the sole nitrogen source. Glutamic acid is probably not included, as this amino acid exerts only a relatively weak inhibitory action on the induction of arginase and OTA by arginine (Table 4.13).

The repression by nitrogen compounds can be released by supplying arginine as well as under conditions of nitrogen deficiency. Both enzymes are strongly induced by arginine; this induction is only partly inhibited even by very readily assimilable nitrogen sources (Table 4.13). In addition to nitrogen deficiency, deprival of myo-inositol in contrast with that of other essential nutrients and vitamins, causes derepression. This means that myo-inositol is involved in the regulation of arginase and OTA formation in yeast. The yeast strain studied, strain B, has an absolute requirement for myo-inositol (Table 5.2), in contrast with most of the other strains of *S. cerevisiae* and *S. carlsbergensis*. The repression of arginase and OTA by NH_4 salts and by other assimilable nitrogen sources is inositol-dependent (Table 5.3, Figure 5.2). The derepression due to inositol deficiency is much less pronounced than that due to nitrogen starvation, while both derepressions are not additive when yeast is simultaneously deprived of its nitrogen source and of all vitamins (Table 4.9). It is unknown whether myo-inositol or its derivatives function as co-repressors or that they play a role in the formation of the apo-repressor or in the binding of co-repressors to the apo-repressor.

9.7 MECHANISM OF THE REGULATION OF ENZYME PRODUCTION

Arginase and OTA are simultaneously induced and repressed under various conditions. Although the regulatory mechanisms of the formation of both enzymes are largely similar, they are independent of one another, as the ratio of the specific activities of both enzymes is variable. This is mainly due to a greater sensitivity of OTA towards repression by nitrogenous compounds. Both structural genes are probably not located in one operon, but are scattered in the yeast genome.

The repression of arginase and OTA presumably takes place on translation level, *i.e.* not the production of messenger RNA, but that of enzyme polypeptide is inhibited by nitrogenous compounds. The derepression of arginase and OTA during nitrogen starvation probably proceeds with preformed messenger RNA; synthesis of the latter during nitrogen starvation is not required. The proposed model is only valid, when it is assumed that messenger RNA corresponding with arginase and OTA would be rapidly inactivated by utilization during enzyme synthesis, but that it would be extremely stable in resting yeast cells in which these enzymes are not produced. Unfortunately, no direct evidence as to this model was obtained. Efforts to investigate the eventual requirement of messenger RNA synthesis by using uracil and adenine analogues, failed (Table 6.2), as these anti-metabolites were shown to exert their growth-inhibiting action only some hours after their addition.

The assumption that nitrogen compounds repress at translation level is

mainly based on the observation that the addition of such compounds stops the derepression during nitrogen starvation within 10 minutes (Figure 4.3). If this repression would take place at transcription level, such a rapid inhibition of enzyme synthesis would be improbable. Arginase and OTA are not derepressed when yeast grown with arginine which contains large amounts of arginase and OTA is deprived of its nitrogen source (Table 6.3). This observation leads to the assumption that messenger RNA corresponding with arginase and OTA, which is required for derepression would be present in the yeast at the initiation of nitrogen deprivation, and that this messenger RNA would rapidly be inactivated by utilization. However, the messenger RNA is thought to be very stable in resting cells in which no enzyme is produced, since yeast can be stored or exhausted (in medium without carbon and nitrogen source) for a long time without losing its capacity of derepression during nitrogen starvation (Table 6.4).

In the preceding section the dependence of the repression by nitrogen compounds on the presence of myo-inositol was stated. The way in which the vitamin is functioning in this process is still unknown.

9.8 EFFECT OF NITROGEN STARVATION ON YEAST

Derepression of arginase and OTA upon nitrogen starvation is no exclusive property of *S. cerevisiae*, strain B. Also strains of some other yeast species (Table 4.5; MIDDELHOVEN, 1968) and haploid, auxotrophic mutants of *S. cerevisiae* (Table 4.6) show the phenomenon. Derepression during nitrogen starvation of strain B appears to be mainly restricted to enzymes of the arginine degradative pathway; five other enzymes involved in protein or in amino acid breakdown are not derepressed under the same conditions (Table 4.4; MIDDELHOVEN, 1968). These enzymes are: a proteinase, NAD-specific glutamic dehydrogenase, threonine dehydratase, asparaginase and glutaminase. Derepression of a proline transport system during nitrogen starvation has been observed recently (SCHWENCKE and MAGAÑA-SCHWENCKE, 1969) in *Saccharomyces chevalieri*.

