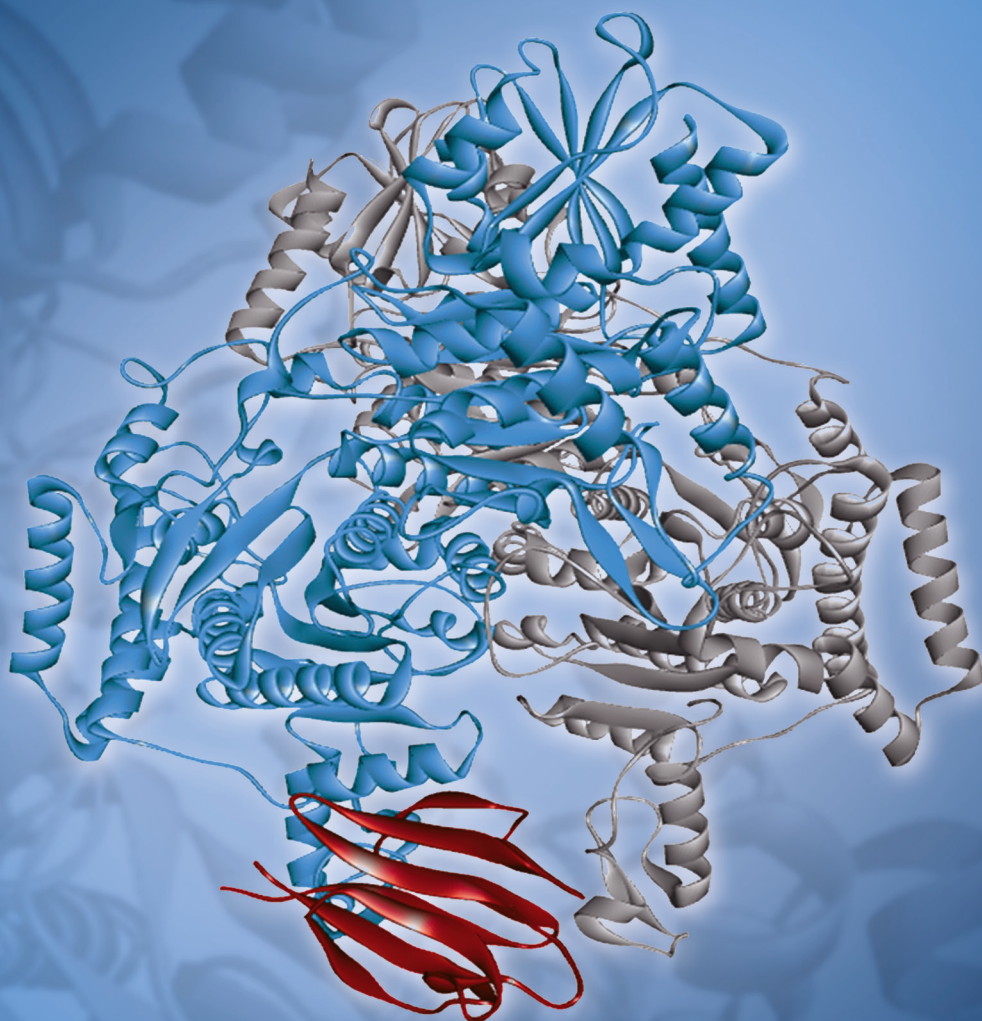




Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl

Katharina Raasch

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio- und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl

Katharina Raasch

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 48

ISSN 1866-1785

ISBN 978-3-89336-764-1

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek.
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der
Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte Bibliografische Daten
sind im Internet über <<http://dnb.d-nb.de>> abrufbar.

Herausgeber
und Vertrieb: Forschungszentrum Jülich GmbH
Zentralbibliothek, Verlag
D-52425 Jülich
Telefon (02461) 61-5368 · Telefax (02461) 61-6103
E-Mail: zb-publikation@fz-juelich.de
Internet: <http://www.fz-juelich.de/zb>

Umschlaggestaltung: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Druck: Grafische Medien, Forschungszentrum Jülich GmbH

Copyright: Forschungszentrum Jülich 2012

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health Band / Volume 48

D 61 (Diss. Düsseldorf, Univ., 2011)

ISSN 1866-1785
ISBN 978-3-89336-764-1

Alle Rechte vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf in irgendeiner Form (Druck, Fotokopie oder in einem anderen Verfahren) ohne schriftliche Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Der Tricarbonsäure-Zyklus in <i>Corynebacterium glutamicum</i>	5
1.2 Der gemischte Pyruvat-/Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in <i>C. glutamicum</i>	7
1.3 Die Regulation der Oxoglutarat-Dehydrogenase in <i>C. glutamicum</i>	10
1.4 Struktur und Funktion von FHA-Domänen	12
1.5 Ziel der Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	15
2.3 Oligonukleotide	19
2.4 Konstruktion von Plasmiden	21
2.5 Kultivierungsbedingungen	24
2.5.1 Nährmedien	24
2.5.2 Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
2.5.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i>	25
2.5.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen	25
2.6 Molekularbiologische Methoden	26
2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.6.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus <i>C. glutamicum</i>	26
2.6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA	26
2.6.1.3 Reinigung von DNA	26
2.6.1.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	26
2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese	27
2.6.3 Rekombinante DNA-Techniken	27
2.6.4 Herstellung und Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	28
2.6.5 Herstellung und Transformation elektrokompeter <i>C. glutamicum</i> -Zellen	28
2.6.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	29
2.6.6.1 <i>In vitro</i> Amplifikation von DNA-Fragmenten	29
2.6.6.2 Kolonie-PCR	30
2.6.7 Ortsgerichtete Mutagenese <i>in vitro</i>	30
2.6.8 Ortsgerichtete Mutagenese <i>in vivo</i> mit pK19mobsacB	31
2.6.9 DNA-Sequenzanalyse	31
2.7 Biochemische Methoden	32
2.7.1 Zellaufschluss mit Ultraschall	32
2.7.2 Affinitätschromatographie mittels Ni ²⁺ -NTA-Agarose	32
2.7.3 Affinitätschromatographie mittels StrepTactin-Sepharose	33

2.7.4	Größenausschluss-Chromatographie.....	33
2.7.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
2.7.6	Western Blot	34
2.7.7	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	35
2.7.8	Konzentrierung und Pufferaustausch von Proteinlösungen	35
2.7.9	Aminoterminal Sequenzanalyse von Proteinen	36
2.7.10	<i>In vitro</i> Aktivitätsmessung der Oxoglutarat- und Pyruvat- Dehydrogenase	36
2.7.11	Bestimmung der spezifischen E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität.....	37
2.7.12	Analyse von Proteininteraktionen mittels Oberflächenplasmonresonanz.....	37
2.7.13	Chemisches <i>cross-linking</i>	38
2.8	Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	39
2.8.1	Proteinkristallisation	39
2.8.1.1	Mikroseeding	40
2.8.2	Sammlung von Röntgenbeugungsmustern und Datenverarbeitung	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Einfluss von AceF auf die spezifische Aktivität der Pyruvat- und Oxoglutarat-Dehydrogenase.....	43
3.2	Untersuchungen zum OdhA-Polypeptid	44
3.2.1	Der native Translationsstart von OdhA.....	44
3.2.2	Charakterisierung von aminoterminal verkürzten OdhA-Peptiden	45
3.3	Interaktion von OdhI-Muteinen mit OdhA	47
3.3.1	Einfluss spezifischer OdhI-Peptide auf die ODH-Aktivität.....	47
3.3.2	Mutationen im konservierten SXXH-Motiv von OdhI.....	48
3.3.3	<i>Cross-linking</i> von OdhI und OdhA.....	50
3.4	Isolierung und Charakterisierung von Suppressormutanten mit veränderter Interaktion von OdhI und OdhA.....	52
3.4.1	Mutationen im <i>odhI</i> - und <i>odhA</i> - Gen	53
3.4.2	Charakterisierung der Mutation C704R im OdhA-Protein	54
3.5	Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Interaktionskomplexes aus OdhI und OdhA.....	57
3.5.1	Heterologe Überproduktion und Reinigung von OdhI-Muteinen für Kristallisationsexperimente.....	57
3.5.2	Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse des Interaktionskomplexes $_{\text{Strep}}$ OdhI Δ 43-OdhA Δ 354	64
3.5.3	Proteinkristallisation von $_{\text{Strep}}$ OdhI Δ 43-OdhA Δ 354	66
3.5.4	Strukturmodell für OdhA Δ 354.....	67
4	Diskussion.....	69
4.1	Der gemischte PDH-/ODH-Komplex in <i>C. glutamicum</i>	69
4.2	Die Rolle von OdhA und OdhI in <i>C. glutamicum</i> bei Wachstum auf Glutamin	70
4.3	Interaktionsmodell von OdhA und OdhI in <i>C. glutamicum</i>	72
	Literaturverzeichnis	79
	Danksagung	87

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
%	Prozent
Δ	delta
Ω	Ohm
$\emptyset$	Durchmesser
μ	mikro (10^{-6})
A	Adenin
A	Alanin
A	Ampere
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asp	Aspartat
ATCC	<i>American type culture collection</i>
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchoninsäure
BHI	<i>brain heart infusion</i>
BisTris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
C	Cystein
Cys	Cystein
D	Aspartat
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleotid-5'-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat
ds	doppelsträngig
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
E	Glutamat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	<i>et alteri</i> bzw. <i>et alii</i> (lat., „und andere“)
F	Farad
g	Gramm

<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
h	<i>hour</i> (Stunde)
H	Histidin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
His	Histidin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Kilo
K	Lysin
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
l	Liter
LB	<i>Luria broth</i>
Lys	Lysin
m	milli (10^{-3})
m	Meter
M	molar
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MES	2-Morpholinoethansulfonsäure
Met	Methionin
min	Minute
MM	Minimalmedium
mol	Mol
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
Ni	Nickel
NTA	<i>Nitrilotriacetic acid</i>
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	Konzentration des Wasserstoffs
pI	isoelektrischer Punkt

Q	Glutamin
R	Arginin
RBS	Ribosomen Bindestelle
RT	Raumtemperatur
RU	<i>resonance units</i>
s	Sekunde
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SM	Suppressormutante
SOB	<i>super optimal broth</i>
SPR	<i>surface plasmon resonance</i>
ss	<i>single stranded</i>
T	Threonin
T	Thymin
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
U	<i>unit</i>
V	Valin
V	Volt
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WT	Wildtyp
Y	Tyrosin

Zusammenfassung

In dem Glutamat-produzierenden Bakterium *Corynebacterium glutamicum* ist die Oxoglutarat-Dehydrogenase (ODH) Teil eines ungewöhnlichen gemischten Pyruvat-/ Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes, in welchem das Peptid OdhA E1- und E2-Aktivität mit Oxoglutarat als Substrat hat. Die Regulation der ODH-Aktivität unterliegt dabei der Kontrolle durch das regulatorische und phosphorylierbare Protein Odhl. Dieses bindet in unphosphorylierter Form an OdhA und hemmt dessen Aktivität. Eine reversible Phosphorylierung von Threonin-14 in Odhl, durch die spezifische Proteinkinase PknG, führt zu einer intramolekularen Wechselwirkung des phosphorylierten Threonins (pThr-14) mit der carboxyterminalen FHA-Domäne von Odhl. Dadurch werden Bereiche in Odhl blockiert und die Interaktion mit OdhA unterbunden. Diese Regulation der ODH-Aktivität, durch post-translationale Modifikation von Odhl, stellt einen bislang unbekannten Regulationsmechanismus dar und gab Anlass die Interaktion zwischen Odhl und OdhA in der vorliegenden Arbeit detaillierter zu untersuchen. Dabei wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- (1) AceF besitzt drei Lipoyldomänen. Die Lipoyldomäne L1 von AceF zeigte eine deutlich geringere Zugänglichkeit für die Komponenten des PDH-/ODH-Komplexes gegenüber L3 und war besonders schlecht zugänglich für die an der ODH-Aktivität beteiligten Enzyme.
- (2) Zwei aminoterminal verkürzte Derivate OdhA Δ 89 und OdhA Δ 354 zeigten im Vergleich zu nativem OdhA (1221 AS) eine unverminderte E1-Aktivität für Oxoglutarat. Demgegenüber war OdhA Δ 395 katalytisch inaktiv. Trotzdem zeigten alle drei OdhA-Derivate, verglichen mit nativem OdhA, eine unveränderte Interaktion mit Odhl.
- (3) Die FHA-Domäne von Odhl war ausreichend für eine vollständige Inhibierung der ODH-Aktivität. Mutationsanalysen ergaben, dass das für die Interaktion mit pThr-14 essentielle SXXH-Motiv der FHA-Domäne vermutlich keine Rolle bei der Interaktion mit OdhA spielt.
- (4) Durch ein *in vivo* Selektionssystem wurde ein Cys-704-Arg OdhA-Mutein identifiziert, welches eine um 50 % reduzierte Interaktion mit Odhl zeigte. Damit beeinflusst Cys-704 in OdhA die Interaktion mit Odhl maßgeblich.
- (5) Röntgenstrukturanalysen, *cross-links*, sowie Modellierungen von OdhA und Odhl machen es wahrscheinlich, dass im OdhA/Odhl Komplex Glu-472 von OdhA und Asp-126 von Odhl in räumlicher Nähe zueinander liegen.
- (6) Mutationen von Tyr-111 und Arg-117 in Odhl hatten einen vollständigen Verlust der Interaktion mit OdhA zur Folge und sind somit vermutlich unmittelbar an der Interaktion beteiligt.

Damit konnten interagierende Bereiche von Odhl und OdhA weiter eingegrenzt und erstmals Aminosäurereste in beiden Proteinen identifiziert werden, die es ermöglichen, ein Interaktionsmodell des Komplexes aus Odhl und OdhA zu erstellen.

Abstract

In the glutamate-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*, the oxoglutarate dehydrogenase (ODH) is part of a mixed pyruvate/oxoglutarate dehydrogenase complex in which the peptide OdhA has E1 and E2 activity with oxoglutarate as substrate. The activity of the ODH is modulated by the regulatory protein OdhI which can be reversibly phosphorylated. In the unphosphorylated state, OdhI binds to OdhA and inhibits its activity. The phosphorylation of Thr-14 in OdhI, by the specific protein kinase PknG, leads to an intramolecular interaction between the phospho-threonine residue 14 (pThr-14) and the carboxyterminal FHA domain in OdhI. As a consequence, OdhI interaction with OdhA is no longer possible and OdhA remains active. This regulation of the ODH activity by posttranslational modification of OdhI is so far an unknown mechanism. Hence, the present study was aiming for a detailed analysis on the interaction between OdhI and OdhA, yielding the following results:

- (1) AceF possesses three lipoyl domains. The lipoyl domain L1 of AceF has a considerably lower accessibility to the active sites of the PDH/ODH complex compared to the L3 domain. In particular, the accessibility is lower for the active sites required for ODH activity.
- (2) Two aminoterminal truncated derivatives OdhA Δ 89 and OdhA Δ 354 showed undiminished E1 activity in comparison to native OdhA (1221 aa). In contrast, OdhA Δ 395 was catalytically inactive. Nevertheless, all three OdhA derivatives still showed unchanged interaction with OdhI.
- (3) The FHA domain of OdhI was sufficient for the complete inhibition of the ODH activity. Analysis of mutations revealed that the highly conserved SXXH motif in the FHA domain, essential for the binding of pThr-14, is apparently not involved in the protein-protein interaction with OdhA.
- (4) A Cys-704-Arg OdhA mutein was identified by an *in vivo* selection system, with the mutein showing a 50 % reduced interaction with OdhI. Hence Cys-704 of OdhA considerably affects interaction with OdhI.
- (5) X-ray structure analysis, chemical cross-linking, as well as *in silico* modeling of OdhA and OdhI suggests a spatial proximity of Glu-472 (OdhA) and Asp-126 (OdhI) in the OdhA/OdhI complex.
- (6) Mutations of Tyr-111 and Arg-117 in OdhI led to a complete loss of interaction with OdhA, and are thus likely to be directly involved in protein-protein interaction.

Taken together, interaction sites between OdhA and OdhI were further confined and in both proteins single amino acid residues were identified, thus contributing to the further understanding of OdhA/OdhI interaction complex.

1 Einleitung

Das Bakterium *Corynebacterium glutamicum* wurde 1957 auf der Suche nach Glutamat produzierenden Mikroorganismen in Japan aus einer Bodenprobe isoliert (Kinoshita *et al.*, 1957). Der Organismus wird heute für die Produktion verschiedener Aminosäuren eingesetzt. Einen Großteil der Produktion macht dabei Natriumglutamat mit jährlich 1,8 Mio. Tonnen aus (Nakamura *et al.*, 2007), welches als Geschmacksverstärker in der Lebensmittelindustrie verwendet wird. An zweiter Stelle folgt die Produktion von L-Lysin, welches als Futtermittelzusatz genutzt wird und von dem jährlich immerhin 0,9 Mio. Tonnen produziert werden (Leuchtenberger *et al.*, 2005). *C. glutamicum* gehört zu den gram-positiven Bakterien, ist unbeweglich, schnell wachsend und Biotin-auxotroph (Abe *et al.*, 1967; Pascual *et al.*, 1995). Innerhalb der Ordnung *Actinomycetales* gehört die Gattung *Corynebacterium* der Unterordnung der *Corynebacterineae* an (Stackebrandt *et al.*, 1997), welche wiederum der Familie der *Corynebacteriaceae* angehört. Obwohl diese Familie zu den Gram-positiven Eubakterien zählt, besitzen ihre Vertreter eine äußere Membran (Chami *et al.*, 1995; Hoffmann *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu der äußeren Membran von Gram-negativen Bakterien besteht die Membran allerdings zum großen Teil aus Mykolsäuren, die ausschließlich in dieser Familie vorkommen (Zuber *et al.*, 2008). Die Mykolsäuren sind in der Zellwand über Arabinogalaktanketten mit Peptidoglykan verbunden. Da human-pathogene Arten wie *Corynebacterium diphtheriae*, *Corynebacterium urealyticum*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Mycobacterium leprae* ebenfalls zur Familie der *Corynebacteriaceae* gehören (Eggeling *et al.*, 2005), bildet die spezifische Zellwand dieser Organismengruppe einen attraktiven Ansatzpunkt zur Suche nach neuen Antibiotika. Nachdem das 3,3 Mb große Genom 2003 vollständig entschlüsselt werden konnte (Ikeda *et al.*, 2003; Kalinowski *et al.*, 2003), wurde *Corynebacterium glutamicum* schließlich neben dem wichtigsten Organismen zur Produktion von Aminosäuren (Bott, 2007) auch zu dem wichtigsten Modellorganismus zur biochemischen Charakterisierung der Zellwand der *Corynebacteriaceae* (Bhowruth *et al.*, 2008).

1.1 Der Tricarbonsäure-Zyklus in *Corynebacterium glutamicum*

Der Tricarbonsäure-Zyklus (TCA-Zyklus) stellt in *C. glutamicum* wie auch in vielen anderen Prokaryoten und Eukaryoten den Mittelpunkt des Zentralstoffwechsels dar. Er ist sowohl am Abbau von Zuckern und Fettsäuren als auch an der Bereitstellung von Metaboliten beteiligt, die z. B. für die Synthese von Aminosäuren benötigt werden. Seine katabolische

Funktion besteht in der Oxidation von Acetyl-Coenzym A (CoA) zu Kohlendioxid (CO_2). Auf diesem Weg werden Reduktionsäquivalente in Form von NADH, NADPH, FADH, reduziertem Menachinon sowie auch GTP generiert (Bott, 2007; Bott *et al.*, 2003). Zusätzlich wird bei Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle das Kohlenstoffskelett auf der Stufe von Oxoglutarat in den TCA-Zyklus eingeführt (Burkovski, 2005). Der Anabolismus des TCA-Zyklus führt zum einen zur Bildung von 2-Oxoglutarat und Oxalacetat, die jeweils als Vorstufen für die Aminosäuren der Glutamat- bzw. Aspartat-Familie dienen. Zum anderen entsteht als weiteres wichtiges Zwischenprodukt Succinyl-CoA (Eggeling & Bott, 2005; Eikmanns, 2005). Im zentralen Kohlenstoff-metabolismus werden zwei Schlüsselreaktionen durch Pyruvat-Dehydrogenase- und Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivitäten katalysiert (Abbildung 1.1). Sie bilden als große Besonderheit einen gemeinsamen Komplex, was zuerst für *C. glutamicum* gefunden wurde (Niebisch *et al.*, 2006).

