

VU Research Portal

Control and regulation of glycolysis in *Trypanosoma brucei*

Bakker, B.M.

1998

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Bakker, B. M. (1998). *Control and regulation of glycolysis in Trypanosoma brucei*. [PhD-Thesis – Research external, graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

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.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

Samenvatting

Trypanosoma brucei is een eencellige, eukaryote parasiet. Dit organisme veroorzaakt de Afrikaanse slaapziekte. Wanneer de parasiet in de bloedbaan van zoogdieren leeft, is hij volledig afhankelijk van zijn glycolyse voor de aanmaak van ATP. De glycolyse van trypanosomen verschilt van die in andere organismen, omdat de eerste zeven enzymen zich in een gespecialiseerd organel bevinden: het glycosoom. Verder lijken de glycosomale enzymen nauwelijks gevoelig te zijn voor stoffen die de corresponderende enzymen in andere organismen reguleren.

De centrale vraag die in dit proefschrift is gesteld, is welke stappen de glycolytische flux in de bloedstroomvorm van *T. brucei* controleren. Volgens Metabole Controle Analyse wordt de controle die een enzym op de flux uitoefent, kwantitatief uitgedrukt door een fluxcontrolecoëfficiënt. Deze is gedefinieerd als het quotiënt van de relatieve verandering van de flux en de relatieve verandering van de activiteit van het betreffende enzym, bij gelijkblijvende activiteiten van alle andere enzymen. Als een enzym een fluxcontrolecoëfficiënt van 1 heeft, katalyseert het de snelheidsbepalende stap van het pad. Als zijn fluxcontrolecoëfficiënt 0 is, oefent het geen enkele controle uit. De definitie maakt het ook mogelijk om omstandigheden te analyseren waaronder de enzymen de controle met elkaar delen. De verdeling van de controle tussen de enzymen onderling wordt bepaald door hun kinetische eigenschappen. De meeste glycolytische enzymen van *T. brucei* zijn kinetisch gekarakteriseerd onder vrijwel dezelfde omstandigheden. Dit zou het mogelijk moeten maken om de verdeling van de controle in *T. brucei* uit te rekenen. Hiertoe is met behulp van de kinetische gegevens een gedetailleerd model van de glycolyse van trypanosomen gemaakt. De berekende flux en metabolietconcentraties klopten redelijk met experimentele waarden (Hoofdstuk 2). Het model reproduceerde ook de remming van de anaerobe glycolyse door glycerol, hoewel de hoeveelheid glycerol die nodig was om de glycolyse van trypanosomen te remmen, volgens het model lager was dan experimenteel was bepaald. Deze afwijking werd kleiner wanneer het transport van glycerol-3-fosfaat via een uitwisselingsmechanisme gekoppeld werd aan dat van dihydroxyacetonfosfaat.

Met dit verbeterde model is vervolgens onderzocht welke stappen de glycolytische flux onder fysiologische omstandigheden controleren (Hoofdstuk 3). Tot onze verbazing was er geen eenduidig antwoord: bij fysiologisch voorkomende glucoseconcentraties

verschoof de controle van de glucosetransporteur enerzijds naar aldolase (ALD), glyceraldehyde-3-fosfaatdehydrogenase (GAPDH), fosfoglyceraatkinase (PGK) en glycerol-3-fosfaatdehydrogenase (GDH) anderzijds. De andere kinases, waarvan men vaak denkt dat ze de glycolyse controleren, oefenden slechts weinig controle uit. Ook het verbruik van ATP controleerde de flux niet. Dit laat zien dat de glycolyse van trypanosomen wordt aangedreven door het aanbod van en niet door de vraag naar ATP.

Vanwege onzekerheden in parameterwaarden kon er geen betrouwbare schatting worden gemaakt van de fluxcontrolecoëfficiënt van de glucosetransporteur. Daarom werd deze controlecoëfficiënt experimenteel bepaald door middel van een titratie met floretine, een remmer van het transport van glucose. Om het effect van floretine op de activiteit van de glucosetransporteur zelf te meten, is een snelle (5 s) bepaling voor de opname van radioactief gemerkt glucose ontwikkeld (Hoofdstuk 4). Bij hoge glucose concentraties was de gemeten opnamesnelheid hoog genoeg om de steady-state glycolytische flux te verklaren. Floretine bleek een competitieve remmer te zijn. Het effect van deze stof op de transporteur hing daardoor niet alleen van de extracellulaire, maar ook van de intracellulaire glucoseconcentratie af. Aangezien de remming van glucose-efflux niet was gemeten, was een van de K_i 's onbekend en moest deze geschat worden. Dit had een onzekerheid in de fluxcontrolecoëfficiënt tot gevolg: bij 5 mM glucose lag deze tussen 0,3 en 0,5 (Hoofdstuk 5). Bij een hele lage glucoseconcentratie (0,5 mM) nam de glucosetransporteur in overeenstemming met modelvoorspellingen alle controle over. In tegenstelling tot eerdere speculaties (Gruenberg, J., *et al.* (1978) *Eur. J. Biochem.* **89**, 461-469) tonen deze resultaten aan dat glucosetransport in trypanosomen niet *de* snelheidsbepalende stap van de glycolyse is: onder fysiologische omstandigheden is het slechts een van de controlerende stappen, maar het deelt de controle met andere enzymen. Een van deze stappen was het transport van pyruvaat over het plasmamembraan met een controlecoëfficiënt van 0,1. Deze waarde werd gemeten door middel van een titratie met UK5099 (Hoofdstuk 5). Hoogstwaarschijnlijk zijn de andere controlerende stappen ALD, GAPDH, PGK en GDH, zoals het model heeft voorspeld, of anders de transporteurs van glucose, 3-fosfoglyceraat, glycerol-3-fosfaat en dihydroxyacetonfosfaat over het glycosomale membraan, welke niet in het model opgenomen waren.