Concomitantly with the derepression of arginase and OTA, other phenomena are observed in yeast after nitrogen starvation (Table 4.3; MIDDELHOVEN, 1970). The dry weight increases due to polysaccharide synthesis. Moreover, the polypeptide fraction increases at the expense of the fraction of free amino acids, peptides and nucleotides. However, the total number of yeast cells and the total amounts of nitrogen, nucleic acids and DNA remain constant within twice the time required for maximal derepression of arginase and OTA. The amount of free arginine very strongly decreases, obviously as a result of the activity of the derepressed enzymes. The derepression of arginase and OTA during nitrogen starvation enables yeast to utilize arginine as a nitrogen reserve substance. This may be of physiological importance, as yeast contains considerable amounts of free arginine, even after growth in minimal medium (Table 3.2, Table 4.3; MIDDELHOVEN, 1969a, 1970).

9.9 SUMMARY

1. The process of arginine breakdown in *S.cerevisiae* is initiated by the successive actions of arginase and ornithine transaminase.
2. Fe^{2+} ions are the prosthetic group of yeast arginase *in vivo*. They can be replaced *in vitro* by the bivalent cations of Mn, Co, Ni or Mg.
3. Arginase and OTA are induced by arginine and, to a less extent, by ornithine.
4. Both enzymes are not subject to repression by catabolites of the carbon source, nor to inactivation repression.
5. Both enzymes are repressed by a group of nitrogen compounds; this repression is dependent on myo-inositol. Nitrogen or inositol deficiency causes derepression of the two enzymes.
6. The group of repressing nitrogen compounds comprises: very readily assimilable nitrogen sources (NH_4 salts, asparagine, aspartic acid and alanine) and/or their metabolites, and some compounds which cannot or only poorly serve as the sole nitrogen source (β -alanine, β -aminobutyrate and glycine).
7. In addition to the mechanisms recorded under 3 and 5, the arginine breakdown in yeast is controlled by a strong competitive inhibition of arginase by ornithine. Arginase is also inhibited by aspartate, α -aminobutyrate and branched-chain aliphatic amino acids. OTA is inhibited by some amino acids as well.

VERANTWOORDING

De schrijver van dit proefschrift is dank verschuldigd aan velen die hem bij het vergaren van de vermelde resultaten en bij het samenstellen van dit proefschrift hebben geholpen.

In de eerste plaats komt dank toe aan Prof. Dr. Ir. E. G. MULDER voor zijn voortdurende aanmoediging van het hier vermelde onderzoek, en voor de uiterst nauwgezette wijze waarop hij bij de samenstelling van dit proefschrift heeft geholpen.

Bij het hier vermelde onderzoek hebben als analisten hun medewerking verleend: Mejuffrouw T. A. WISSERHOF, Mevrouw T. VAN DER LIGT-KLINKERS en de Heren P. J. BUYSMAN en G. J. K. PESCH. Ook de hulp van Ir. M. A. DE WAARD, in zijn studietijd verleend, wordt hier dankbaar in herinnering gebracht.

Voorts gaan gevoelens van dank uit naar Mejuffrouw G. C. E. JANSEN, Mevrouw C. MÖLLER-MOL en Mejuffrouw C. E. VAN DER SCHEER voor het uitkijken van het manuscript, en naar de Heer J. C. VAN VELZEN voor het vervaardigen van de tekeningen.

Het in dit proefschrift vermelde onderzoek werd van 1961 tot 1964 financieel gesteund door Heineken's Technisch Beheer N.V. en door het Landbouwhogeschoolfonds.

