

University of Groningen

Bacterial sugar transport

Misset, Onno

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

1981

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Misset, O. (1981). *Bacterial sugar transport: Mechanistic studies on the phosphoenolpyruvate dependent phosphotransferase system*. s.n.

Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

SAMENVATTING

Om te kunnen leven moeten bacteriën voedingsstoffen uit het omringende milieu opnemen. Eén van de belangrijkste koolstof- en energiebronnen zijn suikers. De suikermoleculen kunnen echter niet vanzelf de bacterie in diffunderen, maar worden opgenomen met behulp van transportsystemen, welke bestaan uit eiwitmoleculen. De uiteindelijke diffusiebarrière voor de suikers is één van de lagen in de celwand - het cytoplasmatisch membraan. Hierin bevinden zich derhalve de meeste transport eiwitten. Het suikertransportsysteem dat in dit proefschrift is bestudeerd, heeft een bijzondere eigenschap omdat het de suikers niet alleen transporteert over het cytoplasmatisch membraan maar ze ook gelijktijdig fosforyleert. Omdat fosfoenolpyrodruivenzuur (PEP) de fosforylgroepdonor is en op grond van het type reactie, heet het transportsysteem: "PEP-afhankelijke fosfotransferase system", afgekort tot PTS.

Het PTS is niet een enkelvoudig membraangebonden eiwit maar bestaat uit meerdere eiwitten die een keten vormen waarlangs de fosforylgroep van PEP naar de suiker wordt overgebracht. De reden voor deze complexe samenstelling van het PTS moet waarschijnlijk gezocht worden in het feit dat het PTS vele andere metabole processen in de bacterie reguleert. Onder andere het vermogen van de bacterie een PTS-suiker in het milieu te "herkennen" en te zwemmen naar de plaats met de hoogste suikerconcentratie, staat onder invloed van het PTS. Zo ook het selecteren van voedingsstoffen uit het milieu. Suikers welke door het PTS worden getransporteerd hebben voorrang boven andere voedingsstoffen. Dit vereist het onderdrukken van de transportactiviteit voor die andere voedingsstoffen, hetgeen wederom gebeurt door het PTS.

De eiwitten waaruit het PTS bestaat kunnen in twee groepen worden ingedeeld: 1) de suikerspecifieke en 2) de niet-suikerspecifieke. De eerste groep, de enzym-II complexen, bevindt zich in het cytoplasmatisch membraan. Omdat verschillende suikers substraat zijn voor het PTS, zijn er reeds meerdere enzyme II complexen aangetoond die specifiek zijn voor één of meerdere suikers. De niet-suikerspecifieke eiwitten - enzym I en HPr - bevinden zich, naar men aanneemt, in het celsap

van de bacterie. Via enzym I wordt de fosforylgroep van PEP overgedragen op HPr en via het enzym II-complex van fosfoHPr op de suiker die daarbij gelijktijdig getransporteerd wordt over het cytoplasmatisch membraan. Van enzym I staat vast dat het gedurende de reactiecyclus zelf ook wordt gefosforyleerd. Om meer inzicht te krijgen in de rol die het PTS speelt in het metabolisme van de bacterie, is in dit proefschrift het mechanisme van de fosforylgroepoverdracht van PEP op de suiker bestudeerd. Hierbij is gebruik gemaakt van gezuiverd enzym I en HPr en een cytoplasmatische membraanfractie welke het glucose-specifieke enzym II complex bevat. Door nu de snelheid waarmee glucose wordt gefosforyleerd, te meten als een functie van de concentraties van alle componenten (PEP, glucose, enzym I, HPr, en enzym II), kan inzicht worden verkregen in de moleculaire interacties tussen alle componenten.

In Hoofdstuk II staat beschreven dat het actieve enzym I molecuul een dimeer is, bestaande uit twee inactieve monomeren. Onbekend is nog of deze monomeren identiek zijn of niet. Uit experimenten waarin de fosforylering van de suiker werd gemeten, bleek dat het een tijdje duurde (een lag-time) voordat een constante fosforyleringssnelheid werd bereikt. Deze lag-time kon worden toegeschreven aan een langzame associatie van enzym I monomeren tot een actief dimeer. Het theoretische model dat voor de tijdsafhankelijke dimerisatie werd afgeleid (Appendix bij Hoofdstuk II), was ook in overeenstemming met de waargenomen invloed van enzym II, PEP en HPr op de lag-time. De beide vormen van enzym I (monomeer en dimeer), werden ook zichtbaar gemaakt met behulp van molecuulzeef chromatografie. Bij kamertemperatuur elueerde enzym I op een positie met een molecuulgewicht van 67000, terwijl in aanwezigheid van PEP de enzym I piek verschoof naar een positie met een molecuulgewicht van 134000.

