



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Physiological functions of hexose transport and hexose phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae*.

Diderich, J.A.

Publication date
2001

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

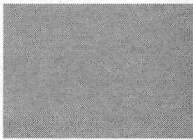
Diderich, J. A. (2001). *Physiological functions of hexose transport and hexose phosphorylation in Saccharomyces cerevisiae*. Ipskamp BV.

General rights

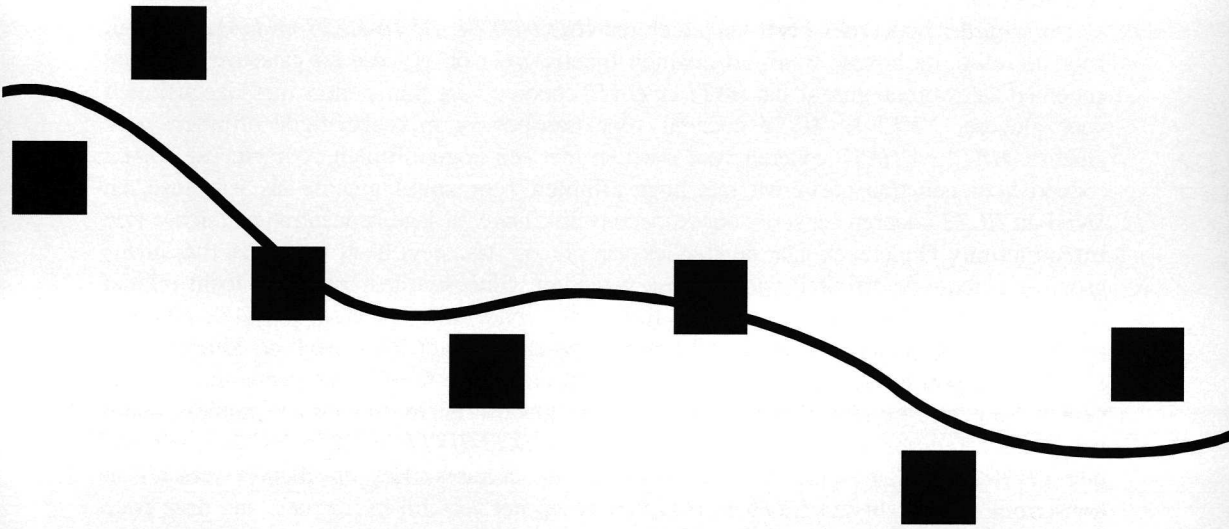
It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other than for strictly personal, individual use, unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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



Fysiologische functies van hexose transport en hexose fosforylatie in *Saccharomyces cerevisiae*

De gist *S. cerevisiae* is een eencellige schimmel die kan groeien op een verscheidenheid aan suikers. Dit proefschrift behandelt aspecten van de fysiologische functie van de eerste twee stappen van hexose metabolisme, in het bijzonder die van glucose. De eerste stap van hexose metabolisme is het transport over de plasmamembraan. Dit proces wordt gefaciliteerd door eiwitten uit de familie van hexose transporters. Deze worden gecodeerd door de *HXT* genen en het *GAL2* gen (Chapters 2-5). In de tweede stap van hexose metabolisme wordt de opgenomen hexose gefosforyleerd tot hexose-6-fosfaat door hexokinase I, hexokinase II, of glucokinase. Hexokinase II is, naast zijn rol in hexose fosforylatie, betrokken bij glucose repressie, en daarbij in de regulatie van de samenstelling van het interne cel mechanisme (Chapters 5-8).

Hexose transport

De sequentie van het gehele gistgenoom onthulde 20 homologen van hexose transporter genen. Deze zijn benoemd als *HXT1-HXT17*, *GAL2*, *SNF3*, en *RGT2*. De overvloed aan mogelijke hexose transporters roept sterk de vraag op of de afzonderlijke transporters een specifieke functie in de cel hebben.

