

University of Groningen

Phosphorylation in the mannitol specific PTS. Aspects of the phosphorylation processes in the mannitol specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) in Escherichia coli.

Dijk, Albertus Alard van

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:

1992

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

Citation for published version (APA):

Dijk, A. A. V. (1992). Phosphorylation in the mannitol specific PTS. Aspects of the phosphorylation processes in the mannitol specific phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system (PTS) in Escherichia coli. 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).

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.

Enzymen zijn eiwitten die specifiek een bepaalde reactie kunnen versnellen (katalyseren). Ze bestaan uit een aantal aminozuren, variërend van enige tientallen tot vele honderden, waarvan meestal slechts een paar betrokken zijn bij de eigenlijke katalyse. Die paar aminozuren zijn gelokaliseerd in een klein gebiedje in het enzym dat het actieve centrum genoemd wordt. De karakterisering hiervan is van essentieel belang voor een goed begrip van de manier waarop het enzym de katalyse bewerkstelligt. Tevens is de structuur van het enzym als geheel van belang. Studies naar de samenhang tussen structuur en functie van enzymen moeten uiteindelijk leiden tot een beter begrip hiervan. Dit proefschrift beschrijft onderzoek dat in het kader van dit soort studies is uitgevoerd. Het richt zich met name op de karakterisering van enzymen die in ons laboratorium gebruikt worden voor het bestuderen van de genoemde structuur/functie relaties. Het betreft de enzymen HPr en IIA^{mtl}; hiervan is HPr een natuurlijk voorkomend enzym maar IIA^{mtl} is van oorsprong een domein van een groter eiwit dat specifiek is voor de opname van mannitol (mtl). Beide behoren tot het bacteriele fosfoenol-pyruvaat afhankelijke transport systeem (PTS). Dit systeem zorgt voor de opname door de bacterie van een aantal koolhydraten vanuit het milieu. Tijdens dit transport wordt aan het koolhydraat een fosforylgroep bevestigd wat voorkomt dat deze de bacterie weer uit kan. De fosforylgroep is afkomstig van fosfoenol-pyruvaat (PEP). De enzymen HPr en IIA^{mtl} zijn betrokken bij het transport van de fosforylgroep van PEP naar het koolhydraat. Deze laatste wordt na opname door de bacterie gebruikt om energie uit te winnen.

Zowel HPr als IIA^{mtl} kunnen gefosforyleerd worden; HPr door een andere PTS component genaamd EI en IIA^{mtl} door HPr. In beide enzymen wordt de fosforylgroep kovalent gebonden aan de imidazoolring van een histidine residu. In **hoofdstuk 1** is het belang van de protonering en de tautomere toestand van deze ring aangegeven, evenals het belang van een eventueel aanwezige waterstofbrug-structuur. In **hoofdstuk 2** wordt beschreven hoe deze drie parameters uit de resonantie-posities van de stikstofkernen in het ¹⁵N NMR spectrum bepaald kunnen worden. De kracht van de techniek ligt met name in het bepalen van de waterstofbrug-structuur zonder een hoge-resolutie-structuur van het eiwit nodig te hebben, iets wat met geen enkele andere techniek mogelijk is. In **hoofdstuk 3** wordt de techniek gebruikt om de histidine in het actieve centrum van HPr te

karakteriseren van dit res
gelokaliseer
waardoor de
wordt gefos
het ¹⁵N NM
de ring ster
deze toestan
verbroken
imidazoolring
verkregen ge
wordt tenslo
actieve centr

Op dezelfde r
centrum van
hoofdstuk 6.
wat geavancee
van 1D ¹⁵N sp
gebruik gema
protonen. In
spektra aanzi
imidazoolring
fysiologische
zijn geen aan
gefosforyleerd
imidazoolring
geprotonoord
waterstofbrug
stikstofkern
gedeprotonoor
In het geval
fosforylerings
positie. Het
actieve cent
konfiguratie
informatie be
we aan, aan

Een ander de
IIA^{mtl}. Hoc
onderling. Vi

karakteriseren. We laten zien dat bij fysiologische pH de imidazoolring van dit residu neutraal is, en dat het proton op de N ϵ 2 positie is gelokaliseerd. Dit proton is betrokken in een sterke waterstof-brug waardoor de orientatie van de imidazoolring gefixeerd wordt. Als HPr wordt gefosforyleerd komt de fosforylgroep op de N δ 1 terecht, wat uit het ^{15}N NMR spektrum afgeleid kan worden. Tegelijk gaat de pK van de ring sterk omhoog waardoor de imidazoolring geprotoneerd is in deze toestand. De waterstofbrug, waarin de N ϵ 2 betrokken was, wordt verbroken door de fosforylering zodat de orientatie van de imidazoolring niet langer hierdoor gefixeerd wordt. Op basis van de verkregen gegevens en andere uit de literatuur bekende gegevens wordt tenslotte een voorstel gedaan voor de konfiguratie van het actieve centrum van HPr.

