

University of Groningen

Domain and substrate interactions in the mannitol transport protein of escherichia coli, enzyme IImtl

Meijberg, Jan Willem

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:

1998

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

Citation for published version (APA):

Meijberg, J. W. (1998). *Domain and substrate interactions in the mannitol transport protein of escherichia coli, enzyme IImtl*. 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.

De eerste levensbehoefte van alle organismen is het opnemen van voedingsstoffen vanuit hun omgeving. Dit proces vereist het transport van deze stoffen door de barrière die de buitenwereld en het organisme van elkaar scheidt, dat wil zeggen, door de membraan van een cel. In veel gevallen wordt dit transport bewerkstelligd door speciaal hiervoor geschikte moleculen die zijn ingebouwd in de celmembraan en daardoor kunnen functioneren als toegangspoort naar het binnenste van de cel. Deze moleculen behoren, net als de meeste andere moleculen die chemische reacties in de cel uitvoeren en/of versnellen, tot de klasse van de eiwitten. In bacteriën worden veel koolhydraten, zoals onder andere glucose en fructose, opgenomen via de eiwitten van het fosfoenolpyruvaat afhankelijke fosfotransferase systeem, naar haar naam in het Engels afgekort als PTS. Het PTS bestaat uit een serie eiwitten aan de binnenkant van de cel, die samenwerken om een transporteiwit te voorzien van energie in de vorm van een fosforylgroep. Het transporteiwit bindt een koolhydraat molecuul aan de buitenkant van de cel, verplaatst dit naar de binnenkant, en maakt vervolgens de fosforylgroep er aan vast door middel van een chemische reactie (de fosforylgroep wordt *covalent* gebonden). Het nu gefosforyleerde koolhydraat molecuul is een goede brandstof, die door de bacterie gemakkelijk te gebruiken is om processen in de cel aan te drijven. De transporteiwitten uit het PTS worden *Enzym II* (enzym twee) genoemd en zijn alleen geschikt om koolhydraten van een bepaald type te transporteren: ze zijn *specifiek* voor dit type, hetgeen wordt aangeduid met een superscript boven de II, bv. in het geval van glucose Enzym II^{glc}. Dit proefschrift beschrijft een studie naar de werking van het PTS transporteiwit dat specifiek is voor de koolhydraat mannitol in de bacterie *Escherichia coli*; dit eiwit wordt vanaf hier aangeduid als Enzym II^{mtl} of EII^{mtl}.

Eiwitten bestaan uit lange ketens van eenheden, die alle min of meer dezelfde structuur hebben, maar die toch over specifieke eigenschappen beschikken die per soort verschillen, ongeveer zoals een ketting met kralen van verschillende vorm. In totaal worden 20 verschillende eenheden of aminozuren gevonden in eiwitten. Een belangrijke eigenschap van de ketens van aminozuren is dat ze zich op een heel bepaalde manier opvouwen, waardoor een ruimtelijke structuur ontstaat die voor alle ketens met dezelfde volgorde identiek is. De specifieke vorm maakt het, in combinatie met de eigenschappen van de aminozuren in de keten, voor het eiwit mogelijk één bepaalde chemische reactie te versnellen, maar een andere, verwante, reactie ongemoeid te laten. In veel gevallen is men er met moderne technieken in geslaagd de ruimtelijke structuur van eiwitten op te lossen, dat wil zeggen, de ruimtelijke positie van de aminozuren ten opzichte van elkaar te bepalen. Dit heeft veel bijgedragen aan het begrip van de werking van deze eiwitten. Hoewel er de laatste tijd flinke vorderingen zijn gemaakt is de precieze structuur van Enzym II^{mtl} nog niet bekend.

Al snel nadat de eerste ruimtelijke structuren van eiwitten bekend waren geworden bleek dat veel eiwitten zijn opgebouwd uit meerdere, min of meer onafhankelijke, structurele eenheden, domeinen genaamd. Een bepaald gedeelte van de keten van aminozuren vouwt zich op tot een structuur die in feite ook los had kunnen bestaan. Een stukje verder in de keten gebeurt hetzelfde, en tezamen vormen de domeinen het eiwit. In Enzym II^{mtl} bestaan drie van die domeinen, aangeduid met A, B en C. Elk domein heeft een functie en samen zijn ze in staat om de volledige reactie, dat wil zeggen het binden van het mannitol, het verplaatsen van het gebonden mannitol naar de binnenkant van de cel en de chemische reactie van de fosforylgroep en de mannitol, uit te voeren.