Eerder onderzoek heeft laten zien dat *HXT1-HXT4*, *HXT6-HXT7* en *GAL2* coderen voor de relevante hexose transport eiwitten tijdens groei op glucose en galactose. Globaal genomen kan worden gezegd dat *HXT1* en *HXT3* coderen voor transporters met lage affiniteit voor glucose, *HXT2* en *HXT4* coderen voor transporters met gematigde affiniteit voor glucose, *HXT6* en *HXT7* coderen voor eiwitten met een hoge affiniteit voor glucose, *GAL2* codeert voor een transport-eiwit met hoge affiniteit voor zowel glucose als galactose, en *SNF3* en *RGT2* coderen sensors voor respectievelijk hoge en lage concentraties glucose (zie **Introduction**). Onderzoek naar de kinetiek van glucose-transport heeft laten zien dat tijdens groei op glucose de affiniteit voor glucose verandert. Glucose transport in gist toont relatief lage affiniteit voor glucose tijdens groei bij een hoge concentratie glucose, terwijl de affiniteit toeneemt als de glucose opraakt. **Chapter 2** beschrijft onderzoek naar de kinetiek van glucose transport en de transcriptie van alle 20 leden van de familie van genen die coderen voor hexose transporters, tijdens batch groei op glucose en in chemostaat cultures onder verschillende nutriënt limitaties. De transcriptie van *HXT1-HXT4* en *HXT6-HXT7* correleerde met de extracellulaire glucose concentratie in de cultures. Het opvallende verschil in transcriptie-patroon tussen *HXT6* en *HXT7*, wijst op het verschil in regulatie van deze twee vrijwel identieke hoge-affiniteits glucose transporters. Onder verschillende condities kon transcriptie van *HXT8-HXT17* worden aangetoond, echter op een erg laag niveau. Dit suggereert dat de eiwitten gecodeerd door deze genen geen grote bijdrage leveren aan hexose transport. Alleen in galactose-gelimiteerde cultures werd *GAL2* mRNA gedetecteerd; wat laat zien dat *GAL2* transcriptie moet worden geïnduceerd door galactose. Transcriptie van *SNF3* and *RGT2*, de twee leden van de *HXT* familie die coderen voor glucose sensors, was laag en niet duidelijk gecorreleerd aan de extracellulaire glucose concentratie. Dit suggereert dat het 'sensing' mechanisme zelf niet wordt gereguleerd door de extracellulaire glucose concentratie. De kinetiek van glucose transport was globaal in overeenstemming met de aanwezige hexose en galactose transporters, zoals voorspeld uit het transcriptie-patroon van de *HXT*-genen. Verder leek de residuele glucose concentratie in aërobe glucose gelimiteerde cultures onafhankelijk van de verdunningssnelheid (D), pas rond de kritieke

verdunningsnelheid nam de residuele glucose concentratie toe. Bij lagere verdunningsnelheden was de glucose transport capaciteit, berekend uit de zero *trans*-influx experimenten en de residuele glucose concentratie, hoger dan de gemeten *in situ* glucose consumptie snelheid. Dit wijst erop dat de glucose transport activiteit onder deze omstandigheden (negatief) wordt beïnvloed, bijvoorbeeld door de aanwezigheid van intracellulaire glucose. Echter, bij hogere verdunningsnelheden was de berekende glucose transport capaciteit te laag om de *in situ* glucose consumptie snelheid te kunnen verklaren. Onjuistheden in de bepaling van de component van glucose transport met lage affiniteit, lijken hierbij betrokken.

Tijdens het onderzoek zoals beschreven in **Chapter 2** werden verschillende condities gevonden waar het tot dan toe ongekaracteriseerde hexose transporter homoloog *HXT5* werd getranscribeerd. Tijdens batch groei op glucose was transcriptie van *HXT5* overvloedig na glucose depletie. Verder was *HXT5* mRNA aanwezig in langzaam groeiende cellen, i.e. bij lage verdunningsnelheden in glucose gelimiteerde cultures, en tijdens (langzame) groei op koolstofbronnen anders dan glucose (in ethanol-, fructose- en galactose-gelimiteerde cultures). Onder condities van ethanol-limitatie was *HXT5* de voornaamste zo niet enige van de getranscribeerde *HXT* genen. Opmerkelijk was de aanwezigheid van glucose in het supernatant van de ethanol-, fructose- en galactose-gelimiteerde cultures. Deze resultaten suggereren dat *HXT5* codeert voor ten eerste: een 'reserve' hexose transporter, omdat deze aanwezig was in afwezigheid van glucose, wellicht om glucose snel te kunnen transporteren als het beschikbaar komt, en ten tweede: een 'reverse' (tegengestelde) transporter, omdat er (uit de cel getransporteerde) glucose werd gevonden tijdens groei op koolstofbronnen anders dan glucose en *HXT5* transcriptie relatief gezien hoog was onder deze omstandigheden.

