

University of Groningen

Kinetics, dynamics and localization of basic amino acid transporters in *Saccharomyces cerevisiae*

Bianchi, Frans

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:

2016

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

Citation for published version (APA):

Bianchi, F. (2016). *Kinetics, dynamics and localization of basic amino acid transporters in Saccharomyces cerevisiae*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

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.

Nederlandse Samenvatting voor de leek

De titel van mijn proefschrift 'Kinetiek, dynamiek en lokalisatie van basische-aminozuur transportsystemen in *Saccharomyces cerevisiae*' geeft aan dat membraantransport de focus van mijn onderzoek is geweest, en in het bijzonder de bestudering van het lysine transporteiwit Lyp1. Alvorens op de details en specifieke bevindingen van dit proefschrift in te gaan, geef ik een globale omschrijving van een levende cel.

Algemene beschrijving van een cel en aminozuur transport

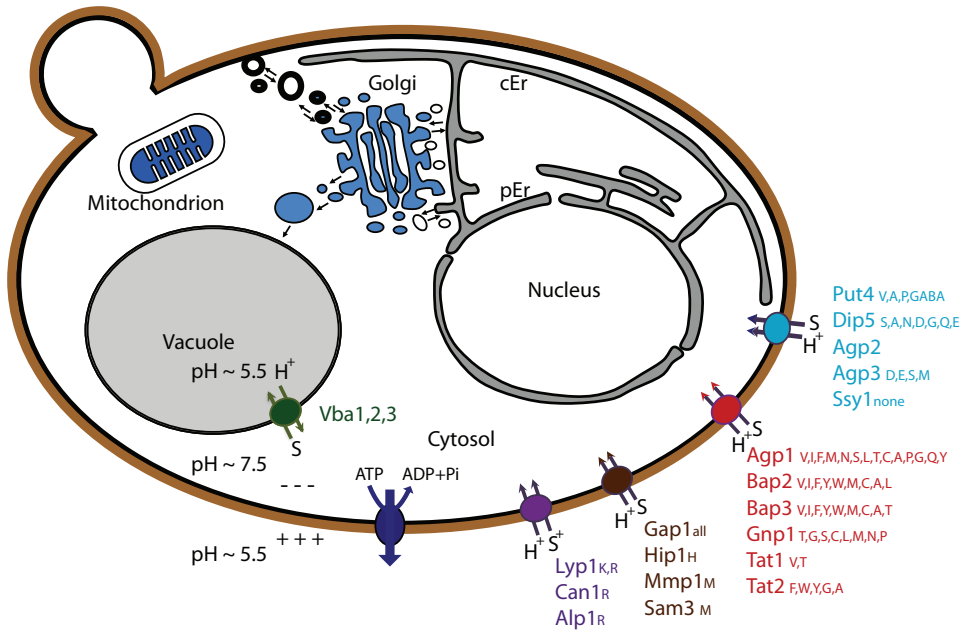
Een levende cel is de kleinste eenheid van leven, welke alle genetische informatie van het organisme bevat. Een organisme kan meercellig zijn, zoals wij mensen, waarbij de eenheden (cellen) gedifferentieerd zijn en op deze manier de verschillende taken volbrengen die zorgen voor het totaal functioneren van het hele organisme (de mens). Daarentegen zijn er ook eencellige organismen zoals bacteriën en sommige schimmels waarbij een eenheid (de cel) alle functies vervult. In dit proefschrift bestuderen we enkele aspecten van de fysiologie van *Saccharomyces cerevisiae*, een eencellige schimmel, bekend als bakkersgist. Bakkersgist wordt veel gebruikt in de voedselindustrie bijvoorbeeld voor het brouwen van bier of het laten rijzen van brood.

De eigenschappen van een cel liggen vastgelegd in het DNA (Desoxyribonucleïnezuur), dat codeert voor veel verschillende eiwitten. Eiwitten zijn verantwoordelijk voor de meeste processen die in een cel plaatsvinden. Zo wordt genetische informatie afgelezen van het DNA, wat leidt tot vorming van nieuwe eiwitten en zorgen andere voor de structuur, opbouw en afbraak van eiwitten en andere bouwstenen in een cel. Een eiwit is vervolgens weer opgebouwd uit 20 verschillende bouwstenen, de aminozuren. Hoe deze bouwstenen moeten worden gecombineerd, ligt vast in het DNA. De aminozuren worden door de cel zelf gemaakt of worden van buitenaf ingevoerd.