Een van de beoogde toepassingen van dit onderzoek is de verbetering van geneesmiddelen tegen de Afrikaanse slaapziekte. Als een enzym in de parasiet een hoge fluxcontrolecoëfficiënt heeft, terwijl het corresponderende enzym in de gastheer een lage controlecoëfficiënt heeft, dan zou een remmer van dit enzym de steady-state flux meer selectief moeten remmen dan hij de afzonderlijke enzymen remt (Hoofdstuk 1). Uit de

bovenstaande resultaten kan voorspeld worden dat de glycolyse van trypanosomen het meest gevoelig is voor remming van de glucosetransporteur, gevolgd door ALD, GAPDH, PGK en GDH. Dit werd bevestigd door simulaties waarin grote veranderingen van enzymactiviteiten in beschouwing werden genomen (Hoofdstuk 3). De enzymen die onomkeerbare reacties katalyseren, hexokinase (HK), fosfofructokinase (PFK) en pyruvaatkinase (PYK), leken in overmaat aanwezig te zijn. Vanuit dit gezichtspunt vormen zij een middelmatig doelwit voor geneesmiddelen. Het is nooit rechtstreeks bepaald hoeveel controle de glucosetransporteur uitoefent op de flux in de diverse weefsels van de gastheer. Onze resultaten rechtvaardigen verder onderzoek naar deze controle. Andere onderzoekers hebben uitgerekend dat de activiteiten van ALD, GAPDH en PGK in rode bloedcellen sterk zouden kunnen dalen voordat klinische symptomen moeten worden verwacht (Schuster, R. and Holzhütter, H.-G. (1995) *Eur. J. Biochem.* **229**, 403-418). Dientengevolge zou een mengsel van remmers van deze enzymen een effectief middel tegen slaapziekte kunnen blijken.

Er is gesuggereerd dat het onmogelijk zou zijn de glycolytische flux te remmen, omdat de meeste remmers competitief zijn en de cel de remming teniet kan doen door de concentraties van de concurrerende substraten te verhogen (Eisenthal, R. and Cornish-Bowden, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 5500-5505). Inderdaad zou de benodigde [I]/K_i verhouding hoger kunnen zijn dan verwacht, maar het probleem kan wellicht worden opgelost door remmers te ontwerpen die concurreren met co-enzymen, waarvan de concentraties niet onbeperkt kunnen stijgen. De flux zou het meest effectief geremd kunnen worden als zulke remmers gecombineerd zouden worden met remming van de biosynthese van het bijbehorende co-enzym (Hoofdstuk 7).

Tot nog toe is niet bekend waarom het eerste deel van de glycolyse van trypanosomen en andere Kinetoplastida in glycosomen plaatsvindt, terwijl de glycolytische enzymen van andere cellen zich in het cytosol bevinden. Met behulp van het eerder genoemde model van de trypanosomale glycolyse werden de gevolgen en de mogelijke functie van de compartimentatie van de glycolyse onderzocht. Twee modellen werden vergeleken: een met een glycosoom en een waaruit het glycosomale membraan was verwijderd en de glycosomale enzymen in het cytosol uitverdund waren. De resultaten ondersteunden niet de gangbare hypothese dat de compartimentatie van de glycolyse de hoge flux in trypanosomen veroorzaakt. Er werd echter aangetoond dat twee gevaren die aan het ontwerp van de glycolyse kleven, werden overwonnen door deze compartimentatie.

In de glycolyse wordt eerst ATP geïnvesteerd alvorens netto productie plaatsvindt. Dit maakt de eerste enzymen, HK en PFK, vrijwel onomkeerbaar en een hoge activiteit van deze enzymen zal, indien zij ongereguleerd blijft, een ophoping van hexosefosfaten

veroorzaken. Dit gebeurde inderdaad als het glycosomale membraan afwezig was. Indien de glycolyse echter gecompartmentaliseerd was, zoals in *T. brucei*, dan werden de activiteiten van HK en PFK begrensd door de lage glycosomale [ATP]/[ADP] ratio, aangezien de netto productie van ATP door pyruvaatkinase slechts in het cytosol plaatsvindt.

Vanwege de investering van ATP in het begin bestaat ook het gevaar dat de glycolyse niet meer kan opstarten, zodra de ATP concentratie te laag is geworden om HK en PFK te activeren. Aangezien *T. brucei* geen koolhydraten opslaat, kan dit gebeuren als het organisme verstoken is van een koolstofbron. In het glycosoom is de som van de concentraties van gefosforyleerde metabolieten constant, aangezien de fosfaatgroep slechts overgedragen wordt van het ene metaboliet naar het andere, zonder dat er in het glycosoom anorganisch fosfaat wordt gemaakt. Gezamenlijk kunnen deze gefosforyleerde metabolieten dienen als een korte-termijn-voorraad van vrije energie die aangewend kan worden om de glycolyse na een korte hongerperiode op te starten. Men kan speculeren dat het glycosoom de functie van regulering van enzymen en gedeeltelijk die van opslag van koolhydraten heeft overgenomen. Nadat zij eenmaal het glycosoom hadden verkregen, zouden de Kinetoplastiden de bovengenoemde eigenschappen kunnen hebben verloren en daarmee werd de compartimentatie van hun glycolyse onomkeerbaar.