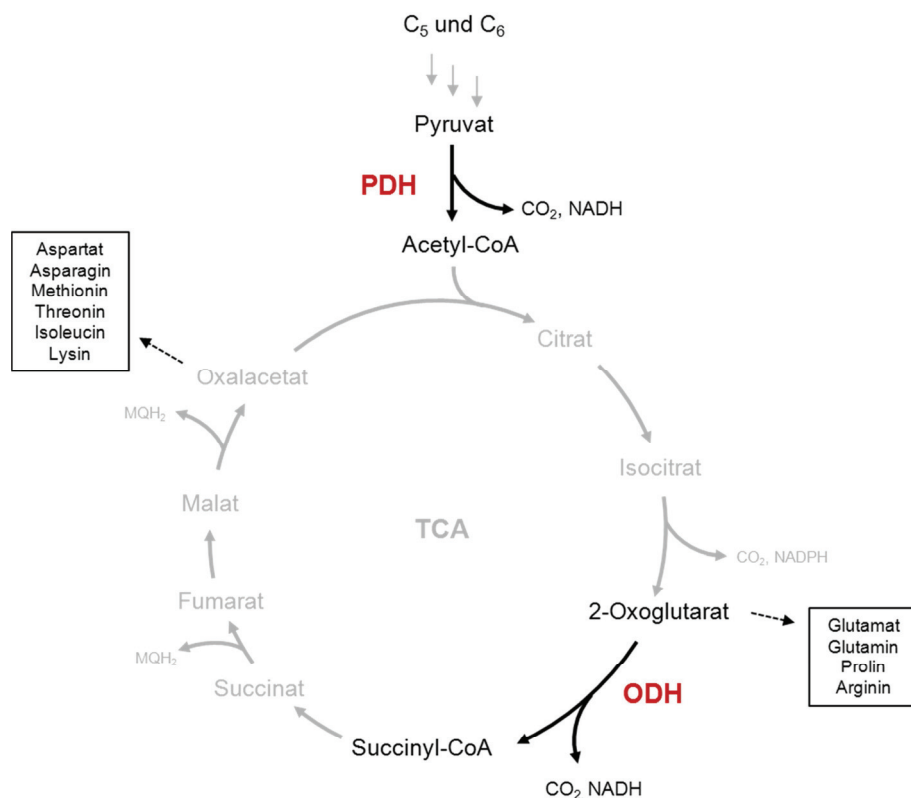


Abbildung 1.1: Der Tricarbonsäure-Zyklus in *C. glutamicum*. Die verwendeten Abkürzungen sind: CO_2 , Kohlendioxid; MQH_2 , reduziertes Menachinon; NADH, reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid; NADPH, reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat. PDH bzw. ODH gibt die Pyruvat- bzw. Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität an.

Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen des TCA-Zyklus und dessen unterschiedlicher Nutzung bei verschiedenen Kohlenstoffquellen ist es verständlich, dass dieser einer komplexen Regulation unterliegt. Eine Regulation findet dabei sowohl auf transkriptionaler, post-transkriptionaler als auch auf post-translationaler Ebene statt (Bott, 2007).

1.2 Der gemischte Pyruvat-/Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *C. glutamicum*

Die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) ist Bindeglied zwischen Glykolyse und TCA-Zyklus (Zhou *et al.*, 2001). Dabei wird Pyruvat durch die PDH oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Mutanten von *C. glutamicum*, denen die PDH fehlt benötigen Acetat welches nach Aktivierung zu Acetyl-CoA dem TCA-Zyklus zur Verfügung steht (Schreiner *et al.*, 2005). Ein wichtiges Intermediat im TCA-Zyklus stellt 2-Oxoglutarat dar. Es ist einerseits das Substrat der Oxoglutarat-Dehydrogenase (ODH), andererseits dient es als Substrat der Glutamat-Dehydrogenase (GDH). Diese Konkurrenzsituation spielt eine wichtige Rolle bei der Glutamatbildung mit *C. glutamicum*, da die Aktivität der ODH unter Glutamat-produzierenden Bedingungen wie z. B. Biotin-Mangel deutlich reduziert ist (Kawahara *et al.*, 1997; Shingu *et al.*, 1972). Die ODH wird auch bei der Verstoffwechselung von Glutamin benötigt. Zwar ermöglicht Glutamin, wenn es als Kohlenstoff- und Stickstoffquelle benutzt wird, nur eine geringe Wachstumsrate von *C. glutamicum* (Niebisch *et al.*, 2006), eine Verstoffwechselung zu Glutamat und schließlich zu 2-Oxoglutarat ist jedoch möglich (Burkovski, 2005).

Grundsätzlich weisen Pyruvat- und Oxoglutarat-Dehydrogenase mechanistisch und strukturell große Gemeinsamkeiten auf. Sie gehören zu der Familie von Multienzym-Komplexen, in die zwar ebenfalls die Dehydrogenase für verzweigtkettige Aminosäuren gehört, deren Aktivitäten allerdings nicht in *C. glutamicum* vorkommen (de Kok *et al.*, 1998). Diese Multienzym-Komplexe sind bis zu 11 MDa groß und bestehen üblicherweise aus einer Kombination von drei Enzym-Aktivitäten: Dehydrogenase/Decarboxylase (E1, EC 1.2.4.2), Dihydrolipoamid-Transacylase (E2, EC 2.3.1.6) und Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (E3, EC 1.8.1.4). Dabei ist die Aktivität der E1-Untereinheit Thiamindiphosphat- (ThDP) abhängig, die der Transacylase benötigt kovalent-gebundene Liponsäure als Ko-Faktor und die E3-Untereinheit ist ein FAD-enhaltendes Flavoprotein (Reed, 1974; Yeaman, 1989). Die mehrstufige Reaktion der oxidativen Decarboxylierung der 2-Oxosäure zum CoA-Derivat ist in Abbildung 1.2 schematisch für 2-Oxoglutarat dargestellt. In einem ersten Schritt wird die 2-Oxosäure durch die E1-Aktivität oxidativ decarboxyliert, gefolgt von der reduktiven Acylierung einer

Lipoylgruppe der E2-Untereinheit. Nachfolgend wird die Acylgruppe von S-Acyl-Dihydrolipoamid mit Hilfe der E2-Aktivität auf Coenzym A übertragen, was zu der Bildung von Acyl-CoA führt. Der Dihydrolipoamidrest wird im Anschluss durch die FAD-abhängige E3-Dihydrolipoamid-Dehydrogenase-Aktivität zu Lipoamid reoxidiert, wobei NAD^+ als Elektronenendakzeptor dient. Abschließend steht das E2-gebundene Lipoamid für eine erneute Acylierung zur Verfügung (de Kok *et al.*, 1998; Perham, 1991).

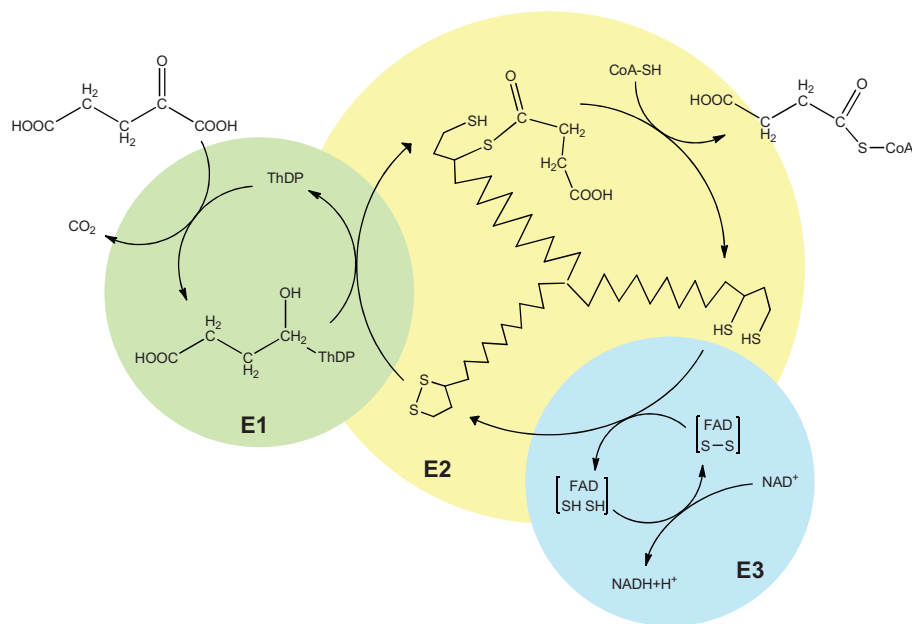


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Reaktionsmechanismus der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität. Dargestellt sind die drei enzymatischen Aktivitäten (E1-E3), die an einem Reaktionszyklus beteiligt sind, in dem aus 2-Oxoglutarat Succinyl-CoA, CO_2 und $\text{NADH}+\text{H}^+$ entsteht. E1: Thiamindiphosphat-abhängige Dehydrogenase/Decarboxylase (grün); E2: Dihydrolipoamid-Acyltransferase (gelb); E3: FAD-abhängige Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (blau).

Die Anzahl der Polypeptide im Komplex ist Organismen-spezifisch, liegt jedoch im Allgemeinen bei einem Verhältnis von etwa 1:1:0,5-1 (E1:E2:E3) (Reed, 1974). Dabei sind E1- und E3-Untereinheiten nicht-kovalent an einen Kern aus 24-60 E2-Untereinheiten gebunden. Mit Hilfe von Cryo-Elektronen-Mikroskopie-Analysen der Pyruvat-Dehydrogenasen aus *Bacillus stearothermophilus* (Milne *et al.*, 2002) und *Escherichia coli* (Murphy *et al.*, 2005) gelang es, Zugang zu diesem komplexen Aufbau zu erhalten. Die charakteristische Domänen-Struktur der E2-Untereinheiten im Komplex beinhaltet sowohl Bindemotive für die E1-Enzyme als auch eine sogenannte *peripheral subunit binding domain* (PSBD) zur Bindung der E3-Untereinheit (Packman *et al.*, 1986), sowie die katalytische Domäne (Russell *et al.*, 1992). Darüber hinaus weisen bis zu drei homologe

Domänen der E2-Untereinheit je einen lipoylierbaren Lysinrest auf, wobei die Anzahl der Domänen Organismus-spezifisch ist (Perham, 2000). Als *swinging arms* ermöglichen die lipoylierten Lysinreste die unmittelbare Interaktion der Intermediate zwischen den aktiven Zentren der einzelnen Enzymaktivitäten im Komplex (Guest *et al.*, 1985; Reed, 1974). Das AceF-Polypeptid (NCgl2126) aus *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003), welches die E2-Reaktion der PDH katalysiert (Hoffelder *et al.*, 2010; Niebisch *et al.*, 2006), besitzt wie das homologe AceF aus *E. coli* drei solcher Lipoyldomänen (Packman *et al.*, 1984a), wogegen das homologe Protein DlaT (Rv2215) aus *M. tuberculosis* durch nur 2 solcher Domänen gekennzeichnet ist (Tian *et al.*, 2005a). Sowohl für AceF als auch für DlaT wurde gezeigt, dass sie im Komplex mit der E1-Untereinheit AceE (NCgl2167 bzw. Rv0462) und der E3-Untereinheit Lpd (NCgl0355 bzw. Rv0462) *in vitro* PDH-Aktivität zeigen (Schwinde *et al.*, 2001; Tian *et al.*, 2005a). Trotz der phylogenetischen Zuordnung der *Corynebacterineae* zu den Gram-positiven Bakterien liegt AceE (E1p) im Komplex als Homodimer vor, wie es eigentlich für Gram-negative charakteristisch ist (Schreiner *et al.*, 2005).

In fast allen bislang untersuchten Organismen, einschließlich *C. glutamicum*, fungiert Lpd als universelles Protein für die E3-Aktivität der PDH und ODH (Guest *et al.*, 1973; Schwinde *et al.*, 2001). Die E1- und E2-Aktivitäten werden hingegen üblicherweise durch einzelne Proteine übernommen, die spezifisch für den jeweiligen Komplex (Creaghan *et al.*, 1972; Reed, 1974) sind und als E1p bzw. E1o und E2p bzw. E2o bezeichnet werden. So bilden beispielsweise die Polypeptide AceE (E1p) und AceF (E2p) bzw. SucA (E1o) und SucB (E2o) in Kombination mit Lpd (E3) den PDH- bzw. ODH-Komplex in *E. coli* (Henning *et al.*, 1964; Herbert *et al.*, 1969). Der gemischte ODH-/PDH-Komplex in *C. glutamicum* stellt hingegen eine große Besonderheit dar. Das Gen *odhA* in *C. glutamicum* kodiert für die E1-Untereinheit der Oxoglutarat-Dehydrogenase (Usuda *et al.*, 1996). Darüber hinaus zeigt das OdhA-Polypeptid in der aminoterminalen Hälfte aber auch hohe Sequenzidentitäten mit der katalytischen Domäne der E2-Dihydrolipoamid-Succinyltransferase aus *B. subtilis*. Überraschenderweise fehlen aber die charakteristischen Lysinreste, an denen Liponsäure gebunden wird (Usuda *et al.*, 1996).



Abbildung 1.3: Domänenorganisation des bifunktionellen OdhA-Proteins aus *C. glutamicum*. Die Zahlen geben die Aminosäureposition im Polypeptid an, bezogen auf die Sequenzinformationen aus 3.2.1. E1: Thiamindiphosphat-abhängige Dehydrogenase/Decarboxylase; E2: Acyltransferase.

Damit konnte erstmals ein vollkommen neues Protein identifiziert werden, welches offensichtlich sowohl eine E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Domäne als auch eine E2-Acyltransferase-Domäne aufweist (Abbildung 1.3). Eine solche Domänen-Organisation liegt ebenfalls in dem homologen KGD-Protein (Rv1248c) aus *M. tuberculosis* vor, für das zunächst keine Dehydrogenase- sondern lediglich Decarboxylase-Aktivität gezeigt werden konnte (Tian *et al.*, 2005b; Tian *et al.*, 2005a). Dessen aminoterminal verkürzte Struktur konnte erst kürzlich aufgeklärt werden (Wagner *et al.*, 2011). Ein Gen, welches für ein separates E2o-Protein wie in *E. coli* und *B. subtilis* kodiert, liegt weder in *C. glutamicum* noch in *M. tuberculosis* vor (Tian *et al.*, 2005a; Usuda *et al.*, 1996). Dies führte möglicherweise mit dazu, dass in hochrangigen Publikationen sehr kontrovers zu Vorhandensein und Aktivität einer ODH in *M. tuberculosis* berichtet wird (Tian *et al.*, 2005a; de Carvalho *et al.*, 2010; Wagner *et al.*, 2011). Biochemische Studien konnten zeigen, dass AceF und das homologe DlaT Protein jeweils als einziges Protein in *C. glutamicum* bzw. *M. smegmatis* lipoyliert vorliegen (Hoffelder *et al.*, 2010; Tian *et al.*, 2005a). Erst kürzlich konnte aber nachgewiesen werden, dass OdhA trotz nicht gebundener Liponsäurereste Succinyltransferase-Aktivität besitzt (Hoffelder *et al.*, 2010). Dabei stellt AceF die Liponsäurereste sowohl für die Aktivität der PDH als auch für die der ODH zur Verfügung (Hoffelder *et al.*, 2010). In Ko-Reinigungsexperimenten konnte aus *C. glutamicum* Rohextrakt mit dem OdhA-Polypeptid neben der universellen E3-Untereinheit Lpd überraschenderweise auch AceE und AceF, die E1- und E2-Untereinheit der Pyruvat-Dehydrogenase, isoliert werden. Umgekehrt wurde mit AceE auch OdhA, AceF und Lpd ko-gereinigt (Niebisch *et al.*, 2006). Zusammengefasst ergibt sich daraus für *C. glutamicum* ein noch nicht zuvor beschriebener gemischter Multienzym-Komplex, der aus AceE (E1p), AceF (E2), Lpd (E3) und OdhA (E1/2o) besteht, und der sowohl PDH- als auch ODH-Aktivität zeigt, wobei die E2-Domäne von OdhA die Liponsäurereste von AceF für die Umsetzung von Oxoglutarat zu Succinyl-CoA nutzt (Hoffelder *et al.*, 2010).

1.3 Die Regulation der Oxoglutarat-Dehydrogenase in *C. glutamicum*

Die Aktivität der Oxoglutarat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* unterliegt der Kontrolle durch das regulatorische Protein OdhI (Oxoglutarat-Dehydrogenase-Inhibitor, NCgl1385). Da in einem *odhI*-Deletionsstamm von *C. glutamicum* die Glutamat-Synthese nahezu vollständig gehemmt ist (Schultz *et al.*, 2007), zeigt OdhI ebenfalls einen Einfluss auf die Glutamat-Produktion. Das Protein ist erstmals im Rahmen einer Suche nach Substraten der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinase G vom eukaryotischen Typ (PknG) in

C. glutamicum isoliert worden (Niebisch *et al.*, 2006) und kann sowohl phosphoryliert als auch unphosphoryliert vorliegen. Odhl besteht aus 143 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 15,4 kDa (Niebisch *et al.*, 2006) und ist in *Corynebacterineae* stark konserviert, wohingegen es in Eukaryoten fehlt. Es weist 76 % Sequenzidentität mit dem homologen Protein GarA (*glycogen accumulation regulator*, AF07901.1) aus *M. smegmatis* auf, welches erstmals durch Belanger (1999) beschrieben wurde. Sowohl Odhl als auch GarA gehören in die Familie der Proteine, die eine FHA- (*forkhead-associated*) Domäne besitzen. Die Struktur und Funktion dieser FHA-Domänen wird in Abschnitt 1.4 detailliert beschrieben.

Odhl ist ein Substrat der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen vom eukaryotischen Typ (STPK). *C. glutamicum* besitzt vier dieser STPKs, die zwar alle in der Lage sind, Odhl mehr oder minder zu phosphorylieren, was jedoch nicht essentiell ist (Schultz *et al.*, 2009). Die wichtigste Rolle für die Phosphorylierung von Odhl in *C. glutamicum* spielt die cytoplasmatische Serin-/Threonin Proteinkinase G (PknG) (Niebisch *et al.*, 2006). GarA in *M. tuberculosis* kann ebenfalls durch die orthologe mycobakterielle PknG (O'Hare *et al.*, 2008) und darüber hinaus durch die membrangebundene Proteinkinase B (PknB) (Villarino *et al.*, 2005) phosphoryliert werden. Die reversible Phosphorylierung kann an zwei Threoninresten in einem aminoterminal lokalisierten, hoch-konservierten ETTS-Motiv stattfinden, genauer an den Threoninresten 14 und 15 (Thr-14 und Thr-15) in Odhl, bzw. Thr-21 und Thr-22 in GarA (England *et al.*, 2009), wobei jeweils der erste Threoninrest (Thr-14, bzw. Thr-21) die Hauptphosphorylierungsstelle darstellt. Die Dephosphorylierung des regulatorischen Odhl-Proteins in *C. glutamicum* ist durch die einzige Phospho-Serin-/Threonin Protein-phosphatase Ppp gewährleistet (Schultz *et al.*, 2007), deren Ortholog PstP in *M. tuberculosis* vermutlich GarA dephosphoryliert (England *et al.*, 2009).

In seiner unphosphorylierten Form interagiert Odhl mit dem OdhA-Protein der Oxoglutarat-Dehydrogenase (Abbildung 1.4). Durch Ko-Reinigungs-experimente konnte dabei der interagierende Bereich in OdhA auf die carboxyterminale E1-Domäne eingegrenzt werden (Krawczyk *et al.*, 2010). In Folge dieser Interaktion ist die Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität von OdhA gehemmt und Oxoglutarat wird nicht mehr decarboxyliert (Krawczyk *et al.*, 2010; Niebisch *et al.*, 2006). Die reversible Phosphorylierung von Odhl durch PknG bewirkt im Regulatorprotein eine Bindung des flexiblen aminoterminalen Endes an die FHA-Domäne, wodurch offensichtlich Bindestellen für die Protein-Protein-Wechselwirkung mit OdhA blockiert werden. Dementsprechend konnte für eine *C. glutamicum* *pknG*-Deletionsmutante ein starker Wachstumsdefekt auf Glutamin-Medium festgestellt werden, der durch einen Überschuss an unphosphoryliertem Odhl auf die Hemmung der ODH-Aktivität und einem daraus resultierenden Verlust des Abbaus von Oxoglutarat im TCA-Zyklus zurückzuführen ist.

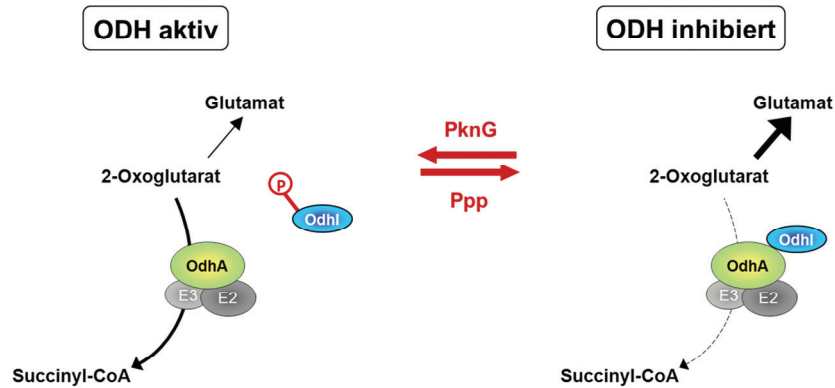


Abbildung 1.4: Modell zur Regulation der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität in *C. glutamicum*. Die Aktivität der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinase G (PknG) und der Phospho-Serin-/Threonin-spezifischen Proteinphosphatase (Ppp) kontrollieren den Phosphorylierungszustand von Odhl, welches in unphosphoryliertem Zustand die Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität hemmt.

Dieser molekulare Mechanismus durch intramolekulare Wechselwirkung gilt sowohl für die Regulation von OdhA durch Odhl als auch von KGD durch GarA in *M. tuberculosis* (Barthe *et al.*, 2009; England *et al.*, 2009). GarA in *M. tuberculosis* ist darüber hinaus an der Regulation der Glutamat-Dehydrogenase und des Glutamat-Synthase-Komplexes beteiligt (Nott *et al.*, 2009), was in *C. glutamicum* nicht der Fall ist.