Een cel is omsloten door een membraan, in gist is dit het zogeheten plasmamembraan. Een membraan zorgt ervoor dat alle eiwitten en bouwstoffen in de cel blijven en de condities gehandhaafd worden om de cel te laten functioneren. Binnen een eukaryote cel zoals gist zitten verschillende compartimenten, de organellen, elk omsloten door een eigen membraan (Fig. 1). Door deze opdeling in compartimenten kunnen verschillende processen plaatsvinden in de cel die anders met elkaar zouden interfereren. Voor het functioneren van de cel en de verschillende organellen is het noodzakelijk dat stoffen worden opgenomen en uitgescheiden. Om het verplaatsen van stoffen over het membraan mogelijk te maken zijn er eiwitten aanwezig in het membraan, membraaneiwitten geheten. Niet alle membraaneiwitten zijn betrokken bij het faciliteren van transport; een aantal zorgen voor het doorgeven van signalen en weer anderen zorgen voor behoud van

het celmembran. De eiwitten die het transport van stoffen over het membraan van buiten naar binnen faciliteren zijn de membraan transporteiwitten.

Er bestaan meerdere type transporteiwitten, die o.a. gedifferentieerd zijn door het type van energiekoppeling en transportmechanisme. In dit proefschrift bestuderen we de zogeheten aminozuurpermeasen, die in *S. cerevisiae* verantwoordelijk zijn voor de import



Figuur 1: Schematische weergave van een gistcel. De cel is omsloten door het plasmamembraan; een lipide-bilaag (zwart) en een celwand bestaande uit gestapelde suikers (bruin); de celwand is verantwoordelijk voor de structuur van de cel. Het volume binnen de cel heet het cytoplasma; in het cytoplasma liggen verschillende organellen die met hun eigen membraan compartimenten vormen in de cel. Enkele van deze organellen zijn weergegeven in de figuur, zoals het mitochondrion, verantwoordelijk voor het omzetten van suikers in ATP (brandstof van de cel); de celkern (nucleus), waar het DNA is opgeslagen; de vacuole, waar afbraak van eiwitten plaatsvindt; en het golgi-complex, verantwoordelijk voor het verkeer van eiwitten naar hun plaats van bestemming. Het Endoplasmatisch reticulum (ER) is de bindingsplaats van het zogeheten ribosoom, een groot eiwitcomplex dat verantwoordelijk is voor de synthese van alle eiwitten. Dit endoplasmatisch reticulum is opgedeeld in het perifeer endoplasmatisch reticulum (pER), dat om de nucleus heen ligt, en het corticaal endoplasmatisch reticulum (cER), dat tegen het plasmamembraan aan ligt. In het plasmamembraan en de vacuolaire membraan zijn veel membraaneiwitten aanwezig, waarvan in de figuur slechts enkele zijn weergegeven. De aminozuur transporteiwitten zorgen voor de opname van specifieke aminozuren (aangegeven met hun 1-lettercode, subscript (tabel. 1) samen met een proton (H⁺). De vrije protonen, die meer aanwezig zijn buiten de cel dan binnen de cel, drijven de opname van aminozuren. Daarnaast is de lading binnen de cel iets negatiever dan buiten de cel en worden positief geladen moleculen naar binnen getrokken. Om deze gradiënten in stand te houden zijn er eiwitten aanwezig die protonen tegen de gradiënt in naar buiten pompen, zoals de protonenpomp Pma1, die ATP verbruikt als brandstof.

van aminozuren. Dit type transporteiwitten komt voornamelijk voor in het plasmamembraan (membraan aan de buitenzijde van een cel). De aminozuurpermeasen transporteren een aminozuur samen met een proton van buiten naar binnen. Door de positieve lading van het proton (H^+), de negatieve lading binnen de cel en de pH-gradiënt die samen de protodrijvende kracht vormen zijn de eiwitten in staat om specifieke aminozuren tegen de gradiënt in naar binnen te transporteren. Basische aminozuur-transporteiwitten transporteren specifiek de positief geladen aminozuren lysine en of arginine (Fig. 1); in *S. cerevisiae* zijn dit de eiwitten Lyp1, Can1 en Alp1.

