



**UvA-DARE (Digital Academic Repository)**

**The effect of altered expression of transcriptional regulators of catabolism on the transcription profile and physiology of *Saccharomyces cerevisiae***

Schuurmans, J.M.

[Link to publication](#)

*Citation for published version (APA):*

Schuurmans, J. M. (2008). *The effect of altered expression of transcriptional regulators of catabolism on the transcription profile and physiology of *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

*S. cerevisiae*, beter bekend als bakkersgist, is een eencellige schimmel die in de natuur groeit op rottend fruit. Deze gist wordt veel gebruikt bij de bereiding van bijvoorbeeld bier, brood (vandaar de naam) en wijn. Ook wordt deze gist veel gebruikt als model organisme voor andere eukaryote cellen, zoals dierlijke cellen. Sinds 1996 is het hele genoom van deze gist bekend, wat het mogelijk maakte om gebruik te maken van informatie op DNA en RNA niveau. Bij de productie van bier, brood en wijn is het belangrijk dat bakkersgist voldoende alcohol en koolstofdioxide produceert. Om deze redenen is er veel onderzoek gedaan naar het primaire suiker metabolisme en de regulatie hiervan, vooral ook om zo de produktie te verbeteren. Hierdoor is er al veel bekend over het complexe netwerk dat de opname en het gebruik van bepaalde suikers reguleert. In de introductie (**Hoofdstuk 1**) wordt uitgelegd wat er bekend is over dit complexe netwerk. Bakkersgist heeft een voorkeur voor glucose (druivesuiker). Als er glucose aanwezig is zorgt dit voor een reactie in de gist zodat eerst de glucose wordt geconsumeerd, dit mechanisme wordt glucose repressie genoemd. Bakkersgist is ook een Crabtree positieve gist, dit houdt in dat zelfs in de aanwezigheid van voldoende zuurstof, de gist bij hoge glucose hoeveelheden alcohol maakt. Dit is handig voor de produktie van bijvoorbeeld bier, maar zorgt er wel voor dat de biomassa opbrengst niet optimaal is. Het onderzoek dat beschreven wordt in dit proefschrift (**Hoofdstuk 2, 3 en 4**) karakteriseert in detail de effecten van twee specifieke regulatoren die betrokken zijn bij de balans tussen fermentatie van suikers enerzijds en respiratie van suikers anderzijds. Kennis van het mechanisme en het kwantitatieve effect van de regulatie hiervan kan ons manieren verschaffen om de prestaties van gist te verbeteren.

Eerst is er gekeken naar een *HXK2* deletie, een *HAP4* overexpressie mutant en een dubbelmutant die beide mutaties bevat, onder niet gelimiteerde batch condities (**Hoofdstuk 2**). Op fysiologisch niveau tonen beide stammen en de dubbelmutant (een combinatie van de twee) alledrie een verschuiving naar meer respiratie. De *HXK2* deletie mutant groeit langzamer, maar de biomassa opbrengst is een stuk hoger, door een reductie in fermentatie snelheid. Op gen expressie niveau zijn er veel veranderingen opgetreden in de expressie van genen, die nodig zijn voor de citroenzuur cyclus en de oxidatieve fosforylering (de ademhalingsketen). Ook waren er een aantal veranderingen in de expressie van suiker transporters en veranderingen in genen die nodig zijn voor het gebruik van andere suikers. In de *HAP4* overexpressie mutant was ook een toename in de biomassa opbrengst te zien, en deze stam groeide met vrijwel dezelfde snelheid als het wild-type. De veranderingen op gen expressie niveau waren minder wijd verspreid, voornamelijk genen in de citroenzuur cyclus en de ademhalingsketen kwamen meer tot expressie. Ook werd hier een categorie genen gevonden die met de zink huishouding in de cel te maken hebben. Deze kwamen lager tot expressie. De dubbelmutant toonde een combinatie van de twee stammen, met een iets verhoogde groeisnelheid ten opzichte van de *HXK2* deletie stam en een biomassa opbrengst die bijna het theoretische maximum bereikt.

Aangezien deze stammen een verhoogde ademhaling vertonen, kon het zijn dat ze hierdoor minder goed konden fermenteren onder condities waar ademhaling niet gerepresseerd is. Hiervoor werden de stammen getest op hun fermentatieve capaciteit, of anders gezegd hoe goed de gisten alcohol en koolstofdioxide onder anaerobe condities kunnen maken. De twee stammen en het wild-type werden gegroeid in glucose gelimiteerde chemostaat cultures en bij steady-state overgebracht naar anaerobe mini-fermentors waar de snelheid van alcohol productie, met glucose als substraat, gemeten werd (**Hoofdstuk 3**). In de *HAP4* overexpressie mutant werden geen verschillen met het wild-type gevonden, maar in de *HXK2* deletie mutant nam de snelheid van alcohol productie af naarmate de groeisnelheid in de chemostaat hoger was. Daarentegen was de snelheid van alcoholproductie met maltose als substraat in deze mutant, ongeacht de groeisnelheid, hoger dan het wild-type. Om uit te zoeken hoe deze verschillen tot stand komen, is er naar gen-expressie niveau, naar glycolytische enzym activiteit en *in vitro* glucose transport activiteit gekeken. Op gen-expressie niveau was er weinig verschil te zien. Bij de enzym activiteit was er een verlaging van maximale activiteit van hexokinase te zien. Echter de hoeveelheid activiteit die over was in de mutant zou nog steeds voldoende zijn om wild-type fermentatie toe te staan. Ook in suikertransport was er weinig verschil met het wild-type.

De *HAP4* overexpressie mutant is nog verder in detail bekeken onder vier verschillende fysiologische condities (**Hoofdstuk 4**). Deze condities zijn twee glucose overmaat condities, namelijk batch en stikstof gelimiteerd en twee glucose gelimiteerde condities bij twee verschillende groeisnelheden. Van elk van deze condities is gekeken naar het transcriptie profiel. Bij de glucose overmaat condities werden genen die direct onder controle staan van Hap4p gevonden. Bij glucose gelimiteerde condities werden elementen gevonden die onder controle staan van Mig1p en Cat8p, twee regulatoren in de glucose repressie. Ook werden onder veel condities twee categorieën met genen gevonden die onder controle staan van Zap1p en Rsc1p. Rsc1p is een regulator eiwit dat de ijzer huishouding in de cel controleert. Zap1p controleert de zink huishouding. Naar waarom deze categorieën in de analyse naar boven kwamen is voor Zap1p in meer detail gekeken. Het zou te maken kunnen hebben met de expressie van *ADH4*, de enige alcohol dehydrogenase die zink bevat, aangezien de expressie hiervan correleert met in welke mate het Zap1p element werd opgepikt.

Als laatste is de relatie tussen de affiniteit van een organisme voor een bepaald substraat (de Monod konstante) en de affiniteit van het substraat transporterende eiwit gekeken (**Hoofdstuk 5**). Door middel van een theoretisch model, metabole controle analyse en chemostaat experimenten wordt aangetoond dat deze twee konstanten direct aan elkaar gerelateerd kunnen worden. Als het transporterende eiwit volledige controle heeft over het proces dan zijn deze twee konstantes identiek. Wanneer er daarentegen geen volledige controle is dan kan dat leiden tot het resultaat dat de affiniteit van het organisme hoger is dan die van het transporterende eiwit. Door gebruik van glucose gelimiteerde chemostaten en glucose opname experimenten, is hier aangetoond dat de affiniteit van het organisme meer dan twee keer zo hoog als de affiniteit van de transporter kan zijn. Ook kon de controle van de transporter op de specifieke groeisnelheid bepaald worden.