In Hoofdstuk III werd gekeken naar de interacties tussen enzym I en zijn beide substraten PEP en HPr. Omdat beide substraten alleen reageren met het dimeer van enzym I en omdat enzym I onder de experimentele condities niet volledig gedimeriseerd was, moesten alle metingen bij verschillende enzym I

concentraties worden uitgevoerd. Het dimeer van enzym I werd mogelijk gemaakt. Uit het vrije enzym I dimeer dimeren, maar ook het met HPr of fosfoHPr en HPr binden dus aan elkaar. In stand, echter over de binding konden geen kwantitatieve andere resultaten hebben. De PTS eiwitten (enzym I, II), wel een membraan-geassocieerd.

In Hoofdstuk IV is de rol van op glucose bestudeerd. Uit dat fosfoHPr eerst het enzym II, daarna het fosfoenzym II werd vertaald in een dimeer. De leerde enzym II vormt in het de suiker. Aan de binnenkant het enzym II waardoor de suiker naar binnen kan. In de "lag-time" fosforylgroep welke door de suikerfosfaat binnen gefosforyleerd enzym II), en kan de overige gegevens in de literatuur voor PTS gekatalyseerd suiker

fosforylgroep van PEP complex van fosfoHPr transporteerd wordt over Enzym I staat vast dat het niet gefosforyleerd. Om de rol van PTS speelt in het mechanisme beschreven in het hoofdschrift het effect van PEP op de suiker transport van gezuiverd enzym I en de fractie welke het glucose-transport nu de snelheid waarmee het als een functie van de concentratie van glucose, enzym I, HPr, en in de moleculaire

het actieve enzym I en de inactieve monomeren. Het kan zijn of niet. Uit de meting van de suiker werd gemeten, de lag-time) voordat een maximale snelheid is bereikt. Deze lag-time is afhankelijk van de associatie van enzym I met de suiker. Het theoretische model dat is afgeleid (Appendix 1) is in overeenstemming met de waargenomen lag-time. De beide lag-times werden ook zichtbaar in de autoradiografie. Bij kamertemperatuur met een molecuulgewicht van PEP de enzym I molecuulgewicht van

de interacties tussen HPr. Omdat beide lag-times afhankelijk zijn van enzym I en omdat de lag-time niet volledig gedimerende verschillende enzym I

concentraties worden uitgevoerd zodat extrapolatie naar 100% dimeren mogelijk werd. Uit de experimenten bleek dat niet alleen het vrije enzym I dimeer door PEP kon worden gefosforyleerd, maar ook het met HPr of fosfoHPr gecomplexeerde dimeer. Enzym I en HPr binden dus aan elkaar, ongeacht hun gefosforyleerde toestand, echter over de bindingssterkte tussen de diverse vormen konden geen kwantitatieve gegevens worden verkregen. Dit en andere resultaten hebben ertoe geleid te veronderstellen dat de PTS eiwitten (enzym I, HPr, enzym II) in de bacterie misschien wel een membraan-geassocieerd complex vormen.

In Hoofdstuk IV is de fosforylgroepoverdracht van fosfoHPr op glucose bestudeerd. Uit de resultaten kon worden afgeleid dat fosfoHPr eerst het enzym II complex fosforyleert en dat daarna het fosfoenzym II met de suiker reageert. Deze conclusie werd vertaald in een model voor transport. Het niet gefosforyleerde enzym II vormt in het membraan een "gesloten deur" voor de suiker. Aan de binnenkant aanwezig fosfoHPr fosforyleert het enzym II waardoor de suiker nu wel door het enzym II complex naar binnen kan. In de "deuropening" bevindt zich echter de fosforylgroep welke door de suiker moet worden meegenomen. Is de suikerfosfaat binnen, dan sluit de deur zich weer (ongefosforyleerd enzym II), en kan de cyclus zich herhalen. Gelet op de overige gegevens in de literatuur, kan dit model als algemeen voor PTS gekatalyseerd suikertransport worden beschouwd.

11164
1981