Inhoud proefschrift

Heteerste hoofdstuk van dit proefschrift beschrijft wat er bekend is over aminozuurpermeasen in het plasmamembraan van gist; hoe de eiwitten transport van moleculen over het membraan faciliteren en hoe hun regulatie en locatie in het plasmamembraan is geregeld.

In het tweede hoofdstuk worden de eigenschappen van Lyp1 uit gist en LysP uit *Salmonella typhimurium* (een bacterie) vergeleken. Het transport van basische aminozuren via Lyp1 en LysP is gekoppeld aan de protonen drijvende kracht. Verstoring van deze proton drijvende kracht in bakkersgist leidt echter niet tot de verwachte aanpassing van het evenwicht van lysine binnen en buiten de cel. Dit is opmerkelijk aangezien dit voor bacteriën wel het geval is. Er is dan ook gesteld dat Lyp1-gemedieerd transport unidirectioneel is, oftewel alleen van buiten naar binnen de cel. Eerder onderzoek is voornamelijk uitgevoerd in hele cellen, waarbij vele factoren invloed hebben op het gemeten transport. Om deze factoren uit te sluiten hebben we het Lyp1 transporteiwit geïsoleerd, gezuiverd en vervolgens teruggezet in liposomen (membraanzakjes gevuld met water). In dit kunstmatige systeem hebben we controle over de drijvende krachten en is het gemeten transport puur afhankelijk van de transporteigenschappen van de transporter. De kinetische eigenschappen kunnen vervolgens worden vastgesteld door het transport te meten bij variërende omstandigheden. Aan de hand van onze bevindingen verklaren wij dat het waargenomen unidirectioneel transport van lysine een combinatie is van de secundaire opslag van lysine in de vacuole, waardoor de effectieve concentratie van lysine in het cytoplasma wordt gereduceerd, en de transporteigenschappen van Lyp1, dat in tegenstelling tot LysP onder vergelijkbare omstandigheden veel trager verloopt. Echter onze metingen laten zien dat het transport wel degelijk in beide richtingen plaatsvindt, wat Lyp1 net als LysP een bidirectionele transporter maakt.

In het derde hoofdstuk zijn de sequenties van transporteiwitten in *S. cerevisiae*, welke gelokaliseerd zijn in het plasmamembraan, vergeleken met transporteiwitten gelokaliseerd in het vacuolaire membraan. Uit deze analyse is gebleken dat de C'-staart van transporteiwitten in het plasmamembraan over het algemeen langer is dan

die van transporteiwitten in het vacuolaire membraan. Vele van deze C'-staarten in de aminozuurpermeases bleken op zichzelf te associëren aan het plasmamembraan. Deze C'-staarten werden herkend door een specifiek eiwit, palmitoyltransferase Pfa4. Dit enzym koppelt een lipidegroep aan het uiteinde van de C'-staart en verankert daarmee het uiteinde van de transporteiwitten in de membraan. Het verwijderen van dit anker leidde bij sommige aminozuur transporteiwitten tot nadelige effecten voor de cel. Wij concluderen dat de C'-staarten de functie en lokalisatie van de transporteiwitten beïnvloeden.

Het vierde hoofdstuk beschrijft verschillende factoren die de plaats van een membraaneiwit in het plasmamembraan bepalen. In het plasmamembraan bevinden zich verschillende compartimenten, gevormd door de interacties tussen verschillende lipiden met eiwitten. Een van deze compartimenten is het zogeheten microcompartiment van Can1 (MCC), een aminozuurpermease dat lijkt op Lyp1. Dit MCC vormt een kleine instulping in het plasmamembraan, waarin zich verschillende eiwitten bevinden. Van sommige eiwitten is al duidelijk dat ze verbindingen aangaan met de structurele eiwitten in het cytosol. Van andere eiwitten is dit niet bekend en is er ook geen functionele reden om in deze compartimenten aanwezig te zijn. Door middel van fluorescentiemicroscopie, waarbij eiwitten gelabeld zijn met een lichtgevend eiwit, hebben we de lokalisatie en diffusie van een aantal membraan transporteiwitten bepaald. We hebben aangetoond dat de diffusiesnelheid voor membraaneiwitten in het plasmamembraan van *S. cerevisiae* erg traag is. De verspreiding van eiwitten duurt hierdoor lang, terwijl de inbouw en verwijdering van bijvoorbeeld Can1 en Lyp1 uit de membraan relatief snel is. Deze regulatie houdt in dat de eiwitten een korte levensduur in het plasmamembraan hebben en dus na binnenkomst weer snel uit de cel verwijderd worden. Hierdoor is de lokalisatie in het plasmamembraan dus sterk afhankelijk van de plaats waar deze eiwitten worden ingebracht. Door de structurele eigenschappen van de cel vindt insertie van de eiwitten in de plasmamembraan vaak plaats in de buurt van de zogeheten MCC-compartimenten en komen eiwitten met een korte levensduur hier relatief vaak voor. Door middel van zeer gevoelige fluorescentie microscopietechnieken zijn we in staat een enkel eiwit gedurende een korte periode te volgen in het membraan. Hiermee hebben we aangetoond dat Can1 en Lyp1 ongehinderd diffunderen in het plasmamembraan, terwijl een ander MCC-eiwit, Sur7, gelimiteerd is tot een klein gebied. Op basis van deze metingen konden wij vaststellen welke eiwitten echt in MCCs voorkomen en welke in de buurt van MCCs blijven. Tevens stellen wij in dit hoofdstuk vast dat de meeste eiwitten vrij in en uit het MCC kunnen bewegen en alleen beperkt worden als zij aan de cytosolzijde een groot domein (uitstulpsel) hebben.