LITERATUURLIJST

- AMES, B. N. en HARTMANN, P. E. (1963). The histidine operon. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28, 349.
- ANDERSON, A. B. (1945). The activation of jack-bean arginase by cobalt, manganese and iron. Biochem. J. 39, 139
- ARCHIBALD, R. M. (1944). Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma. J. Biol. Chem. 156, 121.
- ARCHIBALD, R. M. (1945). Colorimetric determination of urea. J. Biol. Chem. 157, 507.
- BACH, S. J. en WHITEHOUSE, D. B. (1954). Purification and properties of arginase. Biochem. J. 57, 31 P.
- BARTON-WRIGHT, E. C. (1952). An analytical approach to some problems in the nitrogen relations of yeast. Wallerstein Lab. Commun. 15, 115.
- BECHET, J. en WIAME, J. M. (1964), geciteerd in: WOLSTENHOLME, G. E. M. en CAMERON, M. P., Comparative Biochemistry of arginine and derivatives. Churchill Ltd., Londen, p. 16.
- BECHET, J. en WIAME, J. M. (1965). Indication of a specific regulatory binding protein for ornithine transcarbamoylase in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Biophys. Research Commun. 21, 226.
- BLOEMERS, H. P. J. (1967). Induced α -glucosidase synthesis in *Saccharomyces carlsbergensis*. Acad. Proefschrift, Utrecht.
- BOULANGER, P. en OSTEUX, R. (1956). Action de la L-aminoacide-déshydrogénase du foie de dindon (*Meleagris gallopavo* L.) sur les acides aminés basiques. Biochim. Biophys. Acta 21, 552.
- BOYER, P. D., SHAW, J. H. en PHILLIPS, P. H. (1942). Studies on manganese deficiency in the rat. J. Biol. Chem. 143, 417.
- CASTAÑEDA, M., MARTUSCELLI, J. en MORA, J. (1967). The catabolism of L-arginine by *Neurospora crassa*. Biochim. Biophys. Acta 141, 276.
- CENNAME, C., BOLL, M en HOLZER, H. (1964). Ueber Threonindehydratase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. Z. 340, 125.
- CHINARD, F. P. (1952). Photometric estimation of proline and ornithine. J. Biol. Chem. 199, 91.
- COVE, D. J. (1966). The induction and repression of nitrate reductase in the fungus *Aspergillus nidulans*. Biochim. Biophys. Acta, 113, 51.
- COWIE, D. B. en McCLURE, F. L. (1959). Metabolic pools and the synthesis of macromolecules. Biochim. Biophys. Acta 31, 236.
- CURDEL, A. (1966). Influence of the nature of the metallic prosthetic group on the biosynthesis and enzymatic properties of D-lactic dehydrogenase in yeast. Biochem. Biophys. Research Commun. 22, 357.
- DAVIS, R. H. (1968). Utilization of exogenous and endogenous ornithine by *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 96, 389.
- DEHAUWER, G., LAVALLÉ, R. en WIAME, J. M. (1964). Étude de la pyrroline déshydrogénase et de sa régulation du catabolisme de l'arginine et de la proline chez *Bacillus subtilis*. Biochim. Biophys. Acta, 81, 257.
- DEIBEL, R. H. (1964). Utilization of arginine as an energy source for the growth of *Streptococcus faecalis*. J. Bacteriol. 87, 988.
- DE KLOET, S. R. (1968). Effects of 5-fluorouracil and 6-azauracil on the synthesis of ribonucleic acid and protein in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 106, 167.
- DEMOSS, R. D. en BARD, R. C. (1957). Physiological and Biochemical Technics. in: Manual of microbiological methods. The Society of American Bacteriologists (ed.). McGraw-Hill, New York, p. 169.
- DETURK, W. E. (1955). The adaptive formation of urease by washed suspensions of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. 70, 187.

- DISCHE, Z. (1930). Ueber einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen Organen mit Hilfe dieser Reaktionen. *Mikrochemie* 8, 4.
- DIXON, M. en WEBB, E. C. (1958). *Enzymes*. Longmans, Green and Co, Londen, p. 173.
- DUNTZE, W., NEUMANN, D. en HOLZER, H. (1968). Glucose induced inactivation of malate dehydrogenase in intact yeast cells. *Europ. J. Biochem.* 3, 326.
- DURRAN, D. J. en RICHARDSON, R. G. (1966). The occurrence and role of α -keto- δ -guanidovaleric acid in white spruce (*Picea glauca* (Moench) Vos). *Canad. J. Biochem.* 44, 141.
- DWORSKY P. en HOFFMANN-OSTENDORFF, O. (1967). Galaktinol (myo-Inosit-1- α -D-galaktopyranosid) in Hefearten. *Z. physiol. Chem.* 348, 815.
- EASTCOTT, E. V. (1928). WILDERS 'Bios'. The isolation and identification of 'Bios I'. *J. Phys. Chem.* 32, 1094.
- EDLBACHER, S. en BAUR, H. (1938). Weitere Mitteilungen zur Kenntnis der Natur der Hefe- und Leberarginase. *Z. physiol. Chem.* 254, 275.
- EDLBACHER, S., KRAUS, J. en WALTER, G. (1932). Beiträge zur Kenntnis der Arginase. VII. Aktivierungs- und Hemmungsversuche. *Z. physiol. Chem.* 206, 65.
- EDLBACHER, S. en ZELLER, A. (1936). Ueber die Natur der Arginase. *Z. physiol. Chem.* 245, 64.
- ELIASSON, E. E. (1965). Regulation of arginase activity in CHANG's liver cells in tissue culture. *Biochim. Biophys. Acta* 97, 449.
- ELIASSON, E. E. (1967). Repression of arginase synthesis in CHANG's liver cells. *Exper. Cell Research* 48, 1.
- ELIASSON, E. E. en STRECKER, H. J. (1966). Arginase activity during the growth cycle of CHANG's liver cells. *J. Biol. Chem.* 241, 5757.
- ENGLANDER, S. W. en PAGE, L. A. (1965). Interpretation of data on sequential labeling of growing polypeptides. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 19, 565.
- EPRUSSI, B., SLONIMSKY, P. P., YOTSUYAYAGI, Y. en TAVLITSKI, J. (1956). Variations physiologiques et cytologiques de la levure au cours du cycle de la croissance aérobie. *Compt. rend. Trav. Lab. Carlsberg, sér. physiol.* 26, 87.
- EPPS, H. M. R. en GALE, E. F. (1942). The influence of the presence of glucose during growth on the enzymatic activities of *Escherichia coli*: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. *Biochem. J.* 36, 619.
- ERRERA, M. (1949). Phosphate-activated glutaminase in kidney and other tissues. *J. Biol. Chem.* 178, 483.
- FERGUSON, J. J., BOLL, M. en HOLZER, H. (1967). Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation and catabolite repression. *Europ. J. Biochem.* 1, 21.
- FINCHAM, J. R. S. (1953). Ornithine transaminase in *Neurospora* and its relation to the biosynthesis of proline. *Biochem. J.* 53, 313.
- FRIEDEMANN, T. E. en HAUGEN, G. E. (1943). Pyruvic acid. II. The determination of keto acids in blood and urine. *J. Biol. Chem.* 147, 415.
- GEST, H. en MANDELSTAM, J. (1966). Heat denaturation of β -galactosidase: a possible approach to the problem of catabolite repression and its site of action. *Nature* 211, 72.
- GHOSH, A. en BHATTACHARYYA, S. N. (1967). Changes in the respiratory and glycolytic behaviour of *Saccharomyces carlsbergensis* due to inositol deficiency. *Biochim. Biophys. Acta* 136, 19.
- GHOSH, A., CHARALAMPOUS, F., SISON, Y. en BORER, R. (1960). Metabolic functions of myo-inositol. I. Cytological and chemical alterations in yeast resulting from inositol deficiency. *J. Biol. Chem.* 235, 2522.
- GILBERT, W. en MÜLLER-HILL, B. (1966). Isolation of the *Lac* repressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 56, 1891.
- GRASSMANN, W. en MAYR, O. (1933). Zur Kenntnis der Hefepararginase. *Z. physiol. Chem.* 214, 194.
- GROSS, R. E. (1921). Ueber den Reaktionsverlauf bei Arginasewirkung. *Z. physiol. Chem.* 112, 236.

