



UvA-DARE (Digital Academic Repository)

Regulation of pyruvate catabolism in *Escherichia coli*: the role of redox environment

de Graef, M.R.

Publication date
1999

[Link to publication](#)

Citation for published version (APA):

de Graef, M. R. (1999). *Regulation of pyruvate catabolism in Escherichia coli: the role of redox environment*.

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

Bacteriën beschikken over een enorme capaciteit om hun metabolisme aan te passen aan een immer veranderende omgeving. Om continuering van energieconservering te garanderen, is het noodzakelijk om het catabolisme snel aan te passen aan de veranderende omgeving. *Escherichia coli*, een Gram negatieve bacterie, kan verschillende catabolische modes gebruiken: ademhaling, anaerobe ademhaling en fermentatie. Pyruvaat is het sleutelintermediair in energie-omzetting, daar de koolstof fluxen worden gesplitst vanaf dit intermediair. In dit proefschrift richten we ons op het pyruvaat dehydrogenase complex (PDHc). Dit multi-enzym complex katalyseert onder aerobe condities de omzetting van pyruvaat in acetyl-CoA en NADH, het wordt geactiveerd door pyruvaat en is gevoelig voor NADH. Zijn anaerobe tegenhanger, pyruvaat formiaat lyase (PFL), katalyseert ook de splitsing van pyruvaat in acetyl-CoA, maar zonder NADH productie, tevens is dit enzym zeer gevoelig voor zuurstof. Dit proefschrift tracht de rol van de redoxomgeving op de diverse niveaus van de regulatie van pyruvaat catabolisme op te helderen. Steady states werden bestudeerd, met verschillende electronenacceptoren aan het medium toegevoegd om de externe redoxpotentiaal te manipuleren (hoofdstuk 2) of door het veranderen van de beschikbaarheid van zuurstof en aldus de externe redoxpotentiaal te variëren (hoofdstuk 3). Deze experimenten zijn gedaan om de regulatie te bestuderen op zowel het niveau van enzym synthese als op het niveau van enzymactiviteit. Experimenten met steady state cultures van een wild type *E. coli*, een PFL mutant en een PDHc mutant lieten zien dat het PDHc actief kan zijn onder anaerobe condities, mits een externe electronacceptor (nitraat of fumarate) aan het medium is toegevoegd. Bovendien was de flux door het PDHc gecorreleerd aan de NADH/NAD ratio van de cultures en de flux wordt gereguleerd door zowel genexpressie als enzymactiviteit (hoofdstuk 2). Deze zelfde correlatie met de NADH/NAD ratio kon worden gezien, wanneer *E. coli* werd gecultiveerd bij verschillende opgeloste-zuurstofspanningen (DOT), hoewel alleen bij $\text{DOT} < 1$: de NADH/NAD ratio stijgt bij afnemende DOT. Geheel onverwacht bleek bij lage DOT waarden een flux te kunnen worden gemeten door het PFL, hoewel dit enzym zeer gevoelig is voor zuurstof. Waarschijnlijk wordt bij deze hoge NADH/NAD ratio's het PDHc geblokkeerd en zal de intracellulaire

zuurstofconcentratie laag genoeg zijn voor het PFL om te functioneren (hoofdstuk 3)

Om de directe effecten op de kinetiek van het PDHc te bestuderen, transient cultures werden bestudeerd gedurende een omschakeling van aerobe naar anaerobe omstandigheden en vice versa. Na een omschakeling van aerobe naar anaerobe omstandigheden waren de cellen in staat om onmiddellijk de anaerobe routes te activeren (inclusief het zuurstof gevoelige PFL). PDHc activiteit werd onmiddellijk geblokkeerd en wederom een afname in PDHc was gecorreleerd met de NADH/NAD ratio, welke scherp steeg gedurende de omschakeling. De ATP/ADP ratio zakte momentaan en dit veroorzaakte een stijging van het linkingnummer van het DNA. Gedurende de omgekeerde omschakeling waren de cellen niet in staat om direct het aerobe catabolisme uit te voeren, zoals kon worden gezien aan de uitscheiding van pyruvaat. De NADH/NAD ratio ging langzamer omlaag als de stijging gedurende de omschakeling van aerobe naar anaerobe condities. De ATP/ADP ratio reageerde op een complexe wijze, eerst steeg de ratio snel om vervolgens na enkele minuten naar het steady state niveau te dalen. Het linkingnummer van het DNA liet een omgekeerde trend zien, vergeleken met de ATP/ADP ratio. (Hoofdstuk 4). Het PDHc van *E. coli* is niet actief onder volledig anaerobe condities, als gevolg van het feit dat het enzym zeer gevoelig is voor NADH.

Desalniettemin is het enzym aanwezig onder anaerobe condities. De verschillen in gevoeligheid voor NADH van diverse bacteriën verklaren de verschillen in catabole eindproducten onder verschillende condities.

Enterococcus faecalis, bijvoorbeeld, heeft een PDHc, dat veel minder gevoelig voor NADH dan het PDHc van *E. coli*, de E3 subunit (lipoamide dehydrogenase) van het enzymcomplex is verantwoordelijk voor deze gevoeligheid. In hoofdstuk 5 wordt het cloneren en sequencen van E3 subunit van het PDHc van *E. faecalis* beschreven. Door dit relatief ongevoelige PDHc te cloneren kan men to beter begrip komen van het mechanisme dat tot inhibitie door NADH leidt.

De link tussen catabolisme en de NADH/NAD ratio is een duidelijke link, maar nog niet volledig begrepen. De correlatie tussen de in vivo activiteit van het PDHc van *E. coli* en de NADH/NAD ratio komt naar voren in hoofdstuk 2, 3 en 4. Bovendien blijkt dat de NADH/NAD ratio een reflectie vormt van de externe redoxcondities (bijv. aerob, anaerob). We heb tot

nu toe nog niet het moleculair mechanisme opgehelderd dat aan de regulatie door de NADH/NAD ratio ten grondslag ligt. In hoofdstuk 6 wordt een model gepresenteerd welke strategieën in *E. coli* zijn ontwikkeld om zich effectief aan verschillende redox gerelateerde condities aan te passen en om adequaat hierop te reageren.