1.4 Struktur und Funktion von FHA-Domänen

Forkhead-associated-Domänen (FHA-Domänen) wurden erstmals von (Hofmann *et al.*, 1995) als homologe Bereiche in *forkhead*-Transkriptionsfaktoren identifiziert. Sie spielen sowohl in Eukaryoten als auch in Prokaryoten bei intrazellulärer Signaltransduktion, sowie bei der Kontrolle von Transkription, Proteintransport, DNA-Reparatur und Proteinabbau eine Rolle. Durch Detailstudien dieser 80-100 Aminosäuren großen Domänen konnte gezeigt werden, dass FHA-Domänen phosphorylierte Threoninreste (pThr) binden und so eine Protein-Protein-Interaktionen bewirken (Durocher *et al.*, 1999). FHA-Domänen bestehen in der Regel aus elf β -Strängen ($\beta 1$ - $\beta 11$), die sich zu einem *sandwich* aus zwei β -Faltblättern zusammenlagern und von denen lediglich sechs β -Stränge die Homologie-Region der Domäne bilden. Die Stränge $\beta 1$ und $\beta 11$ liegen parallel zueinander, wodurch N- und C-Terminus der FHA-Domäne benachbart sind und somit ihren Platz an derselben Seite der Domäne einnehmen. Auf der entgegengesetzten Seite der Domäne befindet sich die für die Proteininteraktion wichtige Phosphopeptid-Bindestelle. Diese Anordnung ermöglicht FHA-Domänen sich unabhängig

zu falten und Phosphopeptide zu binden, selbst wenn sie in größere Polypeptide eingebettet sind, wie z. B. im Fall von FHA1 und FHA2 in Rad53 (Durocher *et al.*, 2000a). Im Allgemeinen befinden sich der phosphorylierbare Threoninrest und die interagierende FHA-Domäne in zwei unterschiedlichen Polypeptiden, die miteinander in Wechselwirkung stehen. Dies gilt ebenfalls für Rad9 aus *Saccharomyces cerevisiae*, welches in phosphorylierter Form mit FHA1 und FHA2 in Rad53 interagiert (Durocher *et al.*, 1999). Odhl und GarA hingegen stellen in der Gruppe der FHA-Domänen-Proteine einen vollkommen neuen molekularen Interaktionsmechanismus dar. Zum einen befinden sich der phosphorylierbare Threoninrest und die FHA-Domäne in demselben Polypeptid, und zwar jeweils am Ende. Zum anderen interagieren Odhl und GarA, im Gegensatz zu Rad9 (Durocher *et al.*, 1999), einzig in unphosphorylierter Form mit OdhA (Niebisch *et al.*, 2006) bzw. KGD (O'Hare *et al.*, 2008). Die intermolekulare Wechselwirkung wird durch Phosphorylierung unterbunden. Die reversible Phosphorylierung an Thr-15 in Odhl führt aber zu intramolekularen Wechselwirkungen zwischen dem pThr-15 und der FHA-Domäne. Dabei erfolgt innerhalb von Odhl eine strukturelle Umlagerung, indem sich der stark ungeordnete, flexible N-Terminus mit dem phosphorylierten Threonin an die FHA-Domäne anlagert und dadurch Strukturen blockiert, die für die Interaktion mit OdhA notwendig sind. Die für die Phosphopeptidbindung relevanten Aminosäurereste sind in allen bislang untersuchten FHA-Domänen hoch-konserviert.

1.5 Ziel der Arbeit

Vor dem Hintergrund der ungewöhnlichen Struktur des ODH-/PDH-Komplexes sollten zunächst verschiedene protein-biochemische und enzymatische Untersuchungen zu AceF und OdhA durchgeführt werden. Anschließend sollte detailliert die Interaktion von Odhl mit OdhA untersucht werden. Ein Ziel dabei war es, für die Interaktion essentielle Bereiche der beiden Proteine durch gerichtete Mutationen und Interaktionsstudien einzugrenzen. Auch bot sich der besondere Phänotyp einer *C. glutamicum* *pknG*-Deletionsmutante an, über Suppressormutanten Zugang zu beteiligten Resten zu bekommen. Abschließend sollten geeignete Expressionsbedingungen für *odhl* und *odhA* gefunden werden, um einen Interaktionskomplex aus Odhl und OdhA zu isolieren, mit dem kristallographische Untersuchungen und auch Kristallisationsexperimente für mögliche Röntgenstrukturanalysen durchgeführt werden sollten.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Soweit nicht anders aufgeführt wurden Chemikalien und Enzyme der Firmen Merck KGaA (Darmstadt), Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Sigma-Aldrich Chemie (Deisenhofen), Bachem Biochemica AG (Heidelberg), AppliChem GmbH (Darmstadt) und Difco Laboratories (Detroit, USA) verwendet.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit benutzten Bakterienstämme sind in Tabelle 2.1 und in Tabelle 2.2, die verwendeten Plasmide in Tabelle 2.3 aufgeführt.

Tabelle 2.1: In dieser Arbeit verwendete *C. glutamicum*-Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
ATCC13032	Wildtyp (WT), biotin-auxotroph	(Abe <i>et al.</i> , 1967)
<i>aceF</i> (K43Q-K162Q)	WT mit chromosomaler Punktmutation in <i>aceF</i> , die zu AceF-K43Q-K162Q führt	(Hoffelder <i>et al.</i> , 2010)
<i>aceF</i> (K162Q-K278Q)	WT mit chromosomaler Punktmutation in <i>aceF</i> , die zu AceF-K162Q-K278Q führt	(Hoffelder <i>et al.</i> , 2010)
$\Delta odhI$	WT $\Delta odhI$ (NCgl1385)	(Niebisch <i>et al.</i> , 2006)
$\Delta pknG$	WT $\Delta pknG$ (NCgl2655)	(Niebisch <i>et al.</i> , 2006)
Δppp	WT Δppp (NCgl0044)	(Schultz <i>et al.</i> , 2007)
$\Delta pknG$ -SM7	Suppressormutante von WT $\Delta pknG$ mit chromosomaler Punktmutation in <i>odhA</i> , die zu OdhA-C704R führt	diese Arbeit
$\Delta pknG odhA$ -CR	WT $\Delta pknG$ mit chromosomal eingefügter Punktmutation in <i>odhA</i> , die zu OdhA-C704R führt	diese Arbeit

Tabelle 2.2: In dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Bakterienstämme

Stamm	Merkmale	Referenz
BL21(DE3)	$F^- ompT gal dcm hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda$ (DE3)	Novagen
DH5 α MCR	$F^- endA1 supE44 thi^- \lambda^- recA1 gyrA96 relA1 deoR \Delta(lacZYA^- argF) U169 \Phi80dlacZM15 mcrA \Delta(mrr^- hsdRMS^- mcrBC)$	(Grant <i>et al.</i> , 1990)
M15 pREP4	$nal^S str^S rif^S thi^- lac^- ara^+ gal^+ mtl^- f^- recA^+ uvr^+ lon^+ Kan^R$	(Zamenhof <i>et al.</i> , 1972)

Tabelle 2.3: Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pAN6	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit vektorkodierter RBS, zur Überproduktion von Proteinen mit C-terminalem StrepTag-II	(Frunzke <i>et al.</i> , 2008)
pEKEx2	Kan ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression (P _{lac} , <i>lacI</i> ^Δ , pBL1, <i>oriV_{C.g.}</i> , pUC18 <i>oriV_{E.c.}</i>)	(Eikmanns <i>et al.</i> , 1991)
pET24b(+)	Kan ^R , Vektor zur heterologen Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i> mit C-terminalem 6xHis-Tag (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , T7-Promotor, <i>lacI</i>)	Novagen
pJC1	Kan ^R , <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle-Vektor zur regulierten Genexpression (<i>oriV_{E.c.}</i> from pACYC177, <i>oriV_{C.g.}</i> from pHM1519)	(Cremer <i>et al.</i> , 1990)
pET-TEV	Kan ^R , pET28b(+)-Derivat zur Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i> mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz (pBR322 <i>oriV_{E.c.}</i> , T7-Promotor, <i>lacI</i>)	(Bussmann <i>et al.</i> , 2010)
pQE-1	Carb ^R , pQE30-Derivat zur Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i> mit N-terminalem 6xHis-Tag (<i>oriV_{E.c.}</i> , <i>bla</i> , <i>lacI</i> ^Δ , T5-Promotor)	Qiagen
pK19mobsacB	Kan ^R , mobilisierbarer Integrationsvektor (<i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>sacB</i>)	(Schafer <i>et al.</i> , 1994)
pEKEx2- <i>odh</i> ⁺ -H6	Kan ^R , pEKEx2-Derivat mit einem 930bp-Fragment, das den vermuteten Translationsstart von OdhA beinhaltet und einen C-terminalen 6xHis-Tag anfügt	(Hoffelder <i>et al.</i> , 2010)
pAN6- <i>odhA</i>	Kan ^R , pAN6-Derivat für die Überproduktion von OdhA (NCgl1084) aus <i>C. glutamicum</i> mit 1257 AS und C-terminalem StrepTag-II ¹	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pEKEx2- <i>odhA</i> -1221	Kan ^R , pEKEx2-Derivat für die Überproduktion von nativem OdhA (NCgl1084) aus <i>C. glutamicum</i> mit 1221 AS und C-terminalem StrepTag-II	diese Arbeit
pAN6- <i>odhA</i> Δ2-124	Kan ^R , pAN6-Derivat für die Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 125-1257 mit C-terminalem StrepTag-II ²	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pEKEx2- <i>odhA</i> Δ354	Kan ^R , pEKEx2-Derivat für die Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 355-1221 mit C-terminalem StrepTag-II	diese Arbeit
pET24b- <i>odhA</i> Δ395	Kan ^R , pET24b(+)-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 396-1221 mit C-terminalem 6xHis-Tag	diese Arbeit

¹ Natives OdhA (1221 AS) mit zusätzlich 36 AS am N-Terminus.² Mit Bezug auf natives OdhA (1221 AS) in dieser Arbeit als OdhAΔ89 bezeichnet, entgegen der Nomenklatur in Krawczyk *et al.* (2010).

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pJC1- <i>odhI</i>	Kan ^R , pJC1-Derivat für die Überproduktion von OdhI (NCgl1385) aus <i>C. glutamicum</i> mit dem nativen Promoter von <i>odhI</i> und C-terminalem StrepTag-II	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i>	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion von OdhI (NCgl1385) aus <i>C. glutamicum</i> mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ2-43	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhI-Derivats von AS 44-143 mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz ³	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ2-67	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhI-Derivats von AS 68-143 mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ68-143	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhI-Derivats von AS 1-67 mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i> -S86A	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhI-Derivats mit dem Aminosäureaustausch S86A, mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz	(Krawczyk <i>et al.</i> , 2010)
pET-TEV- <i>odhI</i> -H89A	Kan ^R , pET-TEV-Derivat für die heterologe Überproduktion eines OdhI-Derivats mit dem Aminosäureaustausch H89A, mit N-terminalem 10xHis-Tag und TEV-Protease Erkennungssequenz	diese Arbeit
pAN6- <i>odhA</i> Δ89-C704R	Kan ^R , pAN6-Derivat für die Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 90-1221 mit dem Aminosäureaustausch C704R und C-terminalem StrepTag-II	diese Arbeit
pAN6- <i>odhA</i> Δ89-C704E	Kan ^R , pAN6-Derivat für die Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 90-1221 mit dem Aminosäureaustausch C704E und C-terminalem StrepTag-II	diese Arbeit
pAN6- <i>odhA</i> Δ89-C704S	Kan ^R , pAN6-Derivat für die Überproduktion eines OdhA-Derivats von AS 90-1221 mit dem Aminosäureaustausch C704S und C-terminalem StrepTag-II	diese Arbeit
pK19mobsacB- <i>odhA</i> -C704R	Kan ^R , pK19mobsacB-Derivat zum chromosomalen Austausch von <i>odhA</i> (NCgl1084) durch <i>odhA</i> -C704R in <i>C. glutamicum</i>	diese Arbeit

³ In dieser Arbeit mit OdhIΔ43 bezeichnet, entgegen der Nomenklatur in Krawczyk *et al.* (2010).

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pEKEx2-Strep_ <i>odhI</i> Δ43- <i>odhA</i> Δ354	Kan ^R , pEKEx2-Derivat für die Überproduktion eines Interaktionskomplexes aus einem <i>Odhl</i> -Derivat von AS 44-143 mit N-terminalem StrepTag-II und einem <i>OdhA</i> -Derivat von AS 355-1221	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-A59K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch A59K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-T68K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch T68K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-R93K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch R93K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-E96K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch E96K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-E100K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch E100K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-V104K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch V104K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Y111K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch Y111K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-R117K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch R117K	diese Arbeit
pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-R134K	Kan ^R , pET-TEV- <i>odhI</i> Δ43-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch R134K	diese Arbeit
pQE1- <i>odhI</i>	Carb ^R , pQE1-Derivat für die heterologe Überproduktion von <i>Odhl</i> (NCgl1385) aus <i>C. glutamicum</i> mit N-terminalem 6xHis-Tag	diese Arbeit
pQE1- <i>odhI</i> -T14D	Carb ^R , pQE1-Derivat für die heterologe Überproduktion eines <i>Odhl</i> -Derivats mit dem Aminosäureaustausch T14D, mit N-terminalem und durch TAGZyme spaltbaren 6xHis-Tag	diese Arbeit

2.3 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden ausschließlich von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert und sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide. Ribosomenbindestellen sind fett dargestellt, Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen und die Sequenz für Affinitätstags ist kursiv dargestellt. Gewünschte Mutationen zur ortsgerichteten Mutagenese sind in rot hervorgehoben.

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
Konstruktion		
odhA-Start-for	CT GAG CTA <u>GGA TCC</u> CTC TAC GAC CCC AAT GAA GG	<i>BamHI</i>
odhA-Start-rev	TA GCT CAG <u>GAA TTC</u> ATT <i>GTG ATG GTG ATG GTG ATG</i> GGC AGC CTT TGG TGC TGG TT	<i>EcoRI</i> , 6xHis-Tag
odhA1221-for	T GAA <u>GTC GAC</u> AAG GAG ATA TAG ATG TGA GCA GCG CTA GTA CTT TC	<i>Sall</i> , RBS
odhAStrep-rev	C ATT <u>GGA TCC</u> <i>TTA CTT CTC</i> GAA CTG TGG GTG GGA CCA GCT AGC AGC CTC GAA AGC CT	<i>BamHI</i> , StrepTag-II
odhAd354-for	T GAA <u>GTC GAC</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGC GTT GGG CAC AGG ACG TTC	<i>Sall</i> , RBS
odhAd395-for	CT GAG CTA <u>CAT ATG</u> CAG CCT GGC ATG CCA GTT CCA GAC CA	<i>NdeI</i>
odhA-rev-oStop	TA GCT CAG <u>GTC GAC</u> AGC CTC GAA AGC CTC GTC GAT AAG CTG	<i>Sall</i>
1odhI-for	AA <u>CTG CAG</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGG CTA GCT GGA <i>GCC ACC CGC AGT TCG</i> AAA AAG CTA GCA TGG CAG GAT CTG	<i>PstI</i> , RBS, StrepTag-II
1odhI-rev	TT <u>GGA TCC</u> TTA CTC AGC AGG GC	<i>BamHI</i>
2odhAd354-for	AA <u>GGA TCC</u> AAG GAG ATA TAG ATA TGC GTT GGG CAC A	<i>BamHI</i> , RBS
2odhA-rev	TT <u>GAA TTC</u> TTA AGC CTC GAA AG	<i>EcoRI</i>
pK19-odhA-for	GTG AGC AGC GCT AGT ACT TTC	
pK19-odhA-rev	TTA AGC CTC GAA AGC CTC GTC	
pQE1-odhI-for	CT GAG CTA <u>CAGCTG</u> ATG AGC GAC AAC AAC GGC ACC	<i>PvuII</i>
pQE1-odhI-rev	CT GAG CTA <u>AAG CCT</u> TTA CTC AGC AGG GCC TGC GAG	<i>HindIII</i>
Sequenzierung		
puniv	CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC	
rsp1	CAC AGG AAA CAG CTA TGA CCA TG	
pEKEx2-for	CGG CGT TTC ACT TCT GAG TTC GGC	
pEKEx2-rev	GAT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC	
odhA-b80-up	AGC CAA CGA CCA ACG TTA CAG	
odhA-b988-rv	TGC GCA GGA ATT CAC CGG A	

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
odhA-for2	TGT CGG TTC CAT GGA TTA CC	
odhA-b2051-rv	GTG GTG AAG CCG ATC TGG TT	
odhA-for4	CCA GAA ACC ATC AAC CTG GC	
odhA-52b-dwn	GCA GCA AAA AGG GCC GTA TGC TGT GT	
odhI-78b-up	CAG GAA ATT CTA GGA TCT TAC GGA	
odhI-76b-dwn	GGC ATT CTA TAC ACA AAA CGG TTG	
pQE1-32-for	GTG AGC GGA TAA CAA TTA TAA TAG	
pET16b-seq-fw	CGA TCC CGC GAA ATT AAT ACG	
pET16b-seq-rv	CAA GAC CCG TTT AGA GGC CCC	

Ortsgerichtete Mutagenese

odhA-C704R-for	GAC TAC GCC AAG GCA TTC GGC CGC CCA GTC TTC CAC GTC AAC
odhA-C704R-rev	GTT GAC GTG GAA GAC TGG GCG GCC GAA TGC CTT GGC GTA GTC
odhA-C704E-for	GAC TAC GCC AAG GCA TTC GGC GAA CCA GTC TTC CAC GTC AAC
odhA-C704E-rev	GTT GAC GTG GAA GAC TGG TTG GCC GAA TGC CTT GGC GTA GTC
odhA-C704S-for	GAC TAC GCC AAG GCA TTC GGC AGC CCA GTC TTC CAC GTC AAC
odhA-C704S-rev	GTT GAC GTG GAA GAC TGG GCT GCC GAA TGC CTT GGC GTA GTC
odhI-T14D-for	CC CCG GAG CCA CAG GTC GAG GAC ACC TCA GTA TTC CGC GC
odhI-T14D-rev	GC GCG GAA TAC TGA GGT GTC CTC GAC CTG TGG CTC CGG GG
odhI-H89A-for	CC GTT TCA CGT CGC GCT GCA GAG TTC CGC ATC
odhI-H89A-rev	GATGCGGAAGTCTGC AGC GCGACGTGAAACGG
odhI-A59K-for	C AAG CGT GGA CCA AAT GCA GGC AAG CG ATT CCT TCT GGA CCA GC
odhI-A59K-rev	G CTG GTC CAG AAG GAA TCG CTT GCC TGC ATT TGG TCC ACG CTT G
odhI-T68K-for	CTT CTG GAC CAG CCA ACC AAG ACC GCT GGT CGT CAC CCA GAA AG
odhI-T68K-rev	CT TTC TGG GTG ACG ACC AGC GGT CTT GGT TGG CTG GTC CAG AAG
odhI-R93K-for	CA CGT CGC CAC GCA GAG TTC AAG ATC AAT GAA GGT GAA
odhI-R93K-rev	TTC ACC TTC ATT GAT CTT GAA CTC TGC GTG GCG ACG TG
odhI-E96K-for	AC GCA GAG TTC CGC ATC AAT AAG GGT GAA TTT GAA GTC GTG
odhI-E96K-rev	CAC GAC TTC AAA TTC ACC CTT ATT GAT GCG GAA CTC TGC GT
odhI-E100K-for	ATC AAT GAA GGT GAA TTT AAG GTC GTG GAC GTA GGG TCC CT

Name	Sequenz (5'-3')	Merkmale
odhI-E100K-rev	AG GGA CCC TAC GTC CAC GAC CTT AAA TTC ACC TTC ATT GAT	
odhI-V104K-for	GT GAA TTT GAA GTC GTG GAC AAG GGG TCC CTC AAC GGA ACC	
odhI-V104K-rev	GGT TCC GTT GAG GGA CCC CTT GTC CAC GAC TTC AAA TTC AC	
odhI-Y111K-for	G TCC CTC AAC GGA ACC AAG GTT AAC CGC GAG CCA CGC AAC	
odhI-Y111K-rev	GTT GCG TGG CTC GCG GTT AAC CTT GGT TCC GTT GAG GGA C	
odhI-R117K-for	ACC TAC GTT AAC CGC GAG CCA AAG AAC GCT CAG GTC ATG C	
odhI-R117K-rev	G CAT GAC CTG AGC GTT CTT TGG CTC GCG GTT AAC GTA GGT	
odhI-R134K-for	AG ATC CAG ATT GGC AAG TTC AAG CTG GTT TTC CTC GCA GGC	
odhI-R134K-rev	GCC TGC GAG GAA AAC CAG CTT GAA CTT GCC AAT CTG GAT CT	

2.4 Konstruktion von Plasmiden

pEKEx2-*odhA*-1221

Zur Expression von *odhA* aus *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden *odhA*1221-for und *odhA*Strep-rev amplifiziert. Das mit *Sall* und *BamHI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *Sall* und *BamHI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem C-terminalen StrepTag-II möglich.

pEKEx2-*odhA*Δ354

Zur Überproduktion eines *OdHA*-Peptids von Aminosäure 355-1221 aus *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden *odhA*Δ354-for und *odhA*Strep-rev amplifiziert. Das mit *Sall* und *BamHI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *Sall* und *BamHI* geschnittenen Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem C-terminalen StrepTag-II möglich.

pET24b-*odhA*Δ395

Zur Überproduktion eines OdhA-Peptids von Aminosäure 396-1221 aus *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden *odhAd395-for* und *odhA-rev-oStop* amplifiziert. Das mit *NdeI* und *Sall* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *NdeI* und *Sall* geschnittenen Vektor pET24b(+) ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem C-terminalen 6xHis-Tag möglich.

pAN6-*odhA*Δ89-C704R, -C704E, -C704S

Zur Überproduktion der OdhA-Peptide von Aminosäure 90-1221 aus *C. glutamicum* mit einem Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin, Glutamat oder Serin an Position 704 (bezogen auf OdhA-1221) wurde der Expressionsvektor pAN6-*odhA*Δ89 entsprechend mit den Oligonukleotidpaaren *odhA-C704R-for* und *odhA-C704R-rev*, *odhA-C704E-for* und *odhA-C704E-rev* bzw. *odhA-C704S-for* und *odhA-C704S-rev* amplifiziert. Die Matrize wurde nach PCR mit Hilfe von *DpnI* restringiert und die erhaltenen Amplifikate in *E. coli* DH5α zirkularisiert. Der Erfolg dieser ortsgerichteten Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hier mit einem C-terminalen StrepTag-II möglich.

pK19mobsacB-*odhA*-C704R

Zur Integration der Mutation C704R im chromosomal kodierten *odhA* von *C. glutamicum* Δ*pknG* wurde der kodierende Bereich von *odhA* aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden pK19-*odhA-for* und pK19-*odhA-rev* amplifiziert. Das Amplifikat wurde mit glatten Enden in den *SmaI*-geschnittenen Vektor pK19mobsacB ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Der Vektor pK19mobsacB-*odhA* wurde im Anschluss mit den Oligonukleotiden *odhA-C704R-for* und *odhA-C704R-rev* amplifiziert. Die Matrize wurde nach PCR mit Hilfe von *DpnI* restringiert und die erhaltenen Amplifikate in *E. coli* DH5α zirkularisiert. Der Erfolg dieser ortsgerichteten Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft.

pET-TEV-*odhI*-H89A

Zur Überproduktion von OdhI mit der Mutation H89A wurde der Vektor pET-TEV-*odhI* mit den Oligonukleotiden *odhI-H89A-for* und *odhI-H89A-rev* amplifiziert. Die Matrize wurde nach PCR mit Hilfe von *DpnI* restringiert und das erhaltene Amplifikat in *E. coli* DH5α zirkularisiert. Der Erfolg dieser ortsgerichteten Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem N-terminalen, TEV-Protease-spaltbaren 10xHis-Tag möglich.

pET-TEV-odhI Δ 43-A59K

Zur Überproduktion des OdhI-Peptids von Aminosäure 44-143 aus *C. glutamicum* mit einem Aminosäureaustausch von Alanin zu Lysin an Position 59 (bezogen auf die Volllänge von OdhI) wurde der Vektor pET-TEV-odhI Δ 43 mit den Oligonukleotiden odhI-A59K-for und odhI-A59K-rv amplifiziert. Die Matrize wurde nach PCR mit Hilfe von *DpnI* restringiert und das erhaltene Amplifikat in *E. coli* DH5 α zirkularisiert. Der Erfolg dieser ortsgerichteten Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem N-terminalen, TEV-Protease-spaltbaren 10xHis-Tag möglich.