- GRUBER, M. en CAMPAGNE, R. N. (1965). Regulation of protein synthesis: an alternative to the repressor-operator hypothesis. Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap. C 68, 270.
- HANDSCHUMACHER, R. E. en PASTERNAK, C. A. (1958). Inhibition of orotidylic acid decarboxylase, a primary site of carcinostasis by 6-azauracil. Biochim. Biophys. Acta 30, 451.
- HEALY, W. B., CHANG, S. en McELROY, W. D. (1955). Metal toxicity and iron deficiency effects on enzymes in *Neurospora*. Arch. Biochem. Biophys. 54, 206.
- HELLERMAN, L. en PERKINS, M. E. (1935). Activation of enzymes. III. The rôle of metal ions in the activation of arginase. The hydrolysis of arginine induced by certain metal ions with urease. J. Biol. Chem. 112, 175.
- HELLERMAN, L. en STOCK, C. C. (1936). Metal ion activation in enzymatic catalysis. Arginase. J. Amer. Chem. Soc. 58, 2654.
- HELLERMAN, L. en STOCK, C. C. (1938). Activation of enzymes. V. The specificity of arginase and the non-enzymatic hydrolysis of guanidino compounds. Activating metal ions and liver arginase. J. Biol. Chem. 125, 771.
- HIERHOLZER, G. en HOLZER, H. (1963). Repression der Synthese von DPN-abhängiger Glutaminsäuredehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* durch Ammoniumionen. Biochem. Z. 339, 175.
- HILL, R. L. en CHAMBERS, P. (1967). The biosynthesis of proline by *Tetrahymena pyriformis*. Biochim. Biophys. Acta 148, 435.
- HILL, D. L. en VAN EYS, J. (1965). The relation between arginine, citrulline and ornithine in *Tetrahymena pyriformis*. J. Protozool. 12, 259.
- HUGH, D. H., ROTH, D. en HUNTER, J. (1968). Regulation of histidine catabolism by succinate in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 96, 396.
- HUNTER, A. en DOWNS, C. E. (1945). The inhibition of arginase by amino acids. J. Biol. Chem. 157, 427.
- JACOB, F. en MONOD, J. (1961). On the regulation of gene activity. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 26, 193.
- JOHNSON, M. J. (1941). Isolation and properties of a pure yeast polypeptidase. J. Biol. Chem. 137, 575.
- KEMPNER, E. S. en MILLER, J. H. (1963). The mechanism of action of purine and pyrimidine analogs in microorganisms. Biochim. Biophys. Acta 76, 341.
- KINSKY, S. C. (1961). Induction and repression of nitrate reductase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 82, 898.
- KÖNIG, C., KALTWASSER, H. en SCHLEGEL, H. G. (1966). Die Bildung von Urease nach Verbrauch der äusseren N-Quelle bei *Hydrogenomonas* H 16. Arch. f. Mikrobiol. 53, 231.
- KOHLRAW, G., DRAGERT, W. en HOLZER, H. (1965). Parallel-Repression der Synthese von Glutamin-Synthetase und DPN-abhängiger Glutamat-Dehydrogenase in Hefe. Biochem. Z. 341, 224.
- KOSSELL, A. en DAKIN, H. D. (1904). Ueber die Arginase. Z. physiol. Chem. 41, 321.
- KREBS, H. A. en HENSELEIT, K. (1932). Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. Z. physiol. Chem. 210, 33.
- LAISHLEY, E. J. en BERNLOHR, R. W. (1966). Catabolite repression of 'three sporulation enzymes' during growth of *Bacillus licheniformis*. Biochem. Biophys. Research Commun. 24, 85.
- LAISHLEY, E. J. en BERNLOHR, R. W. (1968). Regulation of arginine and proline catabolism in *Bacillus licheniformis*. J. Bacteriol. 96, 322.
- LECLERC, H., OSTEUX, R. en LA RIVIÈRE, M. (1966). L'Arginine décarboxylase chez *Aeromonas shigelloides*. Ann. Inst. Pasteur 110, 737.
- LEMBACH, K. en CHARALAMPOUS, F. C. (1967a). Metabolic functions of myoinositol. V. Utilization of glycine and serine in nucleotide and nucleic acid biosynthesis by inositol-deficient KB-cells. J. Biol. Chem. 242, 2599.
- LEMBACH, K. en CHARALAMPOUS, F. C. (1967b). Metabolic functions of myoinositol. VI. Impairment of amino acid transport in KB-cells caused by inositol deficiency. J. Biol. Chem. 242, 2606.