In **Chapter 3** wordt onderzoek beschreven naar het patroon van expressie en de mogelijke rol van *HXT5* in de fysiologie van gist. Door middel van Northern blot analyse van *HXT5* transcriptie en onderzoek met een stam waar *HXT5* was gefuseerd met het 'green fluorescent protein' (GFP) werd duidelijk dat *HXT5* tot expressie komt onder condities van langzame groei, sporulatie, en tijdens groei op niet-fermenteerbare koolstof-bronnen.

De kinetische parameters van het eiwit gecodeerd door *HXT5* werden bepaald in de zogenaamde RE605 stam, een stam die geen van de *HXT1-HXT4* of *HXT6-HXT7* genen bezit (de genen die coderen voor de belangrijkste hexose transporters). *HXT5* codeert een functionele hexose transporter, met gematigde affiniteit voor glucose ($K_m = 10$ mM), gematigde tot lage affiniteit voor fructose ($K_m = 40$ mM) en vrijwel geen affiniteit voor mannose. De RE700 stam, die geen van de *HXT1-HXT7* genen bezit, toont geen hexose opname tijdens 5s opname studies.

Ondanks het duidelijke bewijs dat Hxt5, als hexose transporter aanwezig is, wanneer glucose schaars of afwezig is, leidde deletie van *HXT5* niet tot een duidelijk fenotype. Echter, als cellen uit de stationaire fase, waar Hxt5 hoog tot expressie komt in wilde type cellen, werden voorzien van vers glucose medium, werd een langere vertraging in opstarten van groei waargenomen in de stam met de *HXT5* deletie dan in de wilde type stam. Verder leek het verse glucose medium in de *hxt5* deletie stam te leiden tot groei in de vorm van pseudohyphae. Echter, de exacte rol van het product van *HXT5* blijft onduidelijk.

In het verleden is glucose transport vaak beschreven als een snelheidsbepalende stap van de glycolyse. In **Chapter 4** wordt beschreven hoe door middel van Metabole Controle Analyse

(MCA) de controle van het transport van glucose over de plasmamembraan op de glycolytische flux kan worden bepaald. Dit is gedaan voor één bepaalde situatie, namelijk het moment van glucose depletie in cellen van *S. bayanus* tijdens batch groei op glucose.

De bepaling van een flux controle coëfficiënt vereist dat de activiteit van de betreffende component kan worden gemoduleerd. De glucose transport activiteit is op twee manieren gemoduleerd: i) door remming van het glucose transport door middel van maltose, een competitieve remmer van glucose transport zowel in de gist *S. cerevisiae* als in *S. bayanus*, ii) door modulatie van de concentratie van het substraat van glucose transport, extracellulaire glucose. De respons van de glycolytische flux op deze modulaties werd experimenteel bepaald en de elasticiteit van de transport stap ten aanzien van extracellulaire glucose werd afgeleid. De flux controle coëfficiënt werd vervolgens afgeleid als ratio van de respons- en elasticiteits-coëfficiënten. Deze benadering en een directe vergelijking tussen de 'steady-state' glycolytische flux en de zero *trans*-influx van glucose lieten zien dat in cellen van het type *S. bayanus*, gegroeid op glucose en geoogst op het moment van glucose depletie, een aanzienlijk deel van de controle over de glycolytische flux in het transport van glucose over de plasma membraan berust.

Regulatie van metabolisme door hexokinase II

Glucose repressie in gist is een mechanisme van regulatie dat verantwoordelijk is voor de repressie van transcriptie van genen die coderen voor enzymen betrokken bij oxidatieve groei en het metabolisme van koolstofbronnen anders dan glucose. Hierdoor geniet glucose de voorkeur als koolstofbron en is het metabolisme van glucose fermentatief in de aanwezigheid van zuurstof. Naast een belangrijke rol in het metabolisme van hexose, speelt hexokinase II een aanzienlijke rol in het mechanisme van glucose repressie.