Die Vektoren zur Überproduktion weiterer OdhI-Peptide von Aminosäure 44-143 aus *C. glutamicum* mit einem Aminosäureaustausch an einer ausgewählten Position zu Lysin wurden, ebenso wie für pET-TEV-odhI Δ 43-A59K beschrieben, mit den entsprechenden Oligonukleotiden aus Tabelle 2.4 (Ortsgerichtete Mutagenese) konstruiert.

pQE1-odhI

Zur Expression von *odhI* aus *C. glutamicum* wurde der kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden pQE1-odhI-for und pQE1-odhI-rev amplifiziert. Das Amplifikat wurde in den *PvuII*-geschnittenen Vektor pQE1 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem N-terminalen, TAGZyme-spaltbaren 6xHis-Tag möglich.

pQE1-odhI-T14D

Zur Überproduktion von OdhI aus *C. glutamicum* mit der Mutation T14D wurde der Vektor pQE1-odhI mit den Oligonukleotiden odhI-T14D-for und odhI-T14D-rev amplifiziert. Die Matrize wurde nach PCR mit Hilfe von *DpnI* restringiert und das erhaltene Amplifikat in *E. coli* DH5 α zirkularisiert. Der Erfolg dieser ortsgerichteten Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung war hierdurch mit einem N-terminalen und durch TAGZyme spaltbaren 6xHis-Tag möglich.

pEKEx2-Strep_odhI Δ 43-odhA Δ 354

Zur Überproduktion eines Interaktionskomplexes aus einem OdhI-Peptid von Aminosäure 44-143 mit einem OdhA-Peptid von Aminosäure 355-1221 aus *C. glutamicum* wurde zunächst der kodierende Bereich für *odhI* aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden 1odhI-for und 1odhI-rev amplifiziert. Das mit *PstI* und *BamHI* geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *PstI* und *BamHI* geöffneten Vektor pEKEx2 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft.

Anschließend wurde der für *odhA* kodierende Bereich aus genomischer DNA von *C. glutamicum* mit den Oligonukleotiden 2odhAd354-for und 2odhA-rev amplifiziert. Das mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnittene Produkt wurde in den ebenfalls mit *Bam*HI und *Eco*RI geöffneten Vektor pEKEx2-Strep_odh Δ 43 ligiert und der Erfolg der Klonierung mittels Sequenzierung überprüft. Die Überproduktion und Reinigung des Interaktionskomplexes war hierdurch mit einem StrepTag-II am aminoterminalen Ende von Odh Δ 43 möglich.

2.5 Kultivierungsbedingungen

2.5.1 Nährmedien

Alle Medien wurden mit H₂O dest. angesetzt und 15-20 min bei 121°C autoklaviert.

BHI-Medium: 37 g/l BHI (Menkel *et al.*, 1989)

BHIS-Medium: 37 g/l BHI, 182 g/l Sorbitol (Menkel *et al.*, 1989)

MM + 100 mM Gln: 1 g/l KH₂PO₄, 1 g/l K₂HPO₄, 0,5 g/l MgSO₄ x 7 H₂O, 10 mg/l CaCl₂, 42 g/l MOPS, 0,2 mg/l Biotin, pH 7 (mit NaOH einstellen), nach dem Autoklavieren 1 ml/l Protokatechusäure (30 g/l in verd. NaOH gelöst, sterilfiltriert), 1 ml/l Spurensalzlösung (Keilhauer *et al.*, 1993), 14,6 g/l L-Glutamin (in pulverform zugeben, weil die Löslichkeit bei RT nur 26 g/l beträgt; bei zu hohen Temperaturen wandelt sich L-Glutamin zu Oxoprolin um)

LB-Medium: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl (Bertani, 1951)

SOB-Medium: 20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,6 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, nach dem Autoklavieren 1 g/l MgCl₂ und 1 g/l MgSO₄ (jeweils sterilfiltriert) zugeben (Hanahan, 1983)

Spurensalzlösung: 10 g/l FeSO₄ x 7 H₂O, 10 g/l MnSO₄ x H₂O, 1 g/l ZnSO₄ x 7 H₂O, 0,2 g/l CuSO₄ x 5 H₂O, 20 mg/l NiCl₂ x 6 H₂O, zum Lösen mit HCl auf pH 1 ansäuern und mit H₂O dest. auffüllen (Keilhauer *et al.*, 1993)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 15 g/l Agar zugesetzt. Zur selektiven Kultivierung antibiotikaresistenter Bakterienstämme wurden dem jeweiligen Medium entweder 25-50 µg/ml Kanamycin oder 50 µg/ml Carbenicillin zugesetzt.

2.5.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli*-Stämmen erfolgte, wenn nicht anders vermerkt, in 50 – 100 ml LB-Medium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 37 °C inkubiert und im Falle von Flüssigkulturen bei 120 Upm (Erlenmeyerkolben) oder 170 Upm (Reagenzgläser) geschüttelt. Zur Proteinexpression wurden die Kulturen bei einer OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 mit 0,1 mM IPTG induziert und danach zur Vermeidung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) bei 30 °C für 4 h inkubiert. Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 15-20 h bei 37 °C und 170 Upm inkubiert. 600 µl der Kultur wurden mit 30 % sterilem Glycerin versetzt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei -75 °C gelagert.

2.5.3 Kultivierung von *C. glutamicum*

Die Kultivierung von *C. glutamicum* erfolgte standardisiert in 50 – 100 ml BHI-Medium + 2 % Glukose in Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen oder in 5 ml Medium in Reagenzgläsern. Alle *C. glutamicum*-Stämme wurden bei 30 °C inkubiert und im Falle von Flüssigkulturen bei 120 Upm (Erlenmeyerkolben) oder 170 Upm (Reagenzgläser) geschüttelt. Für die Kultivierung wurden, wenn nicht anders vermerkt, Vorkulturen in 50 ml BHI-Medium + 2 % Glukose von Platten angeimpft, die nicht älter als 7 Tage waren. Aus diesen wurden nach Kultivierung bei 30 °C und 120 Upm für 15 h die Hauptkultur in 50 ml BHI-Medium + 2 % Glukose angeimpft. Zur Proteinexpression wurden den Hauptkulturen bei einer OD₆₀₀ von 1 0,1 mM IPTG zugegeben und diese anschließend für weitere 4 h bei 30 °C kultiviert. Zur Stammhaltung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 5 ml BHI-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und 15-20 h bei 30 °C und 170 Upm inkubiert. 2 ml der Kultur wurden zentrifugiert, in 1 ml BHI-Medium resuspendiert und mit 30 % sterilem Glycerin versetzt. Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei -75 °C gelagert.

2.5.4 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen

Das Wachstum von Bakterien in Flüssigkultur wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 600 nm mit einem Ultrospec 3300 pro Spectrophotometer (Amersham Biosciences, Freiburg) bestimmt. Eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der optischen Dichte ist bis zu einer Extinktion von 0,5 gegeben. Lag die gemessene Extinktion über dieser Grenze wurde die Probe mit dem entsprechenden Medium verdünnt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus *C. glutamicum*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *C. glutamicum* wurde 1 ml einer Übernachtskultur pelletiert und die Zellen gemäß den Angaben des Herstellers mit Hilfe des DNeasy™ Tissue Kit (QIAGEN, Hilden) behandelt.

2.6.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA

Ausgehend von 5 ml Übernachtskulturen erfolgte die Isolierung und Reinigung von Plasmiden aus *E. coli* im kleinen Maßstab mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Hilden), das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht (Birnboim *et al.*, 1979). Zur Isolierung größerer Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden 50 ml Übernachtskulturen und das QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Hilden) nach Herstellerangaben benutzt.

2.6.1.3 Reinigung von DNA

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen, zur Reinigung von PCR-Produkten und zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsansätzen wurde das MN NucleoSpin Extract II Kit (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben benutzt.

2.6.1.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Zur Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die Extinktionsmessung einer wässrigen Nukleinsäurelösung erfolgte am ND-1000 (NanoDrop Technologies, Delaware, USA). Es wurden dabei folgende Umrechnungsfaktoren verwendet (Sambrook *et al.*, 1989):

ds-DNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml.

ss-DNA und RNA: $OD_{260} = 1$ entspricht einer Konzentration von 40 µg/ml.

Der Reinheitsgrad der DNA wurde anhand der Quotienten OD_{260}/OD_{280} bzw. OD_{260}/OD_{230} bestimmt, deren Werte zwischen 1,8 und 2,0 liegen sollten. Bei starker Verunreinigung der DNA mit Proteinen oder Polysacchariden liegt der Wert unter 1,8.

2.6.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Trennung von DNA genutzt. Sie diente der Kontrolle der DNA-Isolation, der PCR und der Restriktionsenzymspaltung sowie der Konzentrationsbestimmung. Soweit nicht anders angegeben wurden 1 %ige (w/v) Agarose-Gele in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8 mit Essigsäure einstellen) verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen DNA-Ladepuffer (0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 100 mM Na₂EDTA, 34 % (v/v) Glycerin) gemischt. Als Größenstandard diente GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (Fermentas, St. Leon-Rot). Die Trennung erfolgte je nach der Größe des Gels bei einer Spannung von 70 – 100 V für etwa 1 h. Nach der elektrophoretischen Trennung wurde das Gel in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gefärbt und das in die Doppelstränge interkalierte Ethidiumbromid durch UV-Anregung sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Geldokumentationssystems Quantum (Peq-Lab, Erlangen).

2.6.3 Rekombinante DNA-Techniken

Zur Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St. Leon-Rot bzw. Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers benutzt. Die Ansätze (50 - 100 µl für präparative Arbeiten, 10 µl für analytische Arbeiten) enthielten in der Regel 200 ng-10 µg DNA und 5–15 U des gewünschten Enzyms und wurden 2-5 h bei der vorgeschriebenen Temperatur (meist 37 °C) inkubiert. Der Erfolg der Spaltung wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Die alkalische Phosphatase katalysiert die hydrolytische Abspaltung der Phosphatgruppe von den 5'-Enden der DNA. Da die Ligase nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Enden verknüpfen kann, wurde durch Behandlung linearer Vektor-DNA mit alkalischer Phosphatase eine Rezirkularisierung des Vektoranteils bei der Ligationsreaktion vermieden. Hierdurch wurde der Anteil rekombinanter Plasmide im Ligationsansatz erhöht. Zur Dephosphorylierung der 5'-Stränge wurde das Plasmid mit 0,5 U alkalischer Phosphatase (Shrimp alkaline phosphatase, Roche Diagnostics, Mannheim) versetzt und 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung der alkalischen Phosphatase für 10 min bei 72 °C.

Für Ligationen wurde das Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim oder Fermentas, St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben verwendet.

2.6.4 Herstellung und Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen

Durch eine RbCl_2 -Behandlung erhielten *E. coli*-Zellen die Kompetenz freie DNA aus dem Medium aufzunehmen (Hanahan, 1985). Zur Herstellung chemokompetenter Zellen wurden einige Kolonien von einer frischen LB-Platte in 1 ml SOB-Medium resuspendiert und damit 50 ml SOB-Medium inokuliert. Bei Plasmid-tragenden Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Die Kultur wurde bei 37 °C und 120 Upm bis zu einer OD_{600} von 0,5 inkubiert. Danach wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert, 15 min bei 3.500 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) und 4 °C geerntet, in eiskalter RF1-Lösung (100 mM RbCl_2 , 50 mM MnCl_2 , 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl_2 , 15 % Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in eiskalter RF2-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl_2 , 75 mM CaCl_2 , 15 % (w/v) Glycerin, pH 6,8) resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und abschließend in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, die sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Zellen wurden bis zur Verwendung bei -75 °C gelagert.

Zur Transformation chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurden 200 µl der Zellen mit etwa 0,5 µg Plasmid oder 20 µl Ligationsansatz gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 90 s bei 42 °C wurden 800 µl LB-Medium zugegeben und der Ansatz für weitere 45 min bei 37 °C inkubiert. Entsprechend dem Resistenzgen des transferierten Plasmids wurde der Ansatz auf LB-Platten mit Antibiotikum ausplattiert.

2.6.5 Herstellung und Transformation elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen

Zur Herstellung elektrokompetenter *C. glutamicum*-Zellen wurde eine Vorkultur aus 50 ml BHIS-Medium von einer frischen BHIS-Platte angeimpft und 15 h bei 30 °C und 120 Upm inkubiert. Bei Plasmid tragenden Stämmen mit Antibiotikaresistenzen wurde das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. 10 ml der Vorkultur wurden dann zur Inokulation der Hauptkultur in 500 ml vorgewärmtem BHIS-Medium verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C und 120 Upm bis zu einer OD_{600} von 1,75 (van der Rest *et al.*, 1999). Die Zellen wurden 15 min bei 3.500 g (Megafuge 1.0R, Heraeus) und 4 °C geerntet, in 25 ml TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Waschschrift mit TG-Puffer wurde weitere zwei Male wiederholt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 10 %igen (v/v) Glycerin gewaschen, in 1 ml 10 %igem (v/v) Glycerin resuspendiert, in Portionen von 150 µl aliquotiert und bei -75 °C gelagert.

Die Transformation der elektrokompenten *C. glutamicum*-Zellen wurde mittels Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock durchgeführt (Tauch *et al.*, 2002). Dazu wurden 150 µl kompetente Zellen mit etwa 1 µg Plasmid in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (Gene Pulser Cuvette, 0,2 cm, Bio-Rad, München) gemischt und mit 800 µl 10 %igem (v/v) Glycerin überschichtet. Die Elektroporation (Gene Pulser Xcell, Bio-Rad, München) erfolgte mit einer Kapazität von 25 µF, einem Widerstand von 200 Ω und einer Spannung von 2,5 kV. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHIS-Medium überführt, 6 min bei 46 °C inkubiert, 1 h bei 30 °C regeneriert und auf BHIS-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert.

2.6.6 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion

Definierte DNA-Fragmente wurden sowohl für analytische (Kontrolle von Transformanten und Deletionsmutanten, 2.6.6.2) als auch für präparative Zwecke (*in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten, 2.6.6.1) mittels der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) amplifiziert (Mullis *et al.*, 1987). Falls im Text nicht anders vermerkt wurde für präparative PCR-Ansätze die KOD Hot Start DNA-Polymerase (Merck, Darmstadt) und für analytische PCR-Ansätze die Taq DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Reaktionen wurden in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Reaktionsbedingungen für die PCR wurden entsprechend der Angaben des Herstellers gewählt. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert (Tabelle 2.4). Zur Reinigung wurden die PCR-Fragmente aus dem Gel mit dem NucleoSpin Extract II Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

2.6.6.1 *In vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Diese Ansätze enthielten 0,1-0,75 µg Matrizen-DNA, je 300 nM vorwärts- und rückwärts-Oligonukleotide, 0,02 U KOD Hot Start DNA-Polymerase, 1,5 mM MgSO₄ sowie je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Nach einem Denaturierungsschritt von 5 min bei 95 °C wurden 35 Zyklen gemäß Herstellerangaben durchlaufen. Die Anlagerungs-Temperatur wurde üblicherweise 5 °C unter der Schmelztemperatur T_m der Oligonukleotide gewählt. Die Schmelztemperatur T_m der DNA kann mit der Formel $T_m [^{\circ}\text{C}] = [(G + C) \cdot 4] + [(A + T) \cdot 2]$ abgeschätzt werden (Sambrook *et al.*, 1989). Als Elongationszeit wurden 30 s pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

2.6.6.2 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von *E. coli*-Transformanden wurden einzelne Kolonien mit einer sterilen Pipettenspitze von der Platte abgenommen und direkt dem PCR-Ansatz als Matrize zugesetzt. Der an der Pipettenspitze verbliebene Rest der Zellen wurde auf einer frischen LB-Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und bei 37 °C inkubiert. Die PCR erfolgte in Ansätzen von 25 µl Gesamtvolumen, die neben der Kolonie als Matrizen-DNA je 400 nM vorwärts- und rückwärts-Oligonukleotide, 1,25 U Taq-DNA-Polymerase (Fermentas, St. Leon-Rot) und je 200 µM dATP, dGTP, dCTP und dTTP enthielten. Zur Lyse der Zellen wurde der Ansatz zunächst 5 min bei 95 °C inkubiert und danach 35 Zyklen nach Herstellerangaben durchlaufen. Die Berechnung der Anlagerungs-Temperatur und der Elongationszeit erfolgte wie unter 2.6.6.1 beschrieben.

2.6.7 Ortsgerichtete Mutagenese *in vitro*

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit dem QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für die Mutation wurden zwei komplementäre Oligonukleotide, die im zentralen Bereich die gewünschte Mutation enthielten (Tabelle 2.4), ausgewählt. Zur ortsgerechten Mutagenese wurden Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 50 µl angesetzt. Diese Ansätze enthielten 5-50 ng Matrizen-DNA, je 125 ng vorwärts- und rückwärts-Oligonukleotide, 2,5 U KOD PfuTurbo DNA-Polymerase, 5 µl 10 x Reaktionspuffer sowie je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP und dTTP. Die Mutagenesereaktion wurde in einem T3000 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Nach einem Denaturierungsschritt von 30 sec bei 95 °C wurden 16 Zyklen nach Herstellerangaben durchlaufen. Die Anlagerungs-Temperatur betrug für alle Mutagenesereaktionen 55 °C. Als Elongationszeit wurde 1 min pro 1 kb des zu amplifizierenden Fragments verwendet. Der Erfolg der PCR wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

Im ersten Zyklus binden die Primer nur an die Ausgangs-DNA. Nach der Elongation entsteht eine Heteroduplex aus einem zirkulären Wildtypstrang und einem mutierten Strang, der dort, wo das elongierte 3'-Ende auf das 5'-Ende des Primers trifft, eine Lücke (*nick*) enthält. Der mutierte Strang ist demnach ein lineares Molekül. Nach erneuter Denaturierung können die Primer auch an die von der PfuTurbo DNA-Polymerase neu synthetisierten Stränge binden, nicht aber elongiert werden. Daraus folgt, dass bei allen durchlaufenen Zyklen ausschließlich die Ausgangs-DNA als Matrize für die Neusynthese der mutierten Stränge dient und eventuelle Fehler, die bei den neuen Strängen in seltenen Fällen auftreten können, nicht amplifiziert werden. Das Ausgangsplasmid wurde aus *E. coli* DH5α isoliert und war daher durch die DNA-Adenin-Methylase (*dam*-Genprodukt) methyliert. Der in der Mutagenese-Reaktion neu synthetisierten DNA fehlt diese

Methylierung. Die Parental-DNA wurde mit *DpnI*, einem Restriktionsenzym, welches spezifisch die hemimethylierte oder vollständige methylierte Sequenz 5'-Gm6ATC-3' schneidet, restringiert. Es wurden 10 U *DpnI* je Reaktionsansatz hinzugefügt und 1 h bei 37°C inkubiert. Chemokompetente *E. coli* DH5 α -Zellen wurden mit 1 μ l des *DpnI*- geschnittenen Mutageneseansatzes transformiert und auf selektiven LB-Platten mit einem entsprechenden Antibiotikum inkubiert. Abschließend erfolgte eine Überprüfung der Mutation mittels DNA-Sequenzanalyse wie in 2.6.9 beschrieben.