- LENNEY, J. F. (1956). A study of two yeast proteinases. *J. Biol. Chem.* 221, 919.
- LESTER, R. L. en STEINER, M. R. (1968). The occurrence of diphosphoinoside and triphosphoinoside in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 243, 4889.
- LEWIS, M. J. en RAINBOW, C. (1965). Glycine assimilation and the STICKLAND reaction in brewer's yeast. *J. Inst. Brewing* 71, 150.
- LINWEAVER, H. en BURK, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constant. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658.
- LODDER, J. en KREGER-VAN RIJ, N. J. W. (1952). The yeasts, a taxonomic study. Noord-Hollandse Uitgeversmaatschappij, Amsterdam.
- LOOMIS, W. F. en MAGASANIK, B. (1965). Genetic control of catabolite repression of the *Lac*-operon in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 20, 230.
- LOOMIS, W. F. en MAGASANIK, B. (1967). The catabolite repression gene of the *Lac*-operon in *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* 23, 487.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. en RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the FOLIN phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265.
- MAGASANIK, B. (1961). Catabolite repression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 249.
- MAGASANIK, B. (1963). The genetic and molecular base of catabolite repression. in: Informational macromolecules. (VOGEL, H. J., BRYSON, V. en LAMPEN, J. O., ed.), Academic Press, New York, p. 271.
- MAGASANIK, B., LUND, P., NEIDHARDT, F. C. en SCHWARTZ, D. T. (1965). Induction and repression of the histidine-degrading enzymes in *Aerobacter aerogenes*. *J. Biol. Chem.* 240, 4320.
- MANDELSTAM, J. (1964) Regulation of enzyme synthesis by induction and repression. *Biochem. J.* 90, 21 P.
- MATILE, P. (1966). Inositol deficiency resulting in death: an explanation of its occurrence in *Neurospora crassa*. *Science*, 151, 86.
- MECKE, D., WULFF, K. en HOLZER, H. (1966). Metabolit-induzierte Inaktivierung von Glutaminsynthetase aus *Escherichia coli* im zellfreien System. *Biochim. Biophys. Acta* 128, 559.
- MEISTER, A. (1955). Glutaminase, asparaginase and α -ketoacid-amidase. in: *Methods in Enzymology*, (COLOWICK, S. P. en KAPLAN, N. O., ed.) Academic Press, New York, Vol. II. p. 380.
- MERCKENSCHLAGER, M., SCHLOSSMANN, K. en KURTZ, W. (1957). Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine Verwendung auf biologische Probleme. *Biochem. Z.* 329, 332.
- MESSENGUY, F. en WIAME, J. M. (1969). The control of ornithinetranscarbamylyase activity by arginase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 3, 47.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1964). The pathway of arginine breakdown in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 93, 650.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1965a). Over de stofwisseling van arginine in bakkersgist. Inzending voor de Kluyverprijs 1965, Nederlandse Vereniging voor Microbiologie, Delft.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1965b). The ferrous ion as cofactor of yeast arginase *in vivo*. *Abstr. Second Meeting Feder. Europ. Biochem. Soc., Wenen*, p. 204.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1965c). Regulatie van de stofwisseling in de cel. *Vakblad voor Biologen* 45, 253.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1967). Induction and repression of arginase and of ornithine transaminase in baker's yeast. *Biochem. J.* 106, 32 P.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1968). The derepression of arginase and of ornithine transaminase in nitrogen-starved baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 156, 440.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1969a). Enzyme repression in the arginine pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. and Serol.* 35, 215.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1969b). The ferrous ion as the cofactor of arginase *in vivo*. I. Properties of yeast arginase metallocomplexes of known composition and of native arginase. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 110.
- MIDDELHOVEN, W. J. (1969c). The effect of myo-inositol on the synthesis of arginase and ornithine transaminase in baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 192, 243.