In het verleden en in **Chapter 2** is laten zien dat hoge-affiniteits glucose transport wordt gerepresseerd door hoge concentraties glucose door het mechanisme van glucose repressie waar hexokinase II bij betrokken is. In **Chapter 5** werd bepaald wat het effect is van de expressie van verschillende hexokinases op de kinetiek van glucose transport en de mate van transcriptie van de belangrijkste hexose transporter genen *HXT1-HXT7*. Het onderzoek bevestigde dat deletie van het *HXK2* gen, de repressie van hoge-affiniteits glucose transport bij hoge concentraties glucose tegengaat. Verder werd gevonden dat in vergelijking met het wilde type, de hoge-affiniteits component correleert met verhoogde transcriptie van de hoge-affiniteits transporter genen *HXT2* en *HXT7*, en een verminderde transcriptie van de lage-affiniteits genen *HXT1* en *HXT3*. Deletie van *HXT7* in de *HXK2* gedeleteerde stam liet zien dat de hoge-affiniteits component voor het grootste deel kon worden toegeschreven aan *HXT7*, echter een niet eerder geïdentificeerde component met een heel hoge affiniteit voor glucose ($K_m = 0.24$ mM) werd veroorzaakt door andere factoren, wellicht *HXT2*.

Hexokinases uit de 'niet-conventionele' gisten *Schizosaccharomyces pombe* of *Yarrowia lipolytica* waren in staat de repressie van het hoge-affiniteits glucose transport te herstellen in een drievoudige hexokinase deletie stam (*hvk1 hvk2 glk1*). Dit wijst erop dat de werking van hexokinase II in glucose repressie in stand is gehouden tijdens evolutie.

Tijdens het onderzoek zoals beschreven in **Chapter 5** werd het duidelijk dat de afwezigheid van hexokinase II de fysiologie van *S. cerevisiae* in belangrijke mate beïnvloedt (**Chapters 6-8**).

Chapter 6 beschrijft het effect van de deletie van *HXK2* op de verdeling en richting van metabole fluxen, de activiteiten van enzymen, en de concentratie van intracellulaire metabolieten, tijdens batch groei op glucose. De *hxx2* deletie stam toonde grote verschillen in intracellulaire eigenschappen ten opzichte van de wilde type stam in aërobe batch cultures op glucose, zoals verhoogde mitochondriale activiteiten en veranderde enzym activiteiten rond pyruvaat. Dit resulteerde in volledig oxydatief metabolisme tijdens vroeg exponentiele groei, of in andere woorden, in eerste instantie volledige afwezigheid van fermentatie (ethanol productie), een uitgestelde en verkorte 'diauxic shift' (overgang van groei op glucose naar groei op ethanol), en een hogere opbrengst aan biomassa.

Het effect van de deletie van hexokinase II op *S. cerevisiae* in continu cultures wordt beschreven in **Chapter 7**. Metabole fluxen waren identiek bij lagere verdunningssnelheden in glucose-gelimiteerde aerobe cultures van de wilde type *S. cerevisiae* stam CEN.PK113-7D en de afgeleide *hxx2* deletie stam. Interessant was het feit dat de *hxx2* deletie stam pas bij een hogere verdunningssnelheid ethanol produceerde en een hogere maximale groeisnelheid vertoonde. Een puls van glucose aan de steady-state aërobe glucose gelimiteerde chemostaat cultures resulteerde in gelijke metabole fluxen in beide stammen. Echter de concentraties van verschillende intracellulaire metabolieten waren duidelijk verschillend. Dit suggereert dat hexokinase II niet is betrokken bij de controle over de glycolytische flux onder deze condities, maar wel dat de verschillen in kinetische eigenschappen van glucose fosforylatie leiden tot verschillen in concentraties van intracellulaire metabolieten bij identieke fluxen.

In **Chapter 8** wordt beschreven dat een *hxx2* deletie stam verschillende koolstofbronnen tegelijkertijd kan consumeren, i.e. glucose in combinatie met sucrose, ethanol of galactose; in tegenstelling tot een wilde type stam waar enzymen betrokken in de eerste stappen van het metabolisme van koolstofbronnen anders dan glucose gerepresseerd zijn, en glucose eerst volledig moet zijn opgebruikt voor andere aanwezige koolstofbronnen worden geconsumeerd.

