



Doctoral Thesis

The relevance of transhydrogenases and heterologous phosphagen kinases for microbial cofactor metabolism

Author(s):

Canonaco, Fabrizio

Publication Date:

2003

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-004525971> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

DISS. ETH. Nr. 15040

**The relevance of transhydrogenases and heterologous phosphagen
kinases for microbial cofactor metabolism**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH
for the degree of
Doctor of Natural Science

Presented by
Fabrizio Canonaco
Dipl. Natw. ETH
born April 22nd, 1975
in Locarno, Switzerland

Accepted on the recommendation of
PD Dr. U. Sauer
Prof. T. Wallimann
PD Dr. U. Schlattner
Prof. H. Hennecke

2003

*“Obstacles are those frightful things you see
when you take your eyes off your goal”*

Henry Ford

SUMMARY

The scientific topic of this thesis is how micro-organisms generate NADPH and how they can be equipped with ATP buffering systems that provide transient protection during energy stress. ATP and pyridine nucleotides are essential cofactors for cellular metabolism, linking catabolism to anabolism. While NADH is almost exclusively utilized for energy generation, NADPH provides reducing power for biosynthetic reactions.

In **Chapter 2** and **Chapter 3**, we show through mutant construction and metabolic flux analysis that the two transhydrogenases of *Escherichia coli* have distinct roles in NADPH metabolism. The membrane-bound transhydrogenase PntAB is an important source of NADPH during exponential growth on glucose by catalyzing the transhydrogenation of NADH to NADPH. The soluble transhydrogenase UdhA, in contrast, catalyzes the reverse reaction from NADPH to NADH. This function is not necessary during growth on glucose but critical on substrates such as acetate, the catabolism of which generates a higher proportion of NADPH.

Vertebrates contain so-called phosphagen kinase systems, which constitute spatial and temporal energy buffering systems to overcome periods of fluctuating energy demand. In **Chapter 4** we install such phosphagen kinase systems in *Saccharomyces cerevisiae* that normally does not contain such systems. We then show the functional expression of arginine kinase, one particular phosphagen kinase system. Environmental conditions of fluctuating energy demand are installed by growing *S. cerevisiae* in glucose-limited chemostat culture with interrupted feeding. In the absence of glucose feeding, the intracellular ATP level was shown to drop significantly in the control strain, but it was stabilized at a much higher level in the arginine kinase-expressing strain. Our results demonstrate that temporal energy buffering is an intrinsic property of phosphagen kinases that can be transferred to phylogenetically very distant organism.

The **5th chapter** affords then a short study on the expression of arginine kinase in the bacterium *E. coli*. Specifically, we could show that arginine kinase expression significantly improves the recovery after a transient pH stress, that was anticipated to exert among other effects and ATP stress.

“Gli ostacoli sono quelle cose spaventose che si scorgono
quando si perde di vista il proprio obiettivo”

Henry Ford

SOMMARIO

L'argomento scientifico di questa tesi è come l'NADPH venga generato nei microorganismi e come questi possano venire equipaggiati con sistemi tampone per l'ATP in grado di fornire una protezione transitoria durante lo stress energetico. L'ATP e i nucleotidi a piridina sono cofattori essenziali del metabolismo cellulare e collegano l'anabolismo al catabolismo. Mentre l'NADH è utilizzato quasi esclusivamente per la produzione di energia, l'NADPH fornisce potere riduttivo per le reazioni biosintetiche.

Nel **Capitolo 2** e nel **Capitolo 3** mostriamo tramite la costruzione di mutanti e l'analisi dei flussi metabolici che le due transidrogenasi del batterio *Escherichia coli* hanno ruoli distinti nel metabolismo dell'NADPH. La transidrogenasi membranare PntAB è un importante sorgente di NADPH durante la crescita esponenziale su glucosio, catalizzando la transidrogenazione dell'NADH in NADPH. Questa funzione non è necessaria durante la crescita su glucosio, ma è critica su substrati come l'acetato, il cui catabolismo genera una in proporzione più NADPH.

I vertebrati contengono il cosiddetto sistema di fosfogene chinasi, che costituisce un sistema tampone spaziale e temporale per affrontare momenti di fluttuazione energetica. Nel **Capitolo 4**, installiamo un tale sistema di fosfogene chinasi nel lievito *Saccharomyces cerevisiae* che ne è normalmente privo. In seguito mostriamo l'espressione funzionale della arginina chinasi, un particolare membro della famiglia delle fosfogene chinasi. Condizioni ambientali che causano fluttuazioni nella domanda di energia vengono generate crescendo *S. cerevisiae* in un medium di coltura limitato in glucosio con alimentazione discontinua. In assenza di una alimentazione di glucosio, il livello intracellulare di ATP diminuisce in maniera significativa nel ceppo di controllo, ma risulta stabilizzato e mantiene un livello più alto nel ceppo in grado di esprimere arginina chinasi. I nostri risultati dimostrano quindi come la funzione di tampone temporale sia una proprietà intrinseca delle fosfogene chinasi trasferibile ad organismi filogeneticamente molto distanti.

Il **5° capitolo** affronta un breve studio sull'espressione dell'arginina chinasi nel batterio *E. coli*. Nello specifico, mostriamo come l'espressione dell'arginina chinasi migliori in maniera significativa il recupero da uno stress transiente da pH, conosciuto per generare tra gli altri effetti uno stress da ATP.