- MIDDELHOVEN, W. J. (1970). Induction and repression of arginase and ornithine transaminase in baker's yeast. *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, in druk.
- MIDDELHOVEN, W. J., DE WAARD, M. A. en MULDER, E. G. (1969). The ferrous ion as the cofactor of arginase *in vivo*. II. Experiments on the replacement of Fe^{2+} in native yeast arginase by other cations *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 191, 122.
- MIERSCH, J. en REINBOHR, H. (1967). Metabolism of γ -guanidobutyric acid in fruit-bodies of *Panus tigrinus*. *Phytochemistry*, 6, 485.
- MILLER, J. H. en KEMPNER, E. S. (1963). Effects of an adenine analog on yeast metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 76, 333.
- MOHAMMED, M. S. en GREENBERG, D. M. (1945). Liver arginase. I. Preparation of extracts of high potency, chemical properties, activation-inhibition and pH-activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 8, 349.
- MOJONNIER, M. L., HEDRICK, L. R. en PORTER, T. (1955). The microbiological assay of the amino acids of five genera of yeasts grown under controlled conditions. *J. Nutrition* 57, 579.
- MONOD, J., WYMAN, J. en CHANGEUX, J. P. (1965). On the nature of allosteric transitions: a plausible model. *J. Molec. Biol.* 12, 88.
- MOORE, S. en STEIN, W. H. (1948). Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176, 367.
- MORA, J., TARRAB, R. en BOJALIL, L. F. (1966). On the structure and function of different arginases. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 206.
- MULDER, E. G., DEINEMA, M. H., VAN VEEN, W. L. en ZEVENHUIZEN, L. P. T. M. (1962). Polysaccharides, lipids and poly- β -hydroxybutyrate in micro-organisms. *Rec. Trav. Chim.* 81, 797.
- NEIDHARDT, F. C. (1960). Mutant of *Aerobacter aerogenes* lacking glucose repression. *J. Bacteriol.* 80, 536.
- NOVICK, A. en HORIUCHI, T. (1961). Hyperproduction of β -galactosidase by *Escherichia coli* bacteria. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 26, 239.
- NOVICK, A. en SZILARD, L. (1954). Experiments with the chemostat on the rates of amino acid synthesis in bacteria. in: *Dynamics of growth processes*, Princeton University Press, Princeton, p. 21.
- ORNSTON, L. N. (1966). The conversion of catechol and protocatechuate to β -keto adipate by *Pseudomonas putida*. *J. Biol. Chem.* 241, 3800.
- PADMANABAN, G. en SARMA, P. S. (1966). Cobalt toxicity and iron metabolism in *Neurospora crassa*. *Biochem. J.* 98, 330.
- PALLERONI, N. J. en STANIER, R. Y. (1964). Regulatory mechanisms governing synthesis of the enzymes for tryptophan oxidation by *Pseudomonas fluorescens*. *J. gen. Microbiol.* 35, 319.
- PALMER, J. en MOSES, V. (1968). The role of the regulator-gene product (repressor) in catabolite repression of β -galactosidase synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 106, 339.
- PICHINOTY, F. en MÉTÉNIER, G. (1967). Régulation de la biosynthèse et localisation de la nitrate-réductase d'*Hansenula anomala*. *Ann. Inst. Pasteur.* 112, 701.
- POLAKIS, E. S. en BARTLEY, W. (1965). Changes in the enzyme activities of *Saccharomyces cerevisiae* during aerobic growth on different carbon sources. *Biochem. J.* 97, 284.
- RAFTER, G. W. en COLOWICK, S. P. (1957). Enzymatic preparation of DPNH and TPNH. in: *Methods in enzymology*, (COLOWICK, S. P. en KAPLAN, N. O., ed.), Academic Press, New York, Vol. III, p. 887.
- RAMALEY, R. F. en BERNLOHR, R. W. (1966). Postlogarithmic phase metabolism of sporulating microorganisms. III. Breakdown of arginine to glutamic acid. *Arch. Biochem. Biophys.* 117, 34.
- RAMOS, F., STALON, V., PIÉRARD, A. en WIAME, J. M. (1967). The specialization of the two ornithine carbamoyl transferases of *Pseudomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 98.
- RATNER, S. (1962). Transamidinase. in: *Methods in enzymology*. (COLOWICK, S. P. en KAPLAN, N. O., ed.), Academic Press, New York, Vol. V, p. 843.
- Report of the Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry, (1961), Pergamon Press, New York.
- RICHARDS, M. M. en HELLERMAN, L. (1940). Activation of enzymes. VI. Purified liver arginase; reversible inactivation and reactivation. *J. Biol. Chem.* 134, 237.

