



## UvA-DARE (Digital Academic Repository)

### Physiological responses of carbon fluxes to deletion of specific genes in *Saccharomyces cerevisiae*.

Raamsdonk, L.M.

**Publication date**  
2000

[Link to publication](#)

#### **Citation for published version (APA):**

Raamsdonk, L. M. (2000). *Physiological responses of carbon fluxes to deletion of specific genes in Saccharomyces cerevisiae*.

#### **General rights**

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

#### **Disclaimer/Complaints regulations**

If you believe that digital publication of certain material infringes any of your rights or (privacy) interests, please let the Library know, stating your reasons. In case of a legitimate complaint, the Library will make the material inaccessible and/or remove it from the website. Please Ask the Library: <https://uba.uva.nl/en/contact>, or a letter to: Library of the University of Amsterdam, Secretariat, Singel 425, 1012 WP Amsterdam, The Netherlands. You will be contacted as soon as possible.

## Samenvatting

Dit proefschrift heeft verschillende onderwerpen behandeld die allen hetzelfde doel hebben: het begrijpen van de regulatie en verdeling van de koolstofluxen in de gist, *Saccharomyces cerevisiae*. Voor dit onderzoek zijn twee genen uitgebreid bestudeerd, *ATP2* en *HXK2*. Het eerste gen codeert voor de katalytische subunit van  $F_1F_0$  ATP synthase. Het  $F_1F_0$  ATP synthase katalyseert de laatste stap in de oxidatieve fosforylering en het koolstofmetabolisme, namelijk de omzetting van vrije energie in het meer handelbare ATP. Het tweede gen, *HXK2*, codeert voor hexokinase II, dat één van de drie enzymen is die de eerste stap in de glycolyse katalyseert, de omzetting van glucose naar glucose-6-fosfaat. Naast de katalytische functie is het aangetoond dat hexokinase een belangrijke rol speelt in de glucose-repressie route. Een derde aspect van dit proefschrift betreft de ontwikkeling van twee technieken om onbekende genen zonder een duidelijk fenotype te kunnen herkennen en identificeren.

Hoofdstuk 1 geeft een introductie over alle onderwerpen die behandeld worden in het proefschrift: 'genomics', koolstofmetabolisme in het algemeen, moleculaire en fysiologische aspecten van glucoserepressie, de daaruit voortkomende veranderingen in de verdeling van de koolstofluxen door de fermentatieve en oxidatieve route. Aanvullend wordt de energetica in relatie tot de oxidatieve fosforylering besproken en wordt Metabole Controle Analyse behandeld.

Het gist-genoom sequentieproject heeft ongeveer zesduizend mogelijke genen of 'open reading frames' (ORFs) in *S. cerevisiae* geïdentificeerd [69]. Met de opvolger van het gist-genoom sequentie project, EUROFAN (European functional analysis network), wordt geprobeerd de functie van honderden onbekende ORFs op te helderen. Meer dan de helft van deze onbekende ORFs gaven geen (duidelijk) fenotype tijdens groei-testen op agar-platen van stammen die elk in één van deze genen waren gedeleteerd [47]. Als een gevolg hiervan is de biologische rol van deze genen een raadsel gebleven. In hoofdstuk 2 worden twee nieuwe technieken beschreven die herkenning van genproducten met een 'zwijgzaam fenotype' oftewel 'silent phenotype' in gist kunnen vereenvoudigen door het meten van veranderingen in metabool profielen van een deletie stam en die te vergelijken met de wilde type stam. De aanpak is in beide gevallen gebaseerd op de gedachte dat de groei van een mutant niet is veranderd juist omdat de concentraties van de intracellulaire metaboliëten zijn veranderd op zo een manier dat er gecompenseerd wordt voor het effect van de mutatie. Dus, mutanten die 'zwijgzaam' zijn op basis van hun metabole fluxen zoals de groeisnelheid, zouden 'luid en duidelijk' moeten zijn als

de metaboliet concentraties worden bekeken.

Hoofdstuk 3 is de respons van de koostof- en energie-fluxen in *S. cerevisiae* als gevolg van een deletie van het *ATP2* gen (dat codeert voor de katalytische  $\beta$ -subunit van het  $F_1F_0$  ATP synthase) bestudeerd. Tijdens groei van deze deletie stam op een overmaat glucose blijven de intracellulaire metabolieten en het groei rendement onveranderd. Niettemin veroorzaakte de deletie van het *ATP2* gen een verlaging van de ademhaling van 10%, een verhoging van de alcohol en glycerolproductie van 15% en een afname van de specifieke groeisnelheid van bijna 20%. Dit toont aan dat  $F_1F_0$  ATP synthase ook onder glucose represserende condities een belangrijke rol speelt in het gist metabolisme maar dat het biomassa-rendement niet meetbaar verandert. In een glucose gelimiteerde continu-cultuur bij een groeisnelheid van  $0.1 \text{ h}^{-1}$  was de glucose consumptiesnelheid meer dan vijf keer hoger in de *atp2* deletie stam vergeleken met het wilde type. Het biomassa-rendement was voor de mutant hetzelfde gebleven als onder de condities waar glucose in overmaat aanwezig was terwijl het biomassa-rendement van de wilde type stam met factor 4.5 toenam.