Het C domein beslaat ongeveer de helft van de aminozuurketen van Enzym II^{mtl} en is het gedeelte dat is ingebouwd in de membraan; het vervult de eerder genoemde poortfunctie door mannitol te binden en naar de binnenkant van de cel te verplaatsen. De rest van de keten bevindt zich aan de binnenkant van de cel en vormt daar twee ongeveer even grote domeinen, A en B. De

functie van het A domein is het accepteren van de fosforylgroep van een van de PTS eiwitten aan de binnenkant van de cel (HPr) en deze door te geven aan het B domein. Het B domein zorgt er vervolgens voor dat de fosforylgroep terecht komt op het net binnengekomen mannitol. Het is duidelijk dat dit proces alleen kan verlopen als de domeinen goed samenwerken, en dus op de één of andere manier met elkaar communiceren. Veel van het werk dat is beschreven in dit proefschrift probeert een bijdrage te leveren aan ons begrip van communicatie of interactie tussen de domeinen van Enzym II^{mtl} en tussen het eiwit en de omgeving, dat wil zeggen het PTS eiwit HPr en mannitol. Hierbij is grofweg de volgorde van de stappen in het transportproces aangehouden: de interactie tussen HPr en het A domein wordt beschreven in hoofdstuk 2, de interactie tussen de A en B domeinen in hoofdstuk 3, de interactie tussen het B en C domein in hoofdstuk 4 en 5, en de interactie tussen het C domein en mannitol in hoofdstuk 5.

De experimenten die beschreven worden in hoofdstuk 2 zijn bedoeld om informatie te verkrijgen over de interactie van het algemene PTS-eiwit HPr en het A domein van Enzym II^{mtl}. Omdat het volledige Enzym II^{mtl} niet altijd even gemakkelijk te hanteren is, werd ervoor gekozen om in deze studie gebruik te maken van een vrij A domein. Hiermee wordt bedoeld dat het gedeelte van de aminozuurketen dat in Enzym II^{mtl} het A domein vormt als een apart eiwit, dus als een nieuwe, veel kortere, aminozuurketen, is verkregen en gebruikt in de interactieproeven. De manier waarop naar de interactie tussen beide eiwitten is gekeken maakt gebruik van het feit dat interactie (in het algemeen) gepaard gaat met een warmte-effect dat met moderne apparatuur heel nauwkeurig gemeten kan worden. Door aan het ene eiwit in kleine stapjes het andere eiwit toe te voegen (een *titratie* uit te voeren) ontstaat een patroon van kleine warmte-effecten dat de interactie karakteriseert. Hierbij is speciaal aandacht besteed aan de fosforylgroep op het HPr, en verassend genoeg blijkt dat de interactie minder goed verloopt wanneer deze aanwezig is dan wanneer ze afwezig is. Dit is onverwacht, omdat in de bacterie de interactie in aanwezigheid van de fosforylgroep nodig is voor de functie van het transporteiwit. Een verklaring zou kunnen zijn dat dit resultaat iets te maken heeft met de volgorde waarin verschillende soorten koolhydraten worden opgenomen: wanneer bijvoorbeeld zowel glucose als mannitol worden aangeboden zal altijd eerst de glucose worden opgebruikt en daarna pas mannitol.