- RICKENBERG, H. V., HSIE, A. W. en JANAČEK, J. (1968). The CR mutation and catabolite repression in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 31, 603.
- RIDGEWAY, G. J. en DOUGLAS, H. C. (1958). Unbalanced growth of yeast due to inositol deficiency. *J. Bacteriol.* 76, 163.
- RIGGS, A. D. en BOURGEOIS, S. (1968). On the assay, isolation and characterization of the *Lac* repressor. *J. Molec. Biol.* 34, 361.
- RIGGS, A. D., BOURGEOIS, S., NEWBY, R. F. en COHN, M. (1968). DNA binding of the *Lac* repressor. *J. Molec. Biol.* 34, 365.
- ROBERTSON, J. J. en HALVORSON, H. O. (1957). The components of maltozymase in yeast and their behavior during deadaptation. *J. Bacteriol.* 73, 186.
- ROCHE, J. en LACOMBE, G. (1952). Sur L'argininedésiminase et sur la formation enzymatique de citrulline par les levures. *Biochim. Biophys. Acta* 9, 687.
- ROHOLT, O. A. en GREENBERG, D. M. (1956). Liver arginase. IV. Effect of pH on kinetics of manganese-activated enzyme. *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 454.
- ROON, R. J. en LEVENBERG, B. (1968). An adenosine triphosphate-dependent, avidine-sensitive enzymatic cleavage of urea in yeast and green algae. *J. Biol. Chem.* 243, 5213.
- SANWALL, B. D. en LATA, M. (1962). Effect of glutamic acid on the formation of two glutamic acid dehydrogenases of *Neurospora*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 6, 404.
- SCHER, W. I. en VOGEL, H. J. (1957). Occurrence of ornithine- δ -transaminase: a dichotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 43, 796.
- SCHNEIDER, W. C. (1945). Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxyxypentose nucleic acid and of pentose nucleic acid. *J. Biol. Chem.* 161, 293.
- SCHWENCKE, J. en MAGAÑA-SCHWENCKE, N. (1969). Derepression of a proline transport system in *Saccharomyces chevalieri* by nitrogen starvation. *Biochim. Biophys. Acta* 173, 302.
- SCHOPMAN, W. (1953). Over glutamal-5, aspartal-4 en hiervan afgeleide peptiden. *Acad. Proefschrift, Utrecht*, p. 181.
- SHAFAI, T. en LEWIN, L. M. (1968). Effects of myoinositol deficiency upon the lipid composition of the yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, 152, 787.
- SHILS, M. E. en MCCOLLUM, E. V. (1943). Further studies on the symptoms of manganese deficiency in the rat and mouse. *J. Nutrition* 26, 1.
- SIEGEL, M. R. en SISLER, H. D. (1964a). Site of action of cycloheximide in cells of *Saccharomyces pastorianus*. I. Effect of the antibiotic on cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 87, 70.
- SIEGEL, M. R. en SISLER, H. D. (1964b). Site of action of cycloheximide. II. The nature of inhibition of protein synthesis in a cell-free system. *Biochim. Biophys. Acta* 87, 83.
- SMITH, S. E. en ELLIS, G. H. (1947). Studies on the manganese requirement of rabbits. *J. Nutrition* 34, 33.
- SPIEGELMAN, S., HALVORSON, H. O. en BEN-ISHAÏ, R. (1955). Free amino acids and the enzyme-forming mechanism. in: A symposium on amino acid metabolism, (McELROY, W. D. en GLASS, H. B., ed.), John Hopkins Press, Baltimore, p. 124.
- SPIEGELMAN, S. en REINER, J. M. (1947). The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate. *J. gen. Physiol.* 31, 175.
- STALON, V., RAMOS, F., PIÉRARD, A. en WIAME, J. M. (1967). The occurrence of a catabolic and an anabolic ornithine transcarbamoylase in *Pseudomonas*. *Biochim. Biophys. Acta* 139, 91.
- STENT, G. S. (1964). The operon: on its third anniversary. *Science* 144, 816.
- STOCK, C. C., PERKINS, M. E. en HELLERMAN, L. (1938). Activation of enzymes. IV. The jack bean arginolytic enzyme. *J. Biol. Chem.* 125, 753.
- STUMPF, P. K. en GREEN, D. F. (1944). L-Amino acid oxidase of *Proteus vulgaris*. *J. Biol. Chem.* 153, 387.
- SYLVEN, B., TOBIAS, C. A., MALMGREN, H., OTTOSON, R. en THORELL, B. (1959). Cyclic variations in the peptidase and cathepsin activities of yeast cultures synchronized with respect to cell multiplication. *Exper. Cell Research* 16, 75.
- TAURO, P. HALVORSON, H. O. en EPSTEIN, R. L. (1968). Time of gene expression in relation to centromere distance during the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 59, 277.