Op dezelfde manier als voor HPr wordt ook de histidine in het actieve centrum van IIA^{mtl} gekarakteriseerd. Dit wordt beschreven in **hoofdstuk 6**. De NMR techniek die in dit hoofdstuk wordt gebruikt is wat geavanceerder als die in hoofdstuk 3. Voor de kenners: In plaats van 1D ^{15}N spectra worden $^1\text{H}\{^{15}\text{N}\}$ HMQC spectra opgenomen waarbij gebruik gemaakt wordt van de $^2\text{J}_{\text{NH}}$ koppeling naar de C2H en C4H protonen. In de praktijk vereenvoudigt dit de toekenningen in de spektra aanzienlijk. Met deze techniek laten we zien dat de imidazoolring van de actieve centrum histidine in IIA^{mtl} neutraal is bij fysiologische pH. Het proton is gelokaliseerd op de N ϵ 2 positie, en er zijn geen aanwijzingen voor een waterstofbrug-structuur. Als het eiwit gefosforyleerd wordt komt de fosforylgroep op de N ϵ 2 positie van de imidazoolring terecht. Door een stijging van de pK blijft de ring geprotoneerd en er is ook nu geen aanwijzing voor een waterstofbrug-structuur. De fosforylering van de geprotoneerde stikstofkern is opvallend. Het ligt meer voor de hand dat de gedeprotoneerde kern gefosforyleerd wordt, zoals in HPr het geval is. In het geval van IIA^{mtl} betekent dit dat het proton tijdens het fosforylerings-proces verplaatst moet worden van de N ϵ 2 naar de N δ 1 positie. Het suggereert de betrokkenheid van een ander residu in het actieve centrum. We doen in dit geval geen voorstel voor de konfiguratie van het actieve centrum omdat er nog te weinig informatie beschikbaar is om zoiets zinvol te kunnen doen. Wel geven we aan, aan welke voorwaarden het actieve centrum moet voldoen.

Een ander deel van het onderzoek richt zich op interactie van HPr en IIA^{mtl}. **Hoofdstuk 4** beschrijft de interactie van HPr-molekulen onderling. Via evenwichtsmetingen laten we zien dat in een mengsel

van HPr en fosfo-HPr de enzym-molekullen onderling fosforylgroepen uitwisselen. Met behulp van mutanten van HPr laten we zien dat dit uitwisselingsproces gebruikt kan worden om mutante HPr-molekullen te karakteriseren met betrekking tot de energie van de fosforylgroep. Op deze manier wordt een parameter voor de mutante HPr verkregen die onafhankelijk is van andere enzymatische componenten. Dit is bijvoorbeeld voor het bepalen van K_M en v_{max} , de gangbare parameters, niet het geval. De energieparameter blijkt veranderingen in mutante HPr-molekullen aan te geven waar K_M en v_{max} metingen geen verandering te zien geven ten opzichte van het natuurlijke HPr.

Hoofdstuk 5 beschrijft de interactie van HPr met IIA^{mtl}. Hoewel de niet gefosforyleerde enzymen geen detecteerbare interactie vertonen blijkt uit ³¹P NMR metingen dat fosfo-HPr en fosfo-PIIA^{mtl} complexen vormen in oplossing. Duidelijk is dat er een 1:1 complex gevormd wordt als er een equimolaire hoeveelheid van beide componenten aanwezig is. Als er een overmaat fosfo-IIA^{mtl} is ten opzichte van fosfo-HPr vormt zich ook een 2:1 complex. De situatie is echter veel ingewikkelder als er een overmaat fosfo-HPr aanwezig is. Er zijn dan aanwijzingen voor diverse complexen van fosfo-HPr en fosfo-IIA^{mtl}. De samenstelling hiervan is echter nog onduidelijk en vraagt meer onderzoek, iets wat op het moment van het schrijven van dit stuk gedaan wordt. Bijzonder is dat in de ³¹P-NMR spectra aanwijzingen zijn voor een intermediair dat gevormd wordt in de overdracht van een fosforylgroep tussen de twee enzymen. Verder onderzoek hieraan geeft mogelijk een gedetailleerd beeld van het mechanisme van de overdracht van fosforylgroepen tussen de twee molekullen.

In **hoofdstuk 7** tenslotte wordt het verloop van de energie van de fosforylgroep in het mannitol-specifieke PTS beschreven. We maken hierbij gebruik van evenwichtsmetingen, en bepalen hiermee in welke stappen energie behouden wordt of verloren gaat. De meeste energie die oorspronkelijk in PEP aanwezig was blijft behouden tot aan de overdracht van de fosforylgroep van de laatste enzymatische component naar mannitol. Deze energie kan gebruikt worden voor het transport van mannitol, zelfs als dat tegen een concentratie-gradient in gaat. Tevens geeft de analyse een mogelijk regulatie-mechanisme voor het PTS aan.

18049/92