In het vijfde hoofdstuk is gekeken naar het protonkoppelingsmechanisme in Lyp1. Het proton-translocatiepad is in veel membraaneiwitten onbekend. Wel is er bekend dat aminozuren met een zure zijketen vaak een rol spelen in het energie koppelingsmechanisme van de transporteiwitten. Om het protonkoppelingsmechanisme van Lyp1 te ontcijferen vervingen

we evolutionair geconserveerde zure aminozuren door neutrale aminozuren. Vervolgens testten we of lysine nog steeds getransporteerd wordt door de mutanten in een specifieke *S. cerevisiae* stam tot expressie te brengen. Op deze manier vonden we posities in Lyp1 die essentieel zijn voor het functioneren van het eiwit. Met de lysine-selectieve stam voerden we een versnelde evolutie uit op eiwitten die niet functioneel bleken en vonden dat mutatie van een aantal andere residuen het lysine transport kunnen herstellen. Op basis van de gecombineerde resultaten van onze lokalisatie-, activiteits- en evolutiestudies concluderen we dat aminozuren Glu206, Glu323, Lys256 en Glu249 in Lyp1 mogelijk een rol spelen in het protonkoppelingsmechanisme.

In hoofdstuk zes analyseer ik enkele onopgeloste vraagstukken en geef suggesties hoe deze vragen te beantwoorden zijn. Een van deze vragen is: 'Welke residuen zijn verantwoordelijk voor de asymmetrie van in- en export van lysine in Lyp1?' Als voorbereiding hierop heb ik gekeken naar de overeenkomsten en verschillen tussen aminozaurpermeasen van gisten en bacteriën, en dan specifiek naar de groepen die verantwoordelijk zijn voor het transport van basische aminozuren (lysine en arginine). Uit deze analyse kwamen verschillen naar voren die het verschil in transport van Lyp1-achtige en LysP-achtige transporteiwitten zou kunnen verklaren. Een andere vraag is: 'Wat is de betrokkenheid van de C'-staart bij de functie, regulatie en lokalisatie van de aminozaurpermeasen? Gezien de grote variatie in de C'-staarten en de verschillende fenotypen van de geconstrueerde mutanten lijkt een eenduidige functie onwaarschijnlijk. De lokalisatie van sommige C'-staarten lijkt te duiden op mogelijke bindingspartners.

Het oorspronkelijke doel van mijn promotieonderzoek was om een lysine-exporterende gist stam te maken. Hoewel dit doel niet gerealiseerd is, heb ik de randvoorwaarden voor het maken van dergelijke stammen duidelijk in kaart gebracht. Mijn werk toont aan dat technologische doorbraken afhankelijk zijn van een sterke fundamentele basis in het wetenschappelijk onderzoek.

tabel 1. aminozuren en hun 1 lettercode

letter	aminozuur
A	alanine
R	arginine
N	asparagine
D	asparaginezuur
C	cysteine
Q	glutamine
E	glutaminezuur
G	glycine
H	histidine
I	isoleucine
L	leucine
K	lysine
M	methionine
F	phenylalanine
P	proline
S	serine
T	threonine
W	tryptofaan
Y	tyrosine
V	valine