- THOAI, N. V., ROBIN, Y. en PRADEL, L. A. (1957). Métabolisme oxydatif de la L-arginine chez la limnée, *Limnaea stagnalis* L. II. Oxydation en guanidinobutyramide. *Compt. rend. Soc. Biol. (Paris)* 151, 2097.
- THOAI, N. V., THOMÉ-BEAU, F. en PHO, O. B. (1962). Rôle biologique de la γ -guanidobutyramide chez *Streptomyces griseus*. *Biochim. Biophys. Acta* 63, 128.
- TREVELYAN, W. E. en HARRISON, J. S. (1952). Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* 50, 298.
- TUSTANOFF, E. R. en BARTLEY, W. (1964). Development of respiration in yeast grown anaerobically on different carbon sources. *Biochem. J.* 91, 595.
- VALLEE, B. L. (1955). Zinc and metalloenzymes. *Adv. Protein Chem.* 10, 317.
- VAN DAM, G. J. W., BLOEMERS, H. P. J., HARTLIEF, R., VAN DE MEENE, J. G. C., VAN DE POLL, K. W., VAN DER SAAG, P. T. M. en KONINGSBERGER, V. V. (1965). The regulation of induced α -glucosidase synthesis by protoplasts of *Saccharomyces carlsbergensis*. I. Experimental results and a working hypothesis. *Proc. Koninkl. Nederland. Akad. Wetenschap. B* 68, 218.
- VAN T RIET, J., STOUTHAMER, A. H. en PLANTA, R. J. (1968). Regulation of nitrate assimilation and nitrate respiration in *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 96, 1455.
- VOGEL, H. J. en BONNER, D. M. (1954). On the glutamate-proline-ornithine interrelation in *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 40, 688.
- VOGEL, H. J. en BONNER, D. M. (1956). Acetylornithinase of *Escherichia coli*: partial purification and some properties. *J. Biol. Chem.* 218, 97.
- WALKER, J. B. (1958). Further studies on the mechanism of transamidinase action: transamidination in *Streptomyces griseus*. *J. Biol. Chem.* 231, 1.
- WITT, I., KRONAU, R. en HOLZER, H. (1966). Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. *Biochim. Biophys. Acta* 118, 522.
- WULFZ, K., MECKE, D. en HOLZER, H. (1967). Mechanism of the enzymatic inactivation of glutamine synthetase from *E. coli*. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 28, 740.
- YARBROUGH, H. F. en CLARK, F. M. (1957). Utilization of inositol, an essential metabolite for *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 73, 318.

Op verzoek van de Senaat der Rijksuniversiteit te Utrecht volgen hier enkele persoonlijke gegevens:

De schrijver van dit proefschrift ging, na het behalen van het eindexamen aan de Christelijke Hogere Burgerschool te Veenendaal, in september 1952 scheikunde studeren aan de Rijksuniversiteit te Utrecht. Het kandidaatsexamen, richting g (+ f), werd behaald op 19 maart 1956, het doctoraal examen met bijvakken biochemie en bacteriologie op 5 oktober 1959.

De daarop volgende periode werd in militaire dienst doorgebracht. Het grootste deel van die tijd was de schrijver van dit proefschrift verbonden aan de Sectie Praeventieve Geneeskunde van de Inspectie Militair Geneeskundige Dienst. Hij was gedetacheerd bij het Laboratorium voor Medische Microbiologie der Rijksuniversiteit te Leiden, waar door hem een onderzoek werd uitgevoerd over de bepaling van neutraliserende antilichamen van vaccinia-virus in serum.

Sinds 1 oktober 1961 is hij verbonden aan de Afdeling Microbiologie der Landbouwhogeschool te Wageningen, waar het in dit proefschrift vermelde onderzoek werd uitgevoerd. Op 18 december 1965 werd hem voor dit werk door de Nederlandse Vereniging voor Microbiologie de Kluyver-prijs toegekend. Sinds 1 oktober 1968 heeft hij de rang van wetenschappelijk hoofdmedewerker.