De volgende stap in het transportproces is de overdracht van de fosforylgroep van het A domein naar het B domein. De interactie tussen deze twee is bestudeerd door de stabiliteit van de vrije domeinen te vergelijken met de stabiliteit van een eiwit dat bestaat uit de aminozuurketen die in het Enzym II^{mtl} zowel het A als het B domein vormt. De idee hierbij is dat de interactie tussen het A en B domein extra 'stevigheid' verleent aan de combinatie in vergelijking tot de vrije domeinen en dat het verschil informatie geeft over de omvang van de interactie. De stabiliteit, of zo u wilt, de sterkte van de verschillende eiwitten is bepaald zoals de sterkte van iedere structuur bepaald wordt: door haar kapot te maken. In het geval van eiwitten wil dat zeggen dat de netjes geordende opgevouwen structuur van de aminozuurketen veranderd moet worden in een 'ontvouwen' keten die iedere willekeurig oriëntatie kan hebben. Dit kan bereikt worden door het eiwit bijvoorbeeld te verwarmen of door bepaalde chemicaliën toe te voegen. In hoofdstuk 3 zijn beide methodes gebruikt, en het onverwachte resultaat was dat in de combinatie van beide eiwitten het B domein minder stabiel was dan als vrij eiwit. Dit zou verklaard kunnen worden door te stellen dat een te goede interactie ongewenst is, omdat de interactie tussen de A en B domeinen ook weer gemakkelijk verbroken moet kunnen worden om de overdracht van de fosforylgroep naar het mannitol mogelijk te maken. Een andere verklaring is dat de twee domeinen alleen maar aan elkaar gekoppeld zijn omdat dit de snelheid van de overdrachtsreactie bevordert: de twee domeinen hoeven

elkaar dan niet meer 'op te zoeken' in een mêlee van andere eiwitten. Een derde verklaring is dat het systeem dat gebruikt is in de proeven niet het meest gelukkig gekozen is, omdat effecten van het afwezige C domein ook een rol spelen bij de interactie van het A en B domein.

De methode die wordt toegepast in hoofdstuk 3 wordt ook gebruikt in hoofdstuk 4, nu om informatie te krijgen over de interactie tussen de B en C domeinen van Enzym II^{mtl}. Het feit dat het C domein een membraaneiwit is zorgt hier voor een extra complicatie. Voor de proeven zoals beschreven in de vorige paragraaf is het van essentieel belang dat de eiwit monsters zuiver zijn, dat wil zeggen ontdaan van alle andere eiwitten en verbindingen. Omdat Enzym II^{mtl} niet het enige eiwit is dat ingebouwd is in de membraan betekent dit dat het eiwit uit de membraan, dus uit zijn natuurlijke omgeving, gehaald moet worden. Nu is de binnenkant van de membraan olieachtig, in tegenstelling tot de binnenkant van de cel, waar water de voornaamste component is. Zoals bekend uit de keuken mengen water en olie niet goed en hetzelfde doet zich voor met membraaneiwitten in water: ze gaan samenklonteren (*aggregeren*), waardoor de experimenten niet langer uitgevoerd kunnen worden. Dit probleem wordt veelal opgelost door detergentia toe te voegen, verbindingen die de situatie in de membraan nabootsen en zo het aggregatieproces kunnen voorkomen. Nadat het eiwit op deze manier in zuivere vorm verkregen was, is het teruggebracht in een membraanomgeving om een situatie te verkrijgen die zoveel mogelijk lijkt op de natuurlijke situatie in de celmembraan van de bacterie en ook geschikt is om de stabiliteitsproeven mee te doen. Bij de stabiliteitsproeven werd speciaal aandacht besteed aan het effect van mannitol, de verbinding die door het eiwit wordt getransporteerd. Het bleek dat, hoewel het vrije C domein in staat is om het mannitol te binden en te transporteren, het B domein ook deel neemt aan het bindingsproces in het intacte eiwit en dus dat er een omvangrijke interactie is tussen beide domeinen.