Voor een kwantitatieve bepaling van de controle van het  $F_1F_0$  ATP synthase op het metabolisme werd in hoofdstuk 4 de activiteit van het enzym gereguleerd door middel van genetische technieken. Het werd duidelijk dat de respons van de specifieke groei snelheid op niet-fermenteerbare koolstofbronnen sterk was en een response coëfficiënt bereikte van 0.9 wat aangeeft dat het enzym een cruciale regulator is van de celfysiologie. De *in vivo* ademhalingsnelheid was afhankelijk van de  $F_1F_0$  ATP synthase met een response coëfficiënt van 0.5. Verassend genoeg leidde de afname in  $F_1F_0$  ATP synthase activiteit niet tot een afname in ATP concentratie in de cel. Een afname van de ATP productie door het toevoegen van ontkoppelaar aan wilde type cellen leidde tot het zelfde resultaat: geen effect op de intracellulaire ATP concentratie terwijl de specifieke groeisnelheid afnam. Nu was de ademhalingsnelheid verhoogd door de verlaagde *proton motive force* over het mitochondriale membraan. De intracellulaire pH was bovendien 0.5 eenheden lager in een stam met een verlaagde  $F_1F_0$  ATP synthase activiteit. Mogelijkerwijs wordt de snelheid van ATP hydrolyse door het plasma membraan ATPase verlaagd zodat de cellulaire ATP concentratie constant blijft wat verzuring van het cytosol tot gevolg heeft. Daarbij is het te verwachten dat een afname van de intracellulaire pH de metabole fluxen zal verlagen.

In de volgende hoofdstukken zijn de fysiologische gevolgen van de deletie van een ander interessant gen dat betrokken is bij koolstofmetabolisme, bestudeerd, namelijk, *HXK2*. In hoofdstuk 5A werd het duidelijk dat een in glucose overmaat, batch gegroeide *hvk2* deletie stam volledig oxidatief groeit tijdens de vroege en mid-exponentiële fase terwijl het wilde type hoofdzakelijk fermentatief groeit als gevolg van de glucose-repressie. Als gevolg van het

oxidatieve metabolisme was het biomassa-rendement erg hoog en de ethanolproductie erg laag. Ondanks de lagere specifieke groeisnelheid van de *hxx2* deletie stam ( $0.32 \text{ h}^{-1}$  versus  $0.39 \text{ h}^{-1}$  voor het wilde type) had de *hxx2* deletie stam de beschikbare koolstofbronnen eerder verbruikt dan het wilde type. Dit is een gevolg van de snellere *diauxic* shift in de *hxx2* deletie stam door het gederepseerde metabolisme en de relatieve korte periode van groei op ethanol door de sterk gereduceerde alcoholische fermentatie.

In Hoofdstuk 5B is de fysiologie van de *hxx2* deletiestam verder bestudeerd in glucose gelimiteerde continu culturen. Tot onze verassing bleek de *hxx2* deletie stam een snellere maximale, specifieke groeisnelheid te hebben dan het wilde type ( $0.46 \text{ h}^{-1}$  en  $0.40 \text{ h}^{-1}$  respectievelijk). De kritische specifieke groeisnelheid bleek ook verhoogd vergeleken met het wilde type ( $0.35 \text{ h}^{-1}$  en  $0.29 \text{ h}^{-1}$  respectievelijk). Dit toont aan dat de deletie van het *HXX2* gen een verhoogde oxidatieve capaciteit tot gevolg heeft. De discrepantie tussen de specifieke maximale groeisnelheid van de *hxx2* deletie stam in batches ( $0.32 \text{ h}^{-1}$ ) en in continu cultures ( $0.46 \text{ h}^{-1}$ ) lijkt veroorzaakt te worden door het verschil in de residuele glucose concentratie maar dit moet nog verder onderzocht worden.

Omdat de glucose repressie in de *hxx2* deletiestam sterk afgenomen lijkt hebben we in hoofdstuk 6 de fysiologie op gemengde koolstof bronnen bestudeerd. De *hxx2* deletie stam bleek niet alleen in staat om sucrose/glucose en galactose/glucose te co-consumeren maar ook glucose en ethanol werden gecoco-consumeerd. Dit toont aan dat het ethanol catabolisme en misschien zelfs de gluconeogenese gederepseerd zijn.

Het laatste experimentele hoofdstuk (hoofdstuk 7), behandelt de vraag naar biotine van de *hxx2* deletie stam. DNA array data toonden aan dat de genen die betrokken zijn bij de biotine opname en metabolisme erg sterk tot overexpressie kwamen in deze mutant. Dit suggereerde dat er een biotine tekort zou zijn in deze cultures. De toevoeging van extra biotine aan het medium bleek inderdaad de groeisnelheid te verhogen en de alcoholproductie verder te verlagen (-40%). Biotine is een co-factor voor verschillende carboxylerende enzymen zoals pyruvaat carboxylase en acetyl CoA-carboxylase. De activiteit van deze enzymen neemt af als er een biotine tekort is waardoor vermoedelijk de intracellulaire pyruvaat concentratie omhoog gaat wat de fermentatie initieert en de specifieke groeisnelheid verlaagd.