2.6.8 Ortsgerichtete Mutagenese *in vivo* mit pK19mobsacB

Von *C. glutamicum* wurden chromosomale Mutanten nach der von (Schafer *et al.*, 1994) beschriebenen Methode mit dem Vektor pK19mobsacB konstruiert. Nach Klonierung und Sequenzierung des Vektors pK19mobsacB-*odhA*-C704R wurde dieser mittels Elektroporation (2.6.5) in *C. glutamicum* transferiert und auf BHIS-Agarplatten mit 15 μ g/ml Kanamycin ausplattiert. Da der Vektor pK19mobsacB in *C. glutamicum* nicht repliziert wird, wurden Kanamycin-resistente Klone, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert wurde, selektioniert. Im Anschluss wurden Kanamycin-resistente Klone über Nacht in 5 ml BHI-Medium ohne Antibiotikum inkubiert, um ein zweites Rekombinationsereignis zu induzieren. Jeweils 100 μ l von 1:1.000 - 1:10.000-Verdünnungen der Kulturen wurden auf BHIS-Agarplatten mit 10 % (w/v) Saccharose ausplattiert. Das *sacB*-Gen des Plasmids pK19mobsacB kodiert für das Enzym Levansucrase, welches Saccharose in die Monosaccharide Fructose und Glukose spaltet und Fructose zu oligomerem Levan polymerisiert. Da gezeigt werden konnte, dass die *sacB*-Expression in Anwesenheit von Saccharose lethal für *C. glutamicum* ist (Jager *et al.*, 1992), sollte bei Saccharose-resistenten Klonen das Plasmid durch ein weiteres Rekombinationsereignis wieder aus dem Chromosom entfernt worden sein. Dieses zweite Rekombinationsereignis führt entweder zur Wiederherstellung der genetischen Wildtyp-Situation oder zur Etablierung der erzielten chromosomalen Mutation. Die nach dem zweiten Rekombinationsereignis erhaltenen Klone, die sowohl Saccharose-resistent als auch Kanamycin-sensitiv waren, wurden durch DNA-Sequenzanalyse (2.6.9) auf den entsprechenden Basenaustausch hin überprüft.

2.6.9 DNA-Sequenzanalyse

Für DNA-Sequenzierungen wurde die Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Zugabe von ddNTP's verwendet. Hierfür wurde die durch QIAprep Spin Miniprep Kit oder Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen, Hilden) isolierte hochreine DNA mit den entsprechenden Oligonukleotiden (Tabelle 2.4) bei der Firma LGC Genomics (Berlin) sequenziert. Pro Reaktion waren dabei 1 μ g Plasmid-DNA und 20 pmol Oligonukleotide notwendig.

2.7 Biochemische Methoden

2.7.1 Zellaufschluss mit Ultraschall

Zum Aufschluss von Zellen wurden diese aus max. 500 ml Kultur entweder in Lysispuffer (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH eingestellt) oder in StrepTag-Waschpuffer (100 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8 mit NaOH eingestellt) resuspendiert und anschließend in 2 ml-Reaktionsgefäßen in einem Eisbad mit Ultraschall behandelt. Zellen aus mehr als 500 ml *E. coli*-Kultur wurden in Rossettenzellen (Branson, Danbury, USA) aufgeschlossen. Die Behandlung für *E. coli*-Zellsuspensionen in 2 ml-Reaktionsgefäßen erfolgte dabei für 4 min mit einer Pulslänge von 30 % und einer Beschallintensität von 3 mit dem Ultraschalldesintegrator (Branson Sonifier W-250, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA). Für *C. glutamicum*-Zellen wurde die Aufschlusszeit auf 10 min erhöht. Der Aufschluss von *E. coli*-Zellsuspensionen in einer Rossettenzelle erfolgte für zweimal 5 min mit einer Pulslänge von 30 %, einer Beschallintensität von 8 und einer Pause von 1 min. Anschließend wurden in allen Fällen die Zelltrümmer durch Zentrifugation (1 h, 16.000 g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

2.7.2 Affinitätschromatographie mittels Ni^{2+} -NTA-Agarose

Die Reinigung von Proteinen mit einem Polyhistidin-Tag erfolgte über an Agarose gebundene Nickel-Nitrilotriessigsäure (Hochuli, 1988). Dazu wurden Säulen mit einem Bettvolumen von 1 ml Ni^{2+} -NTA-Agarose (QIAGEN, Hilden) vorbereitet und mit 20 ml Lysispuffers (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8 mit NaOH eingestellt) äquilibriert. Soweit nicht anders beschrieben wurde der komplette Rohextrakt zweimal auf die Säule geladen und schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit zweimal 10 ml Waschpuffer-20 (wie Lysispuffer, aber 20 mM Imidazol) und zweimal 5 ml Waschpuffer-80 (wie Lysispuffer, aber 80 mM Imidazol) entfernt. Zur Elution des spezifisch gebundenen Proteins wurde 6 x 1 ml Elutionspuffer-400 (wie Lysispuffer, aber 400 mM Imidazol) aufgetragen und einzeln gesammelt. Alle Elutionsfraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.7.5).

2.7.3 Affinitätschromatographie mittels StrepTactin-Sepharose

Proteine mit einem StrepTag-II (Sequenz: WSHPQFEK) wurden durch Affinitätschromatographie mit StrepTactin-Sepharose gereinigt (Skerra *et al.*, 2000). Dazu wurden Säulen mit einem Bettvolumen von 2 ml StrepTactin-Sepharose (IBA, Göttingen) vorbereitet und mit 8 ml des in 2.7.1 erwähnten StrepTag-Waschpuffers äquilibriert. Soweit nicht anders beschrieben wurde auch hier der komplette Rohextrakt zweimal auf die Säule geladen und schwach bzw. unspezifisch gebundene Proteine durch Waschen mit 6 x 2 ml StrepTag-Waschpuffer entfernt. Zur Elution des spezifisch gebundenen Proteins wurden 7 x 1 ml StrepTag-Elutionspuffer (wie StrepTag-Waschpuffer + 2,5 mM Desthiobiotin) aufgetragen und einzeln gesammelt. Alle Elutionsfraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Kontrolle der Reinigung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.7.5). Die Regeneration der Säule wurde durch dreimaliges Waschen mit je 10 ml StrepTag-Regenerationspuffer (wie StrepTag-Waschpuffer + 1 mM 4-Hydroxyazobenzol-2-Carboxylsäure) erreicht.

2.7.4 Größenausschluss-Chromatographie

Die Größenausschluss-Chromatographie wurde zur Reinigung von Proteinen sowie zur Bestimmung des apparenten nativen Molekulargewichts von Proteinen und Proteinkomplexen eingesetzt. Die Chromatographie erfolgte mittels Superdex™ 200 HiLoad 16/60 Säule, welche an ein ÄKTA™ Explorer-System (beides GE Healthcare GmbH, Freiburg) angeschlossen war. Die Säule wurde zuvor mit dem ausgewählten Puffer äquilibriert. Für die Größenbestimmung wurde 1 mg Protein in einem entsprechenden Puffer auf die Säule gegeben und mit einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. Zur Kalibrierung wurden Molekulargewichtsmarker (MWGF200, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) unter den gleichen Bedingungen analysiert. Die durch die Auftragung von V_e/V_0 (V_e : Elutionsvolumen in ml, V_0 : Ausschlussvolumen der Säule in ml) gegen das Molekulargewicht (kDa) erhaltene Ausgleichsgerade wurde zur Bestimmung des Molekulargewichtes des untersuchten Proteins benutzt. Für die Standardläufe wurden Alkohol-Dehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Carbon-Anhydrase (29 kDa) und Cytochrom c (12,4 kDa) nach Herstellerangaben in H₂O gelöst und chromatographisch getrennt. Für die Reinigung von Proteinen wurden die Elutionsfraktionen in 1 ml-Aliquots gesammelt und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Die Kontrolle der Elutionsfraktionen erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.7.5).

2.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Trennung löslicher Proteine nach ihrer Masse wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (Laemmli, 1970; Lewis *et al.*, 1970). Hierfür wurden 12 %ige Bis-Tris-Polyacrylamidgele (Invitrogen, Karlsruhe) in vertikalen Gelkammern (NuPAGE System, Invitrogen, Karlsruhe) und 1x MOPS-Puffer (2,5 mM MOPS, 2,5 mM Tris, 50 nM EDTA, 0,005 % (w/v) SDS, pH 7,7) verwendet. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6x SDS-Ladepuffer (350 mM Tris, 10 % (w/v) SDS, 60 mM DTT, 30 % (v/v) Glycerin, 0,175 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8) gemischt und 10 min bei 95 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde der PageRuler Unstained Protein Ladder Marker (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet. Die Trennung erfolgte bei konstanter Stromstärke (0,02 A pro Gel) und einer maximalen Spannung von 200 V.

Die Färbung der Proteine erfolgte durch den kolloidalen Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Zur Färbung wurden die Gele zunächst kurz in H₂O gewaschen, mit der Coomassie-Färbelösung (0,1 % (w/v) Coomassie brilliant blue, 40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure) bedeckt, 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und dann 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Entfernen von überschüssigem Farbstoff wurde die Färbelösung abgegossen, das Gel einmal mit H₂O gewaschen, mit Entfärbelösung (10 % (v/v) Ethanol, 7,5 % (v/v) Essigsäure) bedeckt, für 1 min bei maximaler Stärke in der Mikrowelle erhitzt und erneut mind. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für eine weitere Entfärbung wurden die Gele über Nacht in 10 %iger Essigsäure inkubiert.

2.7.6 Western Blot

Zur aminoterminalen Sequenzierung von Proteinen wurden diese mittels SDS-PAGE nach ihrer Größe getrennt und auf eine 2,0 µm dicke Invitrolon PVDF-Membran (Invitrogen, Karlsruhe) in *semi-dry*-Technik transferiert. Die auf Gelgröße zugeschnittene Membran wurde 5 min und das SDS-Gel 15 min in Towbin-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol; pH uneingestellt bei ca. 8,3) äquilibriert. Der Western-Blot-Aufbau erfolgte nach der *Sandwich*-Technik. Zwischen zwei Lagen von mit Towbin-Puffer angefeuchtetem Whatman-Papier (Whatman, Dassel) wurden die Membran und das Gel gelegt. Mit der Membranseite zur Anode wurde das *Sandwich* auf eine Trans-Blot Semi-dry Transfer-Cell (Biorad, München) gelegt. Der Transfer erfolgte für 1 h bei maximal 8,6 mA/cm² (15 V-Limitierung) pro Gel. Abschließend wurde die Membran 30 min mit Ponceau-S-Lösung (1 % (w/v) Ponceau S in 5 % (v/v) Essigsäure) gefärbt und 20 min mit 1 % (v/v) Essigsäure entfärbt.

2.7.7 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Soweit nicht anders angegeben wurden die Proteinkonzentrationen gereinigter Proteine mit dem Bicinchoninsäure (BCA)-Test bestimmt (Smith *et al.*, 1985). Hierbei wurden 50 µl Probe mit 1 ml BCA-Reagenz (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, USA) versetzt, zunächst 30 min bei 60 °C, dann 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Extinktion bei 562 nm gemessen (Ultrospec 3300 pro Spectrophotometer, Amersham Biosciences).

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Rohextrakten erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bensadoun *et al.* (1976). In je 1 ml Reaktionsvolumen wurden eine 1:10- und eine 1:100-Verdünnung des Rohextraktes mit H₂O hergestellt. Diese Proben wurden in einem ersten Schritt für 15 min mit 50 µl 0,3 % (w/v) Natrium-Desoxycholat bei RT inkubiert und anschließend durch Zugaben von 200 µl 36 %iger Trichloressigsäure gefällt. Das Präzipitat wurde für 10 min bei 16.000 g pelletiert in Lowryreagenz (100 µl 1 % (w/v) CuSO₄ x 4 H₂O + 100 µl 2 % (w/v) Na Tartrat + 10 ml 2 % (w/v) Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH) gelöst. In einem letzten Schritt wurden 100 µl einer 1:2-verdünnten Folin-Reagenz zugesetzt und der Reaktionsansatz dunkel für 30 min bei RT inkubiert. Der Nachweis beruhte auf einer Kupfer-Farbreaktion unter Ausschluss von Tageslicht, bei der die Reduktion des oxidierten bläulichen Kupferkomplexes (Cu²⁺) zum violetten Kupferkomplex (Cu⁺) bei einer Wellenlänge von 660 nm photometrisch bestimmt wurde. Als Standard wurde in allen Fällen 10, 25 und 50 µg Rinder-Serumalbumin (BSA) in H₂O gelöst verwendet.

2.7.8 Konzentrierung und Pufferaustausch von Proteinlösungen

Die Konzentrierung von Proteinen wurde mit Hilfe von Amicon Ultra- Konzentratoren (Millipore GmbH, Schwalbach) mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa oder 30 kDa nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Pufferaustausch erfolgte für gereinigte Proteine mittels Dialyse. Dafür wurden Protein-enhaltende Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie vereinigt und in einem Dialyseschlauch mit einer Ausschlussgröße von 12-14 kDa (Dialysis Tubing-Visking Size 10 Inf Dia 1-1/4"– 31,7 mm, Medicell International Ltd., London) über Nacht bei 4 °C in 2,5 l des Zielpuffers unter leichtem Rühren dialysiert. Der Pufferaustausch von Rohextrakt erfolgte durch Gelfiltration über PD10-Säulen (GE Healthcare GmbH, Freiburg) mit Sephadex-G25-Material nach Angaben des Herstellers. Die Säule wurde mit 25 ml des Ziel-Puffers äquilibriert. Anschließend wurden bis zu 2,5 ml Proteinlösung aufgetragen und die Proteine mit 3,5 ml des Ziel-Puffers eluiert.

2.7.9 Aminoterminal Sequenzanalyse von Proteinen

Um den N-Terminus von OdhA zu bestimmen, wurde das aminoterminal Ende von OdhA mit einem C-terminalen 6xHis-Tag plasmidkodiert in *C. glutamicum* überproduziert und über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie wie in 2.7.2 gereinigt. Das OdhA-Peptid wurde in einer SDS-PAGE separiert und mittels Western Blot auf eine Membran überführt (2.7.6). Die Bande, die dem OdhA-Peptid entsprach, wurde aus der Membran ausgeschnitten und das Peptid von der Firma Proteome Factory (Berlin) einer aminoterminalen Sequenzierung durch Edman-Abbau unterzogen.

2.7.10 *In vitro* Aktivitätsmessung der Oxoglutarat- und Pyruvat-Dehydrogenase

Die Oxoglutarat-Dehydrogenase (ODH) katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Oxoglutarat unter Bildung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Succinyl-CoA. Die Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) katalysiert die entsprechende Reaktion ausgehend von Pyruvat, in der $\text{NADH} + \text{H}^+$ und Acetyl-CoA gebildet werden. Zur Bestimmung der spezifischen ODH- bzw. PDH-Aktivität wurde eine Modifikation der Methode nach Shio *et al.* (1980) verwendet. Die Zellen aus 50 ml *C. glutamicum*-Kultur wurden in der exponentiellen Wachstumsphase geerntet. Das Zellpellet wurde zweimal in eiskaltem TES-Waschpuffer (0,1 M TES pH 7,2 eingestellt mit NaOH, 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 3 mM L-Cystein, 10 % (w/v) Glycerin) gewaschen und anschließend in 1 ml TES-Aufnahmepuffer (wie TES-Waschpuffer, aber 30 % (w/v) Glycerin) resuspendiert. Es folgte ein Zellaufschluss mittels Ultraschall und eine Zentrifugation (2.7.1). Der Rohextrakt wurde mittels PD-10-Säule in TES-Reaktionspuffer (50 mM TES pH 7,7 eingestellt mit NaOH) umgepuffert und abschließend 1 h bei 180.000 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration im Rohextrakt (2.7.7) wurden Messungen mit 100 µg Rohextrakt durchgeführt. Der Testansatz zur Messung der PDH-Aktivität enthielt 50 mM TES pH 7,7 eingestellt mit NaOH, 0,9 mM Thiamindiphosphat (ThDP), 50 µM Chlorpromazin, 6 mM Pyruvat, 3 mM L-Cystein, 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 2 mM NAD^+ und 100 µg Rohextrakt. Für die Bestimmung der ODH-Aktivität enthielt der Reaktionsansatz anstelle des Pyruvats 1,5 mM Oxoglutarat. Das Gesamtvolumen im Reaktionsansatz betrug immer 1 ml und wurde mit H_2O aufgefüllt. Die jeweilige Reaktion wurde durch Zugabe von 20 µl einer 10 mM CoA-Lösung gestartet und die Zunahme der Extinktion bei 340 nm über einen Zeitraum von 3 min bei 30 °C gemessen. In verschiedenen Testansätzen zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von OdhI auf die ODH-Aktivität wurden ausgewählte OdhI-Derivate vor Reaktionsbeginn 2 min bei 30 °C mit dem gesamten Reaktionsansatz inkubiert. Zur Berechnung der spezifischen ODH-/PDH-Aktivität wurde der Extinktionskoeffizient bei 340 nm von $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für NADH verwendet. Die spezifische Enzymaktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$] gibt die Menge von NADH [μmol] an, die pro Minute [min]

und Enzymmenge [mg] gebildet wird. Die Messung wurde in allen Fällen mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung lag dabei immer unter 5 %.

2.7.11 Bestimmung der spezifischen E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität

Die spezifische E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Reaktion des Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplexes in *C. glutamicum* wird von OdhA katalysiert. Die Bestimmung dieser *in vitro* Aktivität wurde mit gereinigten OdhA-Derivaten und in Anlehnung an Nemeria *et al.* (2001) durchgeführt. Dafür wurden OdhA-Derivate in *E. coli* überproduziert, mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt (2.7.2 bzw. 2.7.3) und Protein enthaltende Elutionsfraktionen mittels Dialyse in Reaktionspuffer (Kaliumphosphat pH 7,5 eingestellt mit NaOH) umgepuffert. Als künstlicher Elektronenakzeptor diente 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP), ein Redoxfarbstoff der in seiner oxidierten Form blau und im reduzierten Zustand farblos ist. Der Enzymtest beruhte auf der Reduktion des Farbstoffes durch die E1-Aktivität. Ein Testansatz enthielt 0,2 mM ThDP, 1 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 0,23 mM DCPIP (alle Substanzen gelöst in Reaktionspuffer) und 1 nmol OdhA-Derivat. Das Volumen im Reaktionsansatz betrug immer 1 ml und wurde mit Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 eingestellt mit NaOH aufgefüllt. Die jeweilige Reaktion wurde durch Zugabe von 20 μl einer 50 mM 2-Oxoglutarat-Lösung gestartet und die Abnahme der Extinktion bei 600 nm über einen Zeitraum von 3 min bei 30 °C gemessen. Zur Bestimmung der inhibitorischen Wirkung von OdhI auf die spezifische E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität *in vitro*, wurden in ausgewählten Testansätzen 10-20 nmol OdhI bzw. OdhI Δ 43 vor Reaktionsbeginn 2 min bei 30 °C mit dem gesamten Ansatz inkubiert. Alle Messungen wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung lag in allen Fällen unter 5 %. Zur Berechnung der spezifischen E1-Aktivität des Thiamin-abhängigen OdhA-Proteins wurde der Extinktionskoeffizient von $21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für reduziertes DCPIP bei 600 nm (Phillips, 1999) verwendet. Die spezifische Enzymaktivität ist als Menge an reduziertem DCPIP [μmol] pro Minuten [min] und pro Enzymmenge [mg oder mol] angegeben.

2.7.12 Analyse von Proteininteraktionen mittels Oberflächenplasmonresonanz

Mit dem Biacore T100™ (GE Healthcare GmbH, Freiburg) können Interaktionen zwischen Proteinen in Echtzeit gemessen werden. Das Prinzip beruht darauf, einen der beiden Interaktionspartner (Ligand) zunächst kovalent an einen Sensorchip zu immobilisieren und einen zweiten Interaktionspartner (Analyt) über die Sensorchipoberfläche zu leiten. Alle Puffer bzw. Proben werden mithilfe eines mikrofluiden Flusssystems und einer konstanten

Durchflussrate über die Sensorchipoberfläche geleitet und biomolekulare Interaktionen mithilfe von Oberflächenplasmonresonanz (SPR) gemessen. Die Oberflächenplasmonresonanz beinhaltet, dass eine Bindung von Molekülen an die Sensorchipoberfläche eine Änderung des Brechungsindex zur Folge hat. Durch diese Änderung des Brechungsindex wird wiederum die Reflexionsintensität des polarisierten Lichts, mit dem die Chipoberfläche bestrahlt wird, verändert. Diese Veränderung wird schließlich vom Gerät detektiert und in Resonanzeinheiten (RU) gemessen. Sie ist für die meisten Biomoleküle proportional zur eigenen Masse. Der Sensorchip besteht aus einem mit Gold beschichteten Glasprisma, welches mit einer carboxymethylierten Dextranmatrix überzogen ist. Für Protein-Protein-Interaktionsanalysen mit dem Biacore T100™ wurden zunächst $_{10xHis}$ Odhl und OdhA Δ 89_{Strep}-Derivate heterolog überproduziert, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und in HBS-EP⁺ (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,5 % (w/v) Tween-20, pH 7,4 eingestellt mit NaOH) mittels Dialyse umgepuffert. $_{10xHis}$ Odhl wurde als Ligand kovalent an die Oberfläche einer Messzelle des Sensorchips (Sensor Chip CM5, GE Healthcare GmbH, Freiburg) mit Natriumacetat-Puffer pH 4,0 (GE Healthcare GmbH, Freiburg) bei 30 °C nach Angaben des Herstellers immobilisiert. Im Anschluss wurden die OdhA Δ 89_{Strep}-Derivate in einer konstanten Flussgeschwindigkeit als Analyt in Konzentrationen von 2-1000 nM über den kovalent gebundenen Liganden geleitet und die Zunahme der Resonanzeinheiten bei 30 °C über die Zeit verfolgt. Um eine unspezifische Interaktion mit der Chipoberfläche der Messzelle ausschließen zu können, wurde der Analyt ebenfalls über eine Referenzzelle geleitet, die ebenso wie die Messzelle behandelt wurde, jedoch ohne Ligand. Durch einen Regenerationsschritt konnte der verbliebene Analyt entfernt werden. Der Ligand blieb jedoch unverändert auf der Chip-Oberfläche gebunden und konnte für weitere Interaktionsanalysen genutzt werden. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Biacore T100 Control Software V1.1.1 (GE Healthcare GmbH, Freiburg).