In hoofdstuk 5 is opnieuw de interactie tussen het B en C domein het onderwerp, maar is de benadering van het probleem omgedraaid. In plaats van te kijken naar het effect van het mannitol op de domeinen wordt nu het effect van het verwijderen van de A en B domeinen op de bindingsreactie van mannitol en het C domein bestudeerd. De methode is dezelfde als gebruikt in hoofdstuk 2, nl. het meten van het warmte-effect dat gepaard gaat met de reactie. Hierbij is gebruik gemaakt van het feit dat de reactie specifiek is: mannitol reageert alleen met Enzym II^{mtl}, of er nu andere eiwitten aanwezig zijn of niet, en dus hoeft het eiwit, in tegenstelling tot de proeven in hoofdstuk 4, niet zuiver te zijn. Dit vereenvoudigt de praktische uitvoering van de proeven aanzienlijk, maar doet geen concessies aan het uiteindelijke resultaat. Het warmte-effect dat gemeten wordt als gevolg van binding van twee componenten is in het algemeen afhankelijk van de temperatuur waarbij de proef wordt uitgevoerd. In het geval mannitol en Enzym II^{mtl} komt er warmte vrij, en het effect wordt groter wanneer de temperatuur omhoog wordt gebracht. In vergelijking met bindingsreacties van andere eiwitten is de temperatuurafhankelijkheid van het warmte-effect van binding van mannitol erg groot en dat duidt er op dat de ruimtelijke structuur van het eiwit voor en na de bindingsreactie niet dezelfde is: er vindt een *conformationele verandering* plaats in het eiwit. Het vrije C domein is eveneens in staat om te reageren met mannitol, maar het hiermee gepaard gaande warmte-effect wordt nauwelijks beïnvloedt door de temperatuur waarbij het experiment wordt uitgevoerd. Blijkbaar vindt de verandering in structuur niet plaats in afwezigheid van het B en A domein, hetgeen opnieuw een duidelijke aanwijzing is voor een uitgebreide interactie tussen B en A gedeelte en het C domein. De meest voor de hand liggende verklaring voor deze resultaten is dat na binding van het mannitol het B en C domein verschuiven ten opzichte van elkaar, waardoor de overdracht van de fosforylgroep van het B domein naar het mannitol (dat zich op het C domein bevindt!) vergemakkelijkt wordt.

Het werk in hoofdstuk 6 en 7 sluit niet onmiddellijk aan bij het werk dat is beschreven in de hoofdstukken 2 tot en met 5, maar heeft zeker raakvlakken daarmee. Eiwitten vouwen op in een specifieke ruimtelijke structuur, hoewel er een ontelbaar aantal andere mogelijkheden denkbaar is. Dit feit is weliswaar al een hele tijd bekend, maar wordt tot op de dag van vandaag niet goed begrepen. Uit vele experimenten is gebleken dat de informatie die nodig is om tot die ene structuur te komen aanwezig is in de volgorde van de aminozuren in de keten, maar tot dusver is het niet gelukt om die informatie te ontcijferen. Dit vraagstuk staat bekend als het 'protein folding problem' en staat al gedurende lange tijd in de belangstelling van wetenschappers over de gehele wereld. Het probleem kan grofweg ontleed worden in twee deelproblemen: waarom is die ene specifieke structuur stabiel en hoe geraakt de aminozuurketen in die toestand? Hoofdstuk 6 beschrijft een studie naar beide vragen in het geval van het kleine PTS eiwit HPr. Hierbij is grotendeels gebruik gemaakt van de experimentele technieken die ook gebruikt zijn in hoofdstuk 3 en 4. Het blijkt dat HPr relatief langzaam opvouwt, in tegenstelling tot andere kleine, wateroplosbare eiwitten die veel sneller hun definitieve structuur weten te vinden en dus dat de snelheid van vouwen niet direct gerelateerd is aan de grootte van het eiwit. In hoofdstuk 7 worden een aantal verkennende experimenten beschreven om de stabiliteit van Enzym II^{mtl}, en in het bijzonder het C domein, te bepalen wanneer het eiwit van aggregatie wordt weerhouden door een detergent. Het is bekend dat water een van de belangrijkste factoren is die meespelen in het vouwingsproces van eiwitten, maar in het geval van membraan eiwitten is er geen water aanwezig aangezien zij zich bevinden in het olieachtige binnenste van de membraan. Dit heeft zijn weerslag op stabiliteit en vouwingsgedrag van dit type eiwitten, hetgeen onder andere blijkt uit het feit dat het C domein van Enzym II^{mtl} niet volledig ontvouwen is bij een temperatuur van 100 °C, het kookpunt van water.

werp, maar is de
het mannitol op
e bindingsreactie
hoofdstuk 2, nl.
gemaakt van het
andere eiwitten
hoofdstuk 4, niet
nlijk, maar doet
lt als gevolg van
waarbij de proef
het effect wordt
ingsreacties van
ng van mannitol
e bindingsreactie
rije C domein is
e warmte-effect
rdt uitgevoerd.
en A domein,
B en A gedeelte
s dat na binding
or de overdracht
omein bevindt!)