2.7.13 Chemisches *cross-linking*

Mit der Methode des chemischen *cross-linking* werden kovalente Bindungen zwischen reaktiven Gruppen geschaffen die zum Zeitpunkt des *cross-linking* in räumlicher Nähe liegen. Die Verknüpfungen können zwischen zwei oder mehr interagierenden Molekülen (intermolekular) oder in einem Molekül (intramolekular) entstehen. Um chemische *cross-links* zwischen Odhl und OdhA zu erhalten müssen die funktionellen Gruppen der beiden Proteine in räumlicher Nähe zueinander liegen und zugänglich sein für die *Linker*-Substanz. Die eingesetzten chemischen *Linker*-Substanzen bestehen aus zwei reaktiven Gruppen die durch eine Kohlenstoffkette in definierter Länge verbunden sind. Dieser Abstand bestimmt die maximale Distanz zwischen den funktionellen Gruppen in den Proteinen, welche verknüpft werden können. Der hier verwendete chemische *Linker*

Disuccinimidylsuberat (DSS) gehört zu der Gruppe der homobifunktionellen Linker mit zwei identischen reaktiven Gruppen an beiden Seiten des Moleküls (Hermanson, 1996). Durch den Austausch von Wasserstoff- gegen Deuteriumatome in dem Abstandhalter zwischen den reaktiven Gruppen, ist der *Linker* isotopenmarkiert. Der Einsatz von isotopenmarkierten und nicht markierten Substanzen ermöglicht im Anschluss an einen enzymatischen Verdau der Probe die Analyse der verbundenen Peptide mittels Massenspektrometrie (Sinz, 2006a; Sinz *et al.*, 2006b).

Für die *cross-linking* Experimente wurden alle Proteine heterolog überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Hälfte aller Proteine wurde für chemische Verknüpfungen von Lysinresten mit Disuccinimidylsuberat in 20 mM HEPES pH 8,2 mittels PD-10 Säule umgepuffert. Die zweite Hälfte wurde für Verknüpfungen von Glutamat und Aspartat mit einem carboxyl-reaktiven Reagens (Leitner, Manuskript in Vorbereitung) in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na₂PO₄, 1,76 mM KH₂PO₄, pH 7,4) umgepuffert. Die gereinigten Proteine wurden konzentriert und eine Lösung mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml hergestellt, in der die interagierenden Proteine in äquimolarer Menge vorlagen. Die Durchführung der *cross-linking* Experimente erfolgte durch Herrn Dr. A. Leitner an der ETH Zürich (Institut für Molekulare Systembiologie). Dazu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis verschickt.

2.8 Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

2.8.1 Proteinkristallisation

Bei der Kristallisation scheidet sich nach initialer Keimbildung Protein aus einer übersättigten Lösung so lange aus, bis das thermodynamische Löslichkeitsprodukt erreicht ist. Die Schwierigkeit besteht bei Proteinen allerdings darin, diesen Abscheidungsprozess so zu kontrollieren, dass das Protein nicht als Präzipitat ausfällt, sondern seinen physikalischen und chemischen Eigenschaften entsprechend geordnete, periodische Strukturen ausbildet, also kristallisiert. Die Parameter über die die Kristallisation von Proteinen beeinflusst werden kann sind u.a. die Konzentration des Proteins, der umgebende Puffer und der pH-Wert.

Für die Proteinkristallisation wurde das gereinigte Odhl in Amicon Ultra-10 Konzentratoren (Millipore GmbH, Schwalbach) auf eine Proteinkonzentration von 6-19 mg/ml eingestellt. Der gereinigte Interaktionskomplex aus Odhl und OdhA wurde in Amicon Ultra-30 Konzentratoren auf eine Konzentration von etwa 4 mg/ml eingeengt. Kristallisations-Screens zur Identifizierung der unvorhersagbaren Bedingungen, unter denen die Proteine geordnet präzipitieren und Proteinkristalle bilden, wurden nach dem Evaporationsprinzip

(*vapor diffusion*) durchgeführt (McPherson, 1985a, 1985b). Dies geschah in 96-*well* Mikrotiter-Platten mit der *sitting drop*-Methode, bei der ein Tropfen Proteinelösung über einer Reservoirlösung sitzt (McPherson, 1999). Für das *screening* mit OdhI wurden acht vorgefertigte Sets an Kristallisationsbedingungen eingesetzt, die jeweils aus 96 verschiedenen, steril filtrierten Reagenzien bestehen: EasyXtal AmSO₄ Suite, EasyXtal ComPAS Suite, EasyXtal MPD Suite, EasyXtal PACT Suite, EasyXtal PEGs Suite, EasyXtal pHClear II Suite (alle Qiagen, Hilden), Wizard I + II (beide Emerald Biosystems Inc., Bainbridge Island, USA) und Low Ionic (Sigma-Aldrich Chemie, Seelze). Diese Reagenzien setzen sich jeweils aus Puffern mit definiertem pH-Wert, Salzen oder Additiven und Präzipitaten, wie z. B. Polyethylenglycol (PEG), zusammen. Die 96-*well* Platten (Qiagen, Hilden) wurden für das *screening* nach geeigneten Kristallisationsbedingungen mit Hilfe eines Freedom EVO[®]-Roboters (Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) angesetzt. Dazu wurden zunächst 700 µl der Kristallisationsreagenzien in das Reservoir pipettiert. Pro Reaktionsraum wurde dann 500 nl der Proteinelösung auf einem Sockel über dem Reservoir positioniert. Dieser Tropfen wurde dann mit dem gleichen Volumen der jeweiligen Reservoirlösung gemischt, um die Präzipitation der Proteine zu induzieren. Nach Versiegelung der Ansätze durch eine Polypropylen-Folie, die über die 96-*well* Platten geklebt wurde, konnten die Tropfen mit dem Reservoir bei 18 °C äquilibrieren. Da im jeweiligen Reservoir die gleichen Salze, Puffer und Präzipitate in doppelter Konzentration vorliegen wie im Proteintropfen, kommt es bis zu einem Äquilibrium zu einem Wassertransfer vom Proteintropfen zum Reservoir über Evaporation. Dadurch erhöht sich im Tropfen die Protein- und Präzipitatkonzentration, was bei geeigneter Reagenzien-Zusammensetzung die Kristallbildung begünstigen kann. Die 96-*well* Platten wurden direkt nach dem Ansatz und danach einmal pro Woche mit einem Mikroskop auf die Bildung von Kristallen hin überprüft. Konnten Kristalle mikroskopisch identifiziert werden, wurden die entsprechenden Kristallisationsbedingungen optimiert. Dazu wurden alle Parameter wie z. B. die pH-Werte, der Puffer, der Salztyp, die Salzkonzentration, das Fällungsmittel, die Fällungsmittelkonzentration oder die Proteinkonzentration systematisch verändert. Für den Interaktionskomplex aus OdhI und OdhA konnte die Kristallisation durch Zugabe von 1 mM Thiamidiphosphat (ThDP) zur Proteinelösung deutlich optimiert werden. Die Kristallisation von OdhI wurde durch Mikroseeding verbessert.

2.8.1.1 Mikroseeding

Das Mikroseeding bezeichnet die Übertragung mikroskopisch kleiner Kristallkeime in einen neuen äquilibrierten Tropfen. Dabei wird ein Proteinkristall oder kristalliner Niederschlag fein zermörsert und in der entsprechenden Reservoirlösung mit der Lösung, in der sich der zermörserte Kristall befand, stark verdünnt. Die Kristalllösung wird zentrifugiert (5 min, 16000 g) und der anschließende Überstand als *seeding*-Lösung eingesetzt. Dabei kommt

es darauf an, dass viele Keime übertragen werden. Eine solche *seeding*-Lösung wurde dem Protein vor der Präparation ausgewählter neuer Kristallisationsansätze zugesetzt.

2.8.2 Sammlung von Röntgenbeugungsmustern und Datenverarbeitung

Röntgenbeugungsmuster wurden an der Beamline ID14-1 an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) mit einem ADSC Q210 CCD-Detektor bei einer Wellenlänge von 0,9769 oder 0,9334 Å und 100 K gesammelt. Für die Datensammlung wurden die Kristalle manuell mit kleinen Schlaufen (*cryo loop*) einzeln aus den Kristallisationsansätzen entnommen. Um zu verhindern, dass sich während des Einfrierens in flüssigem Stickstoff Eiskristalle bilden, wurden Proteinkristalle mit PFE (Perfluoropolyether) als Gefrierschutzmittel (*cryo protectant*) getränkt. Während der Datensammlung wurde der Kristall um 0,3-1 ° pro aufgenommenem Röntgenbeugungsbild gedreht um letztendlich aus diesen zweidimensionalen Bildern eine dreidimensionale Struktur des Proteins berechnen zu können. Die Beugungsdaten wurden zunächst mit dem Programm MOSFLM des CCP4-Programmpaketes ausgewertet. Für eine Verfeinerung des Strukturmodells von Odhl wurden die Programme Phenix und Coot verwendet. Diese Arbeiten wurden vollständig von Dr. Jörg Labahn (ICS-6, Forschungszentrum Jülich) durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von AceF auf die spezifische Aktivität der Pyruvat- und Oxoglutarat-Dehydrogenase

Das Gen *odhA* kodiert für das E1-Enzym der Oxoglutarat-Dehydrogenase (ODH) und besitzt die für E1-Untereinheiten typische Dehydrogenase-/Decarboxylase-Domäne, aber zusätzlich auch eine Acyltransferase-Domäne (Usuda *et al.*, 1996). Acyltransferasen weisen normalerweise Lipoylreste auf. Das einzige lipoylierte Protein in *C. glutamicum* ist aber AceF, von dem gezeigt werden konnte, dass es bei *E. coli* und *Mycobacterium tuberculosis* für Acyltransferaseaktivität der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) benötigt wird (Allen *et al.*, 1989; Tian *et al.*, 2005a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Acyltransferase-Domäne von OdhA tatsächlich Transferaseaktivität besitzt, aber dafür die Lipoylreste von AceF nutzt (Hoffelder *et al.*, 2010). Auf Grund dieser Informationen ergab sich die Frage, ob alle drei Lipoylreste gleichermaßen an der E2-Reaktion der ODH- und PDH-Aktivität beteiligt sind. Dafür wurden zwei spezifische chromosomale Mutanten konstruiert. In diesen sind jeweils zwei der drei Lysinreste, an denen Lipoylreste gebunden sind, gegen Glutaminreste ausgetauscht worden. Daraus ergaben sich die Stämme *C. glutamicum* WT-*aceF*-K43Q-K162Q und *C. glutamicum* WT-*aceF*-K162Q-K278Q die jeweils nur noch den dritten bzw. ersten lipoylierbaren Lysinrest enthielten. Die detaillierten ODH- und PDH-Kinetiken wurden wie in 2.7.10 beschrieben mit Rohextrakten und ausgewählten Substrat-Konzentrationen ermittelt. Als Kontrolle wurde *C. glutamicum* WT verwendet.

Tabelle 3.1: Kinetische Parameter für die Oxoglutarat- und Pyruvat-Dehydrogenase in *C. glutamicum* WT, WT-*aceF*-K43Q-K162Q und WT-*aceF*-K162Q-K278Q.

Stamm	ODH			PDH		
	K_m (mM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Effizienz V_{max}/K_m (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)	K_m (mM)	V_{max} (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹)	Effizienz V_{max}/K_m (μl min ⁻¹ mg ⁻¹)
WT	0.128	134.2	1048.4	1.689	147.7	87.3
WT- <i>aceF</i> -K43Q-K162Q	0.165	176.1	1067.3	2.118	208.2	98.3
WT- <i>aceF</i> -K162Q-K278Q	0.321	78.42	244.3	2.242	153.5	68.5

Die kinetischen Daten zeigen, dass die katalytische Aktivität sowohl für die ODH als auch für die PDH in *C. glutamicum* WT-*aceF*-K43Q-K162Q durch das Fehlen von Lipoyldomäne 1 oder 2 nicht beeinflusst wird. Daraus kann geschlossen werden, dass der Lipoylrest an Lysin 278 für die Katalyse der E2-Reaktion von ODH und PDH *in vivo* ausreichend ist, zumal die Mutanten bezüglich des Wachstums auch keinen Phänotyp zeigten (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu ist in *C. glutamicum* WT-*aceF*-K162Q-K278Q, in der nur noch der erste lipoylierbare Lysinrest vorliegt, die katalytische Effizienz für die Umsetzung von Oxoglutarat deutlich reduziert und die Effizienz für Pyruvat ist ebenfalls beeinflusst. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Lipoyldomäne 1 von AceF für die katalytischen Domänen des ODH-Komplexes eine etwas schlechtere Zugänglichkeit hat als für die des PDH-Komplexes. Darüber hinaus bestätigen die veränderten Aktivitäten von ODH und PDH erneut die enge Interaktion der ODH- und PDH-Polypeptide.

3.2 Untersuchungen zum OdhA-Polypeptid

3.2.1 Der native Translationsstart von OdhA

Zu Beginn dieser Arbeit gab es zwei Annotationen für das OdhA-Protein (NCgl1084) aus *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003). Eine Annotation liefert ein Protein mit 1257 (OdhA-1257) und die andere ein Protein mit 1221 Aminosäuren (Abbildung 3.1). In vorangegangenen Untersuchungen zu OdhA (Krawczyk *et al.*, 2010) wurde bislang das längere OdhA-1257 eingesetzt.

```

OdhA-1221      -----MSSASTFGQNAWLVDLMFQQFQKD 24
OdhA-1257      MLQLGLRHNPPTTNVTVDKTKLNKPSRSKEKRRVPAVSSASTFGQNAWLVDLMFQQFQKD 60
                  : *****

OdhA-1221      PKSVDEKWELEFAQGGPNTTPATTEAQPSPAPKESAKPAPKAAPAAPRVETKPADKT 84
OdhA-1257      PKSVDEKWELEFAQGGPNTTPATTEAQPSPAPKESAKPAPKAAPAAPRVETKPADKT 120
                  *****

```

Abbildung 3.1: Annotierte aminoterminalen Enden von OdhA (NCgl1084) aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032.

Um das aminoterminal Ende von OdhA bestimmen zu können, wurde eine PCR mit chromosomaler DNA als Matrize durchgeführt. Hierbei wurde die Region etwa 600 bp *upstream* vom *odhA*-Start und den ersten 300 bp von *odhA* amplifiziert, wobei das vom Start abwärts gelegene Oligonukleotid zusätzlich 6 His-Kodons enthielt. Das Amplifikat wurde in den *E. coli*-*C. glutamicum* Shuttle-Vektor pEKEx2 kloniert. Mit dem erhaltenen Vektor pEKEx2-*odhA*'-H6 wurde *C. glutamicum* transformiert und die Überproduktion des

N-terminalen OdhA-Fragments mit 0,1 mM IPTG über einen Zeitraum von 4 h bei 30 °C induziert. Die Zellen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen und das OdhA-Fragment aus dem Rohextrakt (RE) durch Ni^{2+} -NTA Affinitätschromatographie gereinigt. In einem SDS-Gel wurde das OdhA-Peptid separiert, identifiziert und wie in 2.7.6 beschrieben auf eine PVDF-Membran übertragen. Aus dieser Membran konnte schließlich das OdhA-Peptid ausgeschnitten werden.

Die N-terminale Sequenzierung durch die Proteome Factory (Berlin) lieferte die Aminosäuresequenz „SSASTFG“ als aminoterminal Startsequenz für OdhA. Daraus ergibt sich, dass die Annotation beginnend mit „MSSASTFG“ die korrekte ist und nach Prozessierung durch Abspaltung des Formylmethionins OdhA als 1220 Aminosäure langes Protein vorliegt. Trotzdem wurde Methionin immer als Met-1 gezählt und die Volllänge von OdhA entsprechend mit 1221 AS angegeben. Diese Sequenzinformationen für OdhA bilden die Grundlage für die Nomenklatur aller OdhA-Derivate, die im Folgenden in dieser Arbeit verwendet wurden.

3.2.2 Charakterisierung von aminoterminal verkürzten OdhA-Peptiden

Das 135 kDa große OdhA-Protein katalysiert die Decarboxylierungs-Reaktion einer dreistufigen Umsetzung von Oxoglutarat zu Succinyl-CoA. Durch Interaktion von OdhA mit unphosphoryliertem Odhl wird diese Decarboxylierung allerdings blockiert und die ODH-Aktivität ist stark reduziert (Niebisch *et al.*, 2006). In vorangegangenen *in vivo* Interaktionsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass die C-terminale E1-Domäne von OdhA für die Interaktion mit Odhl notwendig ist und dass die N-terminale E1- und die E2-Domäne keinen Einfluss auf diese Interaktion haben (Krawczyk *et al.*, 2010). Für *in vitro* Interaktionsstudien konnte bislang lediglich ein OdhA-Peptid ohne die N-terminale E1-Domäne (OdhA Δ 2-124⁴) überproduziert und gereinigt werden. Um den Bereich von OdhA, der für die Interaktion mit Odhl essentiell ist, weiter eingrenzen zu können wurden weitere N-terminal verkürzte OdhA-Derivate überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Bei der Bezeichnung der OdhA-Derivate wurden die fehlenden Aminosäuren (AS), bezogen auf die Sequenzinformationen aus 3.2.1, am aminoterminalen Ende angegeben. Dabei wurde jedoch das Formylmethionin als erste AS festgelegt, obwohl es im reifen Protein nachweislich nicht vorhanden ist. So gibt beispielsweise OdhA Δ 354^{Strep} an, dass die ersten 354 AS von OdhA in diesem Peptid fehlen und das Derivat mit einem C-terminalen StrepTag-II versehen ist. Zur *in vitro* Charakterisierung dieser OdhA-Peptide wurde zum einen deren E1-Dehydrogenase-

⁴ Mit Bezug auf natives OdhA (1221 AS) in dieser Arbeit als OdhA Δ 89 bezeichnet, entgegen der Nomenklatur in Krawczyk *et al.* (2010).

/-Decarboxylase-Aktivität bestimmt und zum anderen die Inhibierung dieser Aktivität durch die Interaktion mit Odhl. In der folgenden Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse dieser Charakterisierung zusammengefasst. Die Messungen wurden mit heterolog überproduzierten und gereinigten Proteinen nach den Angaben in 2.7.11 durchgeführt. Eingesetzt wurde jeweils 1 nmol OdhA-Derivat und 10 nmol _{10xHis} Odhl.

Tabelle 3.2: Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität von OdhA-Derivaten in Ab- und Anwesenheit von Odhl.

OdhA-Derivat	E1-Aktivität ohne Odhl [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{nmol}^{-1}$]	E1-Aktivität mit 10 nmol Odhl [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{nmol}^{-1}$]
OdhA-1221 _{Strep}	0,017	0,002
OdhAΔ89 _{Strep}	0,02	0,002
OdhAΔ354 _{Strep}	0,025	0,008
OdhAΔ395 _{6xHis}	0,000	0,000

Wie erwartet zeigten sowohl das Volllängen-Protein als auch das OdhA-Peptid ohne die N-terminale E1-Domäne Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität, die sich nach einer Zugabe von 10 nmol Odhl deutlich verringert zeigte. Dies bestätigt die Interaktion zwischen den OdhA-Derivaten und Odhl, durch welche die Umsetzung von Oxoglutarat zu Succinat gehemmt wurde. Für das nächst-kürzere Peptid OdhA Δ 354_{Strep} konnte ebenfalls Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität gemessen werden. Sie lag geringfügig über der Aktivität des Volllängen OdhA-Proteins. Auch die Aktivität dieses Proteins wird deutlich durch Odhl gehemmt, sodass die ersten 354 Aminosäuren von OdhA nicht wesentlich an der Interaktion mit Odhl beteiligt sind. Das am stärksten aminoterminal verkürzte Peptid OdhA Δ 395 war katalytisch inaktiv. Trotz der fehlenden E1-Aktivität konnte allerdings immer noch eine Interaktion mit Odhl in einer Ko-Reinigung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die aminoterminalen 395 Aminosäuren irrelevant sind für die Interaktion mit Odhl. Es besteht jedoch ebenfalls die Möglichkeit, dass die starke aminoterminal Verkürzung zu strukturellen Veränderungen führt, die zwar den Verlust der E1-Aktivität bewirken, allerdings noch immer die Interaktion mit Odhl zulassen. Es ist somit denkbar, dass diese Fehlfaltung zum Beispiel die Zugänglichkeit des Substrats zum aktiven Zentrum oder das aktive Zentrum selbst beeinträchtigen oder die Bindung oder Zugänglichkeit der Kofaktoren, wie z. B. Thiamindiphosphat, einschränkt.

3.3 Interaktion von Odhl-Muteinen mit OdhA

Das regulatorische Protein Odhl bindet in seiner unphosphorylierten Form an OdhA, die E1-Untereinheit der Oxoglutarat-Dehydrogenase, und hemmt dadurch die gesamte ODH-Aktivität. Eine reversible Phosphorylierung von Odhl an Threonin 14 oder 15 führt zu strukturellen Veränderungen im Protein, wodurch sich die 40 Aminosäuren des flexiblen N-Terminus an die FHA-Domäne anlagern (Barthe *et al.*, 2009). In diesem *off*-Zustand ist Odhl nicht mehr in der Lage mit OdhA zu interagieren.

3.3.1 Einfluss spezifischer Odhl-Peptide auf die ODH-Aktivität

Um die Bereiche in Odhl einzugrenzen, die für die Interaktion mit OdhA relevant sind, wurde der Einfluss ausgewählter Odhl-Längenderivate auf die spezifische ODH-Aktivität *in vitro* bestimmt. Die entsprechenden Plasmide zur Überproduktion der in Tabelle 3.3 aufgeführten Odhl-Peptide wurden von Sabine Krawczyk (IBG-1, FZ Jülich) zur Verfügung gestellt. Aus vorangegangenen Untersuchungen ist bekannt, dass *E. coli* keine Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen besitzt, die in der Lage sind Odhl zu phosphorylieren (Schultz *et al.*, 2007). Dementsprechend wurden alle Odhl-Derivate, die in unphosphorylierter Form eingesetzt werden sollten, in *E. coli* überproduziert. Das phosphorylierte Odhl (pOdhl) wurde in *C. glutamicum* Δppp überproduziert, in welchem die einzige Serin-/Threonin-spezifische Proteinphosphatase deletiert ist (Schultz *et al.*, 2007). Alle Odhl-Derivate wurden mittels Affinitätschromatographie gereinigt, in TES-Reaktionspuffer (2.7.10) umgepuffert und die Konzentration mittels BCA-Test bestimmt. Um die Anwesenheit von chromosomal kodiertem Odhl auszuschließen, wurde als Quelle der ODH-Komponenten und zur Messung der ODH-Aktivität Rohextrakt des Wildtyps mit deletiertem *odhl* verwendet.

Tabelle 3.3: Spezifische Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität von 0,1 mg *C. glutamicum* $\Delta odhl$ Rohextrakt in Ab- und Anwesenheit gereinigter Odhl-Längenderivate⁵.

Odhl-Derivat	Menge Odhl-Derivat	ODH-Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	ODH-Aktivität [%]
-	-	0,127	100
pOdhl	1,9 μM	0,114	90
Odhl	1,9 μM	0,005	4
Odhl-AS1-67	6,1 μM	0,121	95
Odhl-AS44-143	1,9 μM	0,001	1
Odhl-AS68-143	1,9 μM	0,120	94

⁵ Entgegen der Nomenklatur wie sie bei OdhA-Derivaten benutzt wird, werden bei diesen Odhl-Derivaten die verbleibenden Aminosäurereste angegeben.

Die über Enzymaktivitäten ermittelten Ergebnisse bestätigen die mittels Oberflächenplasmonresonanz gemessenen Daten von Sabine Krawczyk. Wie erwartet zeigte das phosphorylierte OdhI keinen Einfluss auf die spezifische ODH-Aktivität. Auch mit dem OdhI-Peptid von Aminosäure 1-67 konnte keine Reduktion der Aktivität ermittelt werden. Im Gegensatz dazu führte sowohl die Anwesenheit von unphosphoryliertem OdhI als auch von OdhI-AS43-143 zu einer vollständigen Inhibierung der Oxoglutarat-Dehydrogenase *in vitro*. Wurde die FHA-Domäne jedoch aminoterminal um weitere 24 Aminosäuren verkürzt, konnte keine Hemmung der ODH-Aktivität mehr ermittelt werden. Diese Ergebnisse bestätigen, dass unphosphoryliertes OdhI an OdhA bindet und die Phosphorylierung von OdhI diese Interaktion verhindert. Dabei kommt es offenbar nicht zu einer direkten Wechselwirkung des flexiblen aminoterminalen Endes von OdhI mit OdhA. Außerdem zeigen die Messungen, dass die gesamte FHA-Domäne von Aminosäure 44-143, im Folgenden als OdhI Δ 43 bezeichnet, für die Hemmung der Oxoglutarat-Dehydrogenase notwendig ist. In diesem Fall besteht die Vermutung, dass durch weitere aminoterminalen Verkürzungen von OdhI die korrekte Faltung der FHA-Domäne beeinflusst wird und somit keine Interaktion mit OdhA mehr möglich ist.

Um einen Einfluss von unphosphoryliertem OdhI auf den ODH-Komplex von *E. coli* ausschließen zu können, wurden ebenfalls Messungen der spezifischen ODH-Aktivität mit Rohextrakt von *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt (Daten nicht gezeigt). Diese zeigten eindeutig, dass unphosphoryliertes OdhI keinen Einfluss auf die ODH-Aktivität in *E. coli* hat.

3.3.2 Mutationen im konservierten SXXH-Motiv von OdhI

Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt beschrieben setzt sich das regulatorische Protein OdhI aus einem flexiblen aminoterminalen Ende und einer carboxyterminal gelegenen FHA-Domäne zusammen. Alle bekannten FHA-Domänen vermitteln Protein-Protein-Interaktionen, indem sie eine Wechselwirkung mit phosphorylierten Threoninresten zeigen (Durocher *et al.*, 2002). OdhI und das homologe mycobakterielle GarA-Protein stellen jedoch einen zuvor noch nicht beschriebenen Sonderfall dar, da bei beiden eine intramolekulare Interaktion der Domänen erfolgt (Barthe *et al.*, 2009; England *et al.*, 2009). Aus zahlreichen Untersuchungen ist bekannt, dass innerhalb der Homologie-Region von FHA-Domänen ein hoch-konserviertes SXXH-Motiv vorliegt, in dem X eine beliebige Aminosäure ist. Dabei bindet der Serinrest des Motivs unmittelbar an den phosphorylierten Threoninrest im Phosphopeptid, wohingegen der Histidinrest eine stabilisierende Funktion der Phosphopeptid-Bindestelle einnimmt (Durocher *et al.*, 2000a). Durch strukturelle Untersuchungen konnte für die FHA1-Domäne der Proteinkinase Rad53 aus

Saccharomyces cerevisiae belegt werden, dass die Mutagenese dieses Histidinrestes die Interaktion mit Phosphopeptiden vollständig hemmt (Durocher *et al.*, 1999). Darüber hinaus kann der mutierte Histidinrest aber auch zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur von FHA-Domänen führen, wie es unter anderem für Rad53 der Fall ist (Durocher *et al.*, 2002). Für GarA, das OdhI-Homolog aus *M. tuberculosis* wurde gezeigt, dass ein Austausch des oben beschriebenen Serinrestes die Interaktion mit KGD, dem OdhA-Homolog, verhindert (O'Hare *et al.*, 2008). Diese Erkenntnis wurde jedoch bereits 2009 durch Arbeiten von Nott *et al.* widerlegt, die eine unveränderte Interaktion zwischen KGD und mutiertem GarA-S95A belegen konnten. Basierend auf diesen Informationen wurde der Einfluss des SXXH-Motivs von OdhI auf die ODH-Aktivität *in vitro* überprüft. Dazu wurden die entsprechenden Muteine OdhI-S86A und OdhI-H89A heterolog mit einem aminoterminalen 10xHis-Tag überproduziert, durch Affinitätschromatographie gereinigt und der His-Tag mittels TEV-Protease abgespalten. Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben wurden die Messungen der ODH-Aktivität mit Rohextrakt der *C. glutamicum* *odhI*-Deletionsmutante in Ab- und Anwesenheit der OdhI-Muteine durchgeführt.

Tabelle 3.4: Spezifische Oxoglutarat-Dehydrogenase Aktivität von 0,1 mg *C. glutamicum* $\Delta odhI$ Rohextrakt in Ab- und Anwesenheit gereinigter OdhI-Muteine.

OdhI-Mutein	Menge OdhI-Mutein	ODH-Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$]	ODH-Aktivität [%]
-	-	0,062	100
OdhI-S86A	1,3 μM	0,002	3
OdhI-H89A	23,8 μM	0,057	92

Die Ergebnisse in Tabelle 3.4 zeigen, dass die Anwesenheit von OdhI-S86A nach wie vor zu einer vollständigen Inhibierung der spezifischen ODH-Aktivität führte. Das Mutein OdhI-H89A beeinflusste die ODH-Aktivität dagegen kaum. Mit diesen Ergebnissen konnte die bereits in der Literatur beschriebene Bedeutung des Histidinrestes auch für die Interaktion zwischen OdhI und OdhA bestätigt werden. Die Feststellung, dass der Serinrest des SXXH-Motivs in OdhI nicht für die Interaktion mit OdhA notwendig ist, deckt sich mit den Ergebnissen aus Ko-Reinigungsexperimenten von Nott *et al.* (2009), die nach wie vor eine Interaktion zwischen GarA-S95A und KGD zeigen konnten. Die Ko-Reinigungsexperimente von O'Hare *et al.* (2008) stehen aber im Gegensatz dazu. Da nicht angenommen wird, dass die Interaktion zwischen OdhI und OdhA wesentlich von der Interaktion zwischen GarA und KGD abweicht, spielt möglicherweise die experimentelle Vorgehensweise bei der Charakterisierung dieses Serinrestes eine entscheidende Rolle.

3.3.3 *Cross-linking* von Odhl und OdhA

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Alexander Leitner vom Institut für Molekulare System Biologie an der ETH in Zürich wurde versucht interagierende Reste zwischen Odhl und OdhA mittels *cross-linking* zu identifizieren (Rinner *et al.*, 2008). Bei diesem Verfahren werden bevorzugt die primären Amine von Lysinresten (Leitner *et al.*, 2010) oder auch die Carboxylreste von Glutamat und Aspartat durch einen isotoopenmarkierten chemischen *Linker* verknüpft (Abbildung 3.2). Dies geschieht jedoch nur, wenn sich diese Reste zum Zeitpunkt des Verknüpfens in räumlicher Nähe zueinander befinden.

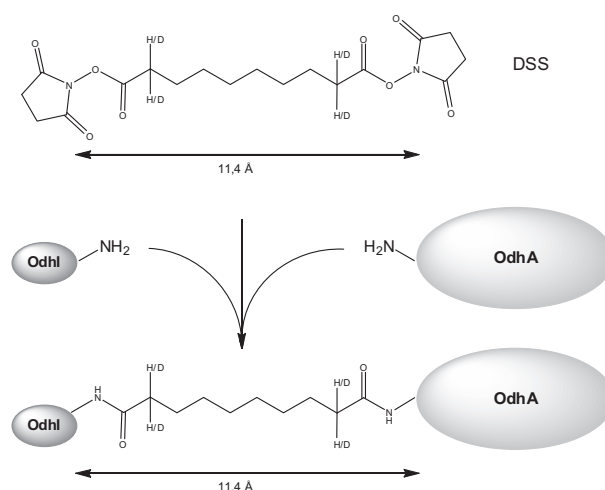


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der *cross-linking* Reaktion von Odhl und OdhA mit isotoopenmarkiertem Disuccinimidylsuberat (DSS).

Im Anschluss an das *cross-linking* wird der gesamte Reaktionsansatz enzymatisch verdaut und Peptide mit chemischen *cross-links* von Peptiden ohne diese Verknüpfungen getrennt. Die ermittelten Peptidmassen können schließlich auf Grund einer charakteristischen Verschiebung der Massen durch den isotoopenmarkierten chemischen *Linker* auf isotopische Paare hin untersucht werden.

In einem ersten *cross-linking* Experiment konnten fünf Verknüpfungen zwischen unphosphoryliertem $_{6xHis}$ Odhl und OdhA-1257 $_{Strep}$ mit *Acidic XL* (Leitner, Manuskript in Vorbereitung) als *Linker*-Substanz ermittelt werden (Tabelle 3.5). Die an Verknüpfungen mit Odhl beteiligten Aspartat- bzw. Glutamatreste von OdhA waren alle in der C-terminalen E1-Domäne lokalisiert. In Odhl lagen zwei entsprechende Reste in der FHA-Domäne vor. Ein weiterer *cross-link* bestand zwischen dem flexiblen N-Terminus des unphosphorylierten Odhl-Proteins und einem negativ geladenen Rest in OdhA. Zusätzlich

zum *cross-linking* mit *Acidic XL* wurde ein *cross-linking* mit Disuccinimidylsuberat (DSS) zur Verknüpfung von Lysinresten durchgeführt. DSS wird häufig zur chemischen Verknüpfung von Proteinen eingesetzt, da Lysinreste mit etwa 6 % relativ häufig in Proteinen vorkommen und die primären Amine von Lysinseitenketten sehr reaktiv sind und sich das DSS daher chemisch besser als *Acidic XL* zur Verknüpfung eignet (Leitner *et al.*, 2010). Allerdings weist OdhI lediglich drei Lysinreste auf. Um trotzdem *cross-links* zu ermöglichen und da gezeigt wurde, dass die FHA-Domäne allein zur Interaktion mit OdhA benötigt wird, wurden im Folgenden Lysinreste in das OdhI Δ 43-Peptid eingeführt.

Tabelle 3.5: Chemische *cross-links* zwischen OdhA- und OdhI-Peptiden. Die Aminosäuren, die durch *Acidic XL* verknüpft wurden, sind fett dargestellt und die entsprechenden Positionen dieser verknüpften Aminosäuren mit Bezug auf natives OdhA (1221 AS) bzw. OdhI angegeben. Zum Teil sind zwei Reste in einem Peptid hervorgehoben, da nur die Peptid-Zuordnung möglich ist, aber nicht die Lokalisation des verknüpften Restes im Peptid.

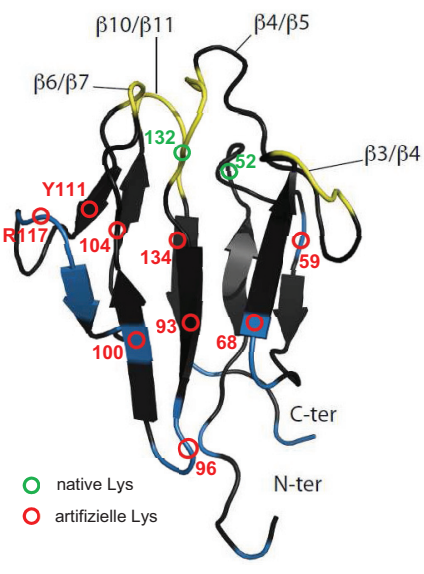
OdhA-Peptid	OdhA-1221	OdhI-Peptid	OdhI
DFHDQMESVFNEVK	E801/D798	HPESDIFLDDVTVSR	E75/D77
YHLGSEGQHLQMFGDGEIK	D596/E598	ADLLK	D21
LEAGMPKPTQAEQK	E482	ADLLK	D21
LEAGMPKPTQAEQK	E472/E482	NAQVMQTGDEIQIGK	D126/E127
DFHDQMESVFNEVK	E801/E806	HPESDIFLDDVTVSR	E75/D77

Das OdhI Δ 43-Peptid besitzt zwei native Lysinreste. Diese befinden sich an Position 52 und 132 (Tabelle 3.6, rechts), bezogen auf das native OdhI. Um die Anzahl der Lysinreste für DSS-Verknüpfungen zwischen OdhI und OdhA zu erhöhen, wurden anhand des Strukturmodells von OdhI (Barthe *et al.*, 2009) Aminosäurereste in OdhI ausgewählt, die zum einen in der FHA-Domäne nicht nach innen orientiert sind und zum anderen nicht in der FHA-Homologie-Region (Durocher *et al.*, 2002) liegen. Es wurden neun Mutationen mittels ortsgerichteter Mutagenese in $_{10xHis}$ OdhI Δ 43 eingeführt (Tabelle 3.6, links). Als Voraussetzung für physiologisch relevante Schlussfolgerungen möglicher Verknüpfungen muss die Interaktion der OdhI-Muteine mit OdhA gegeben sein. Diese Interaktion wurde erneut mit Hilfe der Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität von OdhA Δ 89_{Strep} in Ab- und Anwesenheit der heterolog überproduzierten und gereinigten OdhI-Muteine bestimmt. Wie in Tabelle 3.6 (links) angegeben, zeigten fünf der neun $_{10xHis}$ OdhI Δ 43-Muteine nach wie vor Interaktion mit OdhA Δ 89_{Strep}. Jedoch konnten mit diesen fünf $_{10xHis}$ OdhI Δ 43-Muteinen im Komplex mit OdhA Δ 89_{Strep} keine zusätzlichen *cross-links* durch Dr. Leitner in Zürich identifiziert werden.

Interessanterweise konnte für die beiden OdhI-Derivate mit einem Aminosäureaustausch an Position 111 und 117 keine Interaktion mit OdhA Δ 89_{Strep} ermittelt werden. Barthe *et al.* (2009) haben durch Strukturuntersuchungen gezeigt, dass in Folge der Phosphorylierung an Thr-15 die Aminosäuren in Position 20-29 im N-Terminus von OdhI eine kleine α -Helix

ausbilden, wodurch hydrophobe Wechselwirkungen mit Tyr-111 und Pro-116 entstehen. Dadurch besteht die Vermutung, dass diese entsprechende Region in OdhI, in der Lysinreste eingeführt wurden, maßgeblich an der Bindung des eigenen N-Terminus und gleichzeitig auch an der Interaktion mit OdhA beteiligt ist.

Tabelle 3.6: Übersicht der $_{10xHis}$ OdhI Δ 43-Mutante mit einem zusätzlichen Lysinrest. Angegeben ist ob die Muteine isoliert werden konnten und ob eine Interaktion mit OdhA Δ 89 $_{Strep}$ erfolgte (links), sowie ihre Lokalisation in der Struktur von OdhI (rechts). Die Positionen der Aminosäuren sind in Bezug auf die Volllänge von OdhI angegeben.

Austausch in $_{10xHis}$ OdhI Δ 43	Reinigung	Interaktion mit OdhA Δ 89 $_{Strep}$	
A59K	-	-	
T68K	+	+	
R93K	+	+	
E96K	+	+	
E100K	+	+	
V104K	-	-	
Y111K	+	-	
R117K	+	-	
R134K	+	+	

3.4 Isolierung und Charakterisierung von Suppressor-mutanten mit veränderter Interaktion von OdhI und OdhA

Studien von Axel Niebisch haben gezeigt, dass die Mutante *C. glutamicum* Δ *pknG* nicht auf Minimalmedium (MM) mit L-Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoff-Quelle (C- und N-Quelle) wachsen kann (Niebisch *et al.*, 2006). Der Grund dafür ist, dass durch das Fehlen der Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinase G (PknG) das Inhibitorprotein OdhI hauptsächlich in unphosphorylierter Form vorliegt (Schultz *et al.*, 2007). In dieser Form bindet es an das OdhA-Protein und blockiert damit die Verstoffwechselung von Glutamin. In ersten Ansätzen konnte jedoch nach etwa 4 Tagen Inkubation von *C. glutamicum* Δ *pknG* ein Wachstum von Suppressor-mutanten (SM) auf Minimalmedium mit L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle beobachtet werden.

3.4.1 Mutationen im *odhI*- und *odhA*- Gen

Mutationen im *odhI*- oder *odhA*-Gen könnten für den veränderten Phänotyp von *C. glutamicum* $\Delta pknG$ -Suppressormutanten auf Minimalmedium mit L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle verantwortlich sein und Erkenntnisse über die mit OdhI interagierenden Bereiche in OdhA liefern. Für Mutationsanalysen wurde der *C. glutamicum* WT und die $\Delta pknG$ -Mutante aus einer Dauerkultur zum einen auf Minimalmedium mit 100 mM L-Glutamin ausgestrichen und zum anderen, als Kontrolle, auf BHI. Die Kontrollen zeigten bereits nach etwa 30 Stunden bei 30 °C ein deutliches Wachstum. Im Gegensatz dazu war bei 30 °C auf Minimalmedium mit 100 mM L-Glutamin erst nach etwa 80 Stunden ein Wachstum zu beobachten. Hierbei hoben sich einzelne Kolonien deutlich durch einen größeren und gelberen Phänotyp vom Hintergrund der kleineren Kolonien ab (Abbildung 3.3).



Abbildung 3.3: Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta pknG$ auf Minimalmedium mit 100 mM L-Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nach 50 h bei 30 °C.

Diese Kolonien wurden auf BHI-Platten übertragen, um Einzelkolonien für Sequenzanalysen zu erhalten. Die Amplifikation von *odhI* und *odhA* erfolgte mittels PCR und chromosomaler DNA der Suppressormutanten als Matrize. In 24 Suppressormutanten wurde zunächst *odhI* mit den Oligonukleotiden *odhI*-78b-up und *odhI*-76b-dwn amplifiziert und sequenziert. Sofern im *odhI*-Gen keine Mutation identifiziert werden konnte, wurde das *odhA*-Gen mit den Oligonukleotiden *odhA*-b80-up, *odhA*-b988-rv, *odhA*-for2, *odhA*-2052-rv, *odhA*-for4 und *odhA*-52b-dwn amplifiziert und sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzanalysen von *odhI* und *odhA* aus 24 Suppressormutanten ist in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7: Übersicht der mittels Sequenzierung identifizierten Mutationen in *odhI* und *odhA* aus 24 isolierten *C. glutamicum* $\Delta pknG$ -Suppressormutanten.

$\Delta pknG$ -SM	<i>odhI</i>	<i>odhA</i>
1	Gln-65 → Stop	nicht sequenziert
2	Gln-65 → Stop	nicht sequenziert
7	keine Mutation	Cys-704 → Arg
8	keine Mutation	Cys-704 → Arg
11	keine Mutation	Cys-704 → Arg
15	Phe-92 → Ser	nicht sequenziert
16	Ser-106 → Pro	nicht sequenziert
17	Pro-10 → Ser	nicht sequenziert
18	His-89 → Asn	nicht sequenziert
24	Gln-65 → Stop	nicht sequenziert

Die Sequenzanalysen ergaben in sieben Suppressormutanten Mutationen in *odhI*. Wie für die Mutation von His-89 bereits in Abschnitt 3.3.2 gezeigt werden konnte, führten die identifizierten Mutationen offensichtlich zu regulatorisch unwirksamem Protein. In drei unabhängig in einem Experiment erhaltenen Mutanten war eine Transition der Base 2110 im *odhA*-Gen erfolgt, die zu einer *missense*-Mutation und somit zu einem Austausch von Cystein zu Arginin an Position 704 im OdhA-Protein führte. In 14 Mutanten konnten weder in *odhI* noch in *odhA* Mutationen identifiziert werden.

3.4.2 Charakterisierung der Mutation C704R im OdhA-Protein

Um zu überprüfen, ob der Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin an Position 704 im OdhA-Polypeptid einen Einfluss auf die Interaktion mit OdhI hat, wurde der Expressionsvektor pAN6-*odhA*Δ89-C704R konstruiert. Zusätzlich sollte der Einfluss von Größe und Ladung der Aminosäure an Position 704 ermittelt werden. Zu diesem Zweck wurden ebenfalls die Expressionsvektoren pAN6-*odhA*Δ89-C704E und pAN6-*odhA*Δ89-C704S konstruiert. Diese drei, mit einem C-terminalen StrepTag-II versehenen OdhAΔ89-C704-Derivate, wurden heterolog überproduziert, und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Für alle drei OdhA-Muteine sowie für OdhAΔ89-WT wurde die Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität in Ab- und Anwesenheit von OdhI ermittelt (2.7.11). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

Aus den Enzymaktivitäten in Tabelle 3.8 wird deutlich, dass das Wildtyp OdhA-Derivat wie erwartet durch 20 nmol $_{10\times\text{His}}$ OdhI nahezu vollständig gehemmt wurde. OdhAΔ89-C704R zeigte noch eine Restaktivität von etwa 50 % bei 20 nmol OdhI. Auch OdhAΔ89-C704E zeigte eine nahezu vergleichbare Restaktivität. Dagegen wurde das Mutein

OdhA Δ 89-C704S deutlich stärker bis auf eine verbleibende Aktivität von 32 % gehemmt. Diese *in vitro* Messungen belegen damit, dass in der Suppressormutante, in der diese Mutation vorliegt, diese tatsächlich den Phänotyp „Wachstum auf Glutamin“ hervorruft und dass der Aminosäurerest in Position 704 von OdhA an der Interaktion mit OdhI beteiligt ist. Ferner lassen sie vermuten, dass die Größe der Aminosäure an Position 704 in OdhA eine wichtige Rolle für die Interaktion mit OdhI spielt. Die Ladung der entsprechenden Aminosäure scheint hingegen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen.

Tabelle 3.8: Spezifische Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität von 1 nmol gereinigtem OdhA Δ 89-WT, OdhA Δ 89-C704R, OdhA Δ 89-C704S, OdhA Δ 89-C704E in Ab- und Anwesenheit von 10 und 20 nmol gereinigtem $_{10xHis}$ OdhI.

OdhA $_{Strep}$ -Derivat	$_{10xHis}$ OdhI	E1-Aktivität [$\mu\text{mol min}^{-1} \text{nmol}^{-1}$]	E1-Aktivität [%]
OdhAΔ89-WT	-	0,13	100
	10 nmol	0,03	23
	20 nmol	0,01	8
OdhAΔ89-C704R	-	0,14	100
	10 nmol	0,11	79
	20 nmol	0,08	57
OdhAΔ89-C704E	-	0,21	100
	10 nmol	0,13	65
	20 nmol	0,10	50
OdhAΔ89-C704S	-	0,19	100
	10 nmol	0,11	58
	20 nmol	0,06	32

Die enzymatisch ermittelten Interaktionsunterschiede der OdhA-Muteine mit $_{10xHis}$ OdhI konnten ebenfalls mit Hilfe der *in vitro* Oberflächenplasmonresonanz (2.7.12) bestätigt werden. Dazu wurden die OdhA Δ 89-Derivate sowie $_{10xHis}$ OdhI nach Affinitätschromatographie in HBS-EP⁺ umgepuffert. Für die Messungen wurden die isolierten OdhA Δ 89-Derivate in den folgenden Analyt-Konzentrationen eingesetzt: 2, 5, 10, 50, 100, 200, 500 und 1000 nM. Das Sensorgramm in Abbildung 3.4 zeigt eine deutlich verringerte Interaktion der drei Muteine OdhA Δ 89-C704R $_{Strep}$, OdhA Δ 89-C704E $_{Strep}$ und OdhA Δ 89-C704S $_{Strep}$ mit $_{10xHis}$ OdhI gegenüber dem Wildtyp OdhA $_{Strep}$ -Derivat. Auch in diesem Test bestätigte sich, dass OdhA Δ 89-C704S noch stärkere Affinität zu OdhI zeigt als OdhA Δ 89-C704R und OdhA Δ 89-C704E.

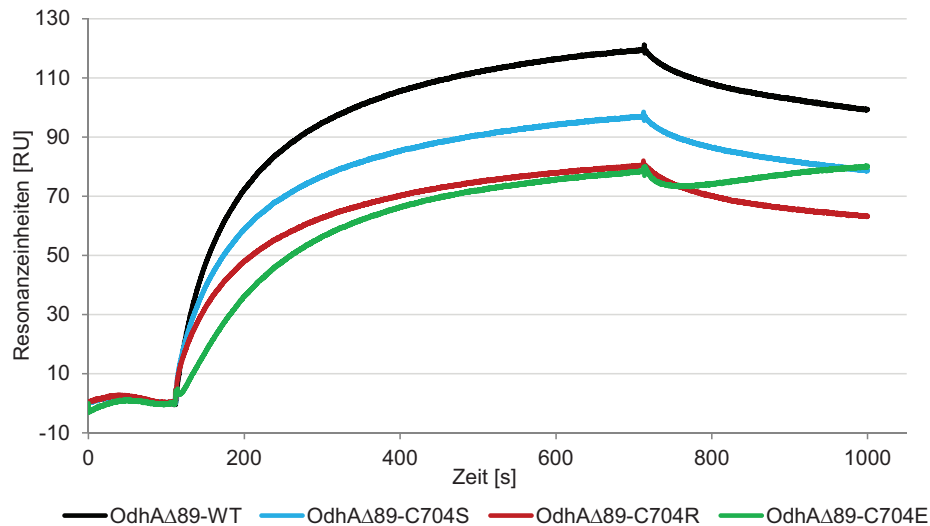


Abbildung 3.4: Sensorgramm nach Oberflächenplasmonresonanz-Messungen. Es wurden 167 RU $^{10\times\text{His}}$ OdhI auf einem CM5-Chip (GE Healthcare) mit Hilfe der *Amine-Coupling*-Methode bei pH 4,0 immobilisiert. Als Analyten wurden je 50 nM StrepTag-II markiertes OdhAΔ89-WT (schwarz), OdhAΔ89-C704S (blau), OdhAΔ89-C704R (rot) und OdhAΔ89-C704E (grün) eingesetzt und 600 s mit einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$ über die Chipoberfläche geleitet. Die Dissoziationszeit betrug 600 s und die Regeneration erfolgte für 30 s mit 30 mM NaOH und einer Flussrate von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$.

Basierend auf den Daten der *in vitro* Charakterisierung von OdhA-C704R wurde zudem überprüft ob *in vivo* ausschließlich die Mutation im OdhA-Polypeptid einen Wachstumsvorteil für *C. g. ΔpknG* auf Minimalmedium mit 100 mM L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle bewirkt. Dazu wurde die Transition der Base Thymin zu Cytosin an Position 2110 in *odhA*, die zu dem Aminosäureaustausch von Cystein zu Arginin an Position 704 im OdhA-Protein führt, chromosomal in den Deletionsstamm *C. g. ΔpknG* mit Hilfe des Integrationsvektors pK19mobsacB-*odhA*-C704R eingebaut. Der neu konstruierte Stamm *C. g. ΔpknG odhA-CR* sowie der Deletionsstamm *C. g. ΔpknG* die isolierte *C. g. ΔpknG*-Suppressormutante Nr.7 (SM7) und *C. g. WT* wurden aus einer Dauerkultur auf Minimalmedium (MM) mit 100 mM L-Glutamin ausgestrichen. Eine Inkubation dieser Stämme für etwa 50 h bei 30 °C zeigte für den Stamm *C. g. ΔpknG odhA-CR* ein vergleichbares Wachstum auf MM mit 100 mM L-Glutamin wie die ursprünglich isolierte Suppressormutante oder der WT (Abbildung 3.5). Dies bestätigt, dass allein der Austausch von Cystein zu Arginin an Position 704 im OdhA-Protein für das Wachstum des Stammes *C. g. ΔpknG odhA-CR* auf MM mit L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle verantwortlich ist.

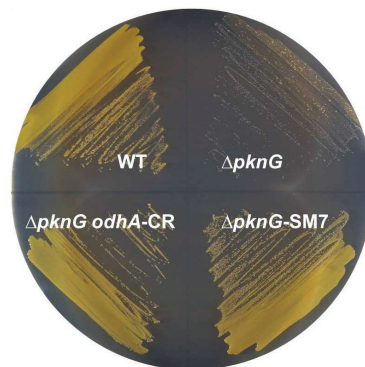


Abbildung 3.5: Wachstum verschiedener *C. glutamicum*-Stämme auf Minimalmedium mit 100 mM L-Glutamin als einziger Kohlenstoff- und Stickstoffquelle nach ca. 50 h bei 30 °C. Ausgehend von der $\Delta pknG$ -Mutante wurde die Suppressormutante *C. g. ΔpknG-SM7* isoliert. Die in dieser Mutante identifizierte Mutation im *odhA*-Gen ist ausschließlich für wiedererlangtes Wachstum verantwortlich, wie deren Nachbau im Chromosom von *C. g. ΔpknG odhA-CR* zeigt.

3.5 Untersuchungen zur Strukturaufklärung des Interaktionskomplexes aus Odhl und OdhA

Die Interaktion von unphosphoryliertem Odhl mit OdhA bewirkt eine vollständige Inhibition der ODH im Tricarbonsäure-Zyklus von *C. glutamicum* (Niebisch *et al.*, 2006). Die reversible Phosphorylierung im aminoterminalen Bereich von Odhl führt zu einer Wechselwirkung der Phosphorylierungsstelle mit der carboxyterminalen FHA-Domäne. Durch eine damit einhergehende Konformationsänderung im Odhl-Protein werden die Bereiche für die Interaktion mit OdhA blockiert (Barthe *et al.*, 2009; England *et al.*, 2009). Bisher konnten sowohl für Odhl als auch für das etwa achtfach größere OdhA die für die Interaktion relevanten Domänen bestimmt werden. Um einen detaillierten Einblick in die interagierenden Bereiche dieser beiden Proteine gewinnen zu können, wurde versucht Strukturmodelle mit Hilfe röntgenkristallographischer Untersuchungen zu erstellen.

3.5.1 Heterologe Überproduktion und Reinigung von Odhl-Muteinen für Kristallisationsexperimente

In *C. glutamicum* synthetisiertes Odhl kann *in vitro* am Threoninrest 14 (Thr-14) durch die Proteinkinase G reversibel phosphoryliert werden (Niebisch *et al.*, 2006). *E. coli* besitzt keine Serin/Threonin Proteinkinasen vom eukaryotischen Typ (Schultz *et al.*, 2007), weshalb die Annahme berechtigt ist, dass heterolog in *E. coli* überproduziertes Odhl keine Phosphorylierung an Thr-14 trägt. Da das Regulatorprotein im Wildtyp von *C. glutamicum* vorherrschend in phosphorylierter Form vorliegt besteht die Möglichkeit, dass der Phosphorylierungsstatus von Odhl eine Rolle bei der nativen Faltung des Proteins und

somit ebenfalls für die Kristallbildung spielt. Durch einen Austausch von Thr-14 in Odhl zu Aspartat wurde eine negative Ladung geschaffen, die eine Phosphorylierung von in *E. coli* gebildetem Odhl an Position 14 simulieren sollte (Leger *et al.*, 1997; Napper *et al.*, 1996). Es bestand die Annahme, dass dadurch das flexible aminoterminal Ende von Odhl an seine FHA-Domäne binden würde, wodurch das Protein möglicherweise in einer für kristallographische Zwecke geeigneteren Form vorliegen könnte.

Die Überproduktion des Muteins Odhl-T14D erfolgte in diesem Fall als Fusionsprotein mit einem durch TAGZyme spaltbaren aminoterminalen 6xHis-Tag in dem *E. coli* Stamm M15. Um die sehr hohe Transkriptionsrate des T5-Promoters auf dem pQE1-Vektor zu regulieren, ist eine große Menge des *lac*-Repressor Proteins notwendig, weshalb der Stamm zusätzlich das Repressorplasmid pREP4 trug. Zur präparativen Affinitätsreinigung des Odhl-Muteins wurde der Rohextrakt aus 6 l Expressionskultur auf eine 1 ml- Ni^{2+} -NTA Superflow Cartridge (Qiagen, Hilden) geladen und mittels FPLC (ÄKTA UPC 900 / P900, Frac-900, GE Healthcare, Freiburg) das Zielprotein durch einen Imidazol-Gradienten eluiert. Protein-enhaltende Elutionsfraktionen wurden anschließend konzentriert und in einem zweiten Reinigungsschritt mittels Größenausschluss-Chromatographie in Odhl-Puffer (20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 7,5) analysiert. Der Reinheitsgrad des Proteins wurde nach Gelfiltration in einem SDS-Gel überprüft. Für die Reinigung von His Odhl-T14D für Kristallisationsexperimente ist exemplarisch in Abbildung 3.6 und 3.7 das Chromatogramm einer Gelfiltration und die dazugehörige Analyse der Fraktionen im SDS-Gel dargestellt. Das Chromatogramm der Größenausschluss-Chromatographie zeigte zwei vorherrschende Absorptionsmaxima. Dabei entsprach das Elutionsvolumen von rund 87 ml einem errechneten Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa und das Elutionsvolumen von etwa 78,5 ml einem errechneten Molekulargewicht von ca. 60 kDa. Diese Massen entsprechen einem Dimer bzw. einem Tetramer von Odhl (Monomer His Odhl-T14D: 16,6 kDa). Sowohl die Fraktionen des ersten als auch des zweiten Peaks zeigten eine starke spezifische Bande mit einer apparenten Masse von etwa 18 kDa. Aufgrund der theoretisch berechneten molekularen Masse von 16,6 kDa für His Odhl-T14D ist davon auszugehen, dass es sich dabei um das gewünschte mutierte Regulatorprotein handelt. Zusätzlich zeigten sich Banden mit geringerer Intensität. Bei denen mit der apparenten Masse unter 18 kDa könnte es sich um degradiertes His Odhl-T14D handeln. Auf eine weitere Analyse der Peptidfragmente wurde aber verzichtet.

Folglich konnte gezeigt werden, dass natives, lösliches His Odhl-T14D in zwei Oligomerisierungszuständen vorliegt und zwar sowohl als Tetramer als auch als Dimer. Die Fraktionen 12-35 des gereinigten Odhl-Proteins wurden vereint und auf eine Konzentration von etwa 26 mg/ml eingengt. Sie lagen damit in dem verwendeten Puffer (20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 7,5) für Kristallisationsexperimente vor.

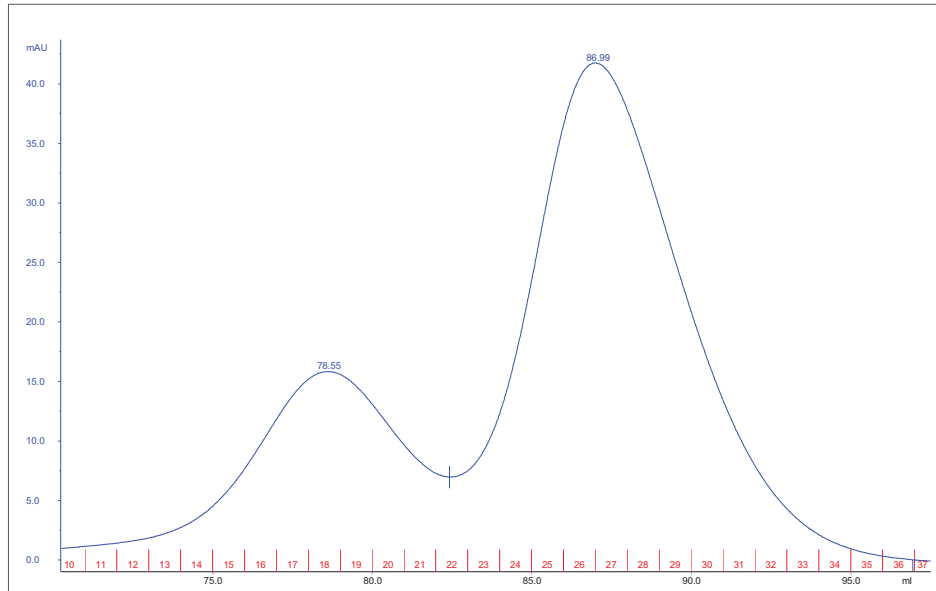


Abbildung 3.6: Größenausschluss-Chromatographie zur Reinigung und Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Odhl-T14D. Gezeigt ist das Chromatogramm einer Trennung von $_{\text{His}}$ Odhl-T14D in 20 mM MES, 150 mM NaCl, pH 7,5. Dabei zeigt die blaue Kurve die Absorption bei 280 nm in mAU und die X-Achse gibt das Elutionsvolumen in ml an. Die gesammelten Fraktionen sind in rot nummeriert angegeben.

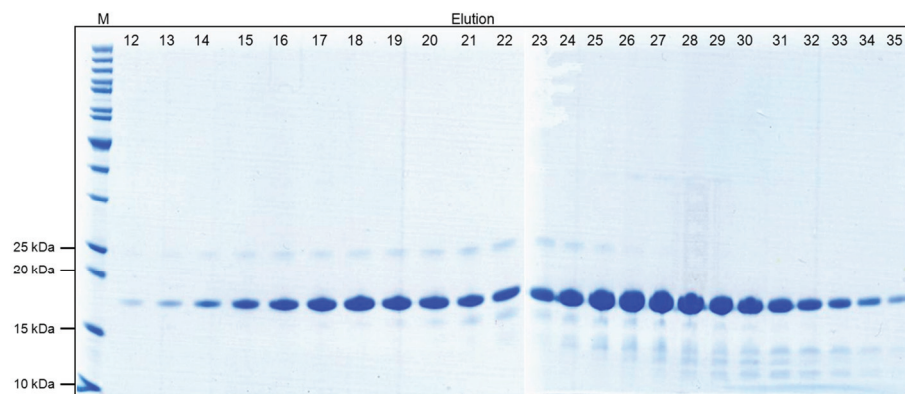


Abbildung 3.7: Reinigung von $_{\text{His}}$ Odhl-T14D aus *E. coli* M15 pREP4. Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas), Elution: Fraktionen nach Gelfiltration.

Bei der Kristallisation wird die Proteinlöslichkeit in einer hoch gesättigten Proteinlösung durch die Zugabe von Reagenzien stark herabgesetzt. Reagenzien, wie z. B. Salze oder Fällungsmittel wie Polyethylenglykol (PEG), stören die Protein-Lösungsmittel-Interaktionen und begünstigen thermodynamisch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Weitere

Konzentrierung der Proteinlösung durch langsame Evaporation führt schließlich zur Bildung von Kristallen, in denen die Proteine im Idealfall absolut regelmäßig und gleich ausgerichtet in einem dreidimensionalen Gitter angeordnet sind. Da die für die Kristallisation eines bestimmten Proteins benötigten idealen Bedingungen wie z. B. die Reagenzien-Zusammensetzung, die Temperatur oder die Proteinkonzentration nicht vorhersagbar sind, müssen diese stets empirisch gefunden werden. Hierfür wurden in einer systematischen Suche für HisOdhI-T14D etwa 900 verschiedene Kristallisationsbedingungen nach dem Evaporationsprinzip (McPherson, 1985) in 96-*well*-Platten getestet, die von einem Roboter pipettiert wurden und erste Kristallnadeln lieferten (Daten nicht gezeigt). Durch weiteres *Fein-screening* wurden für HisOdhI-T14D Bedingungen identifiziert, unter denen innerhalb von etwa acht Wochen die in Abbildung 3.8 dargestellten plattenförmigen Kristalle erhalten werden konnten. Weder anschließende Variationen der Fällungsmittel- und Proteinkonzentration, noch das *seeding* (2.8.1.1) führten in weiteren Optimierungen zu größeren Kristallen.

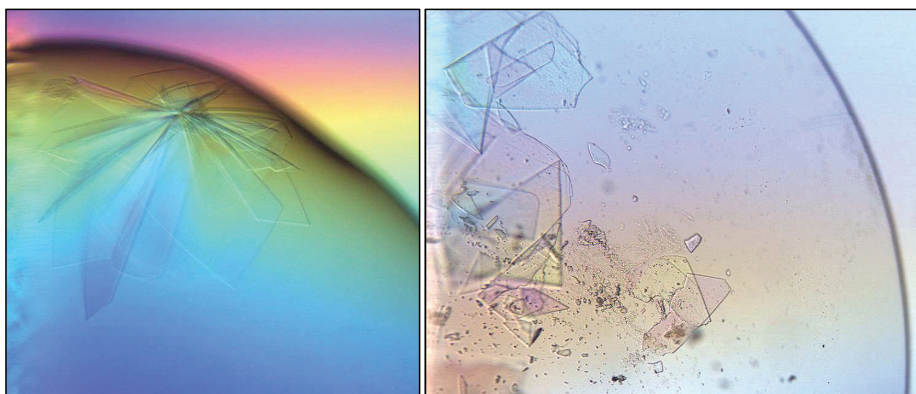


Abbildung 3.8: Uneinheitliche plattenförmige Kristalle von HisOdhI-T14D im polarisierten Licht unter dem Mikroskop (10x-Vergrößerung). Die Kristalle sind unter den folgenden Bedingungen gewachsen: 0,2 M Natriumnitrat, 0,1 M BisTris Propan pH 8,5, 20 % (w/v) PEG 3350, *sitting-drop*, 20 °C. Proteinkonzentration HisOdhI-T14D im Äquilibrium: Links, 15 mg/ml; Rechts, 14 mg/ml.

Letztendlich gelang es jedoch ein Röntgenbeugungsmuster eines plattenförmigen HisOdhI-T14D -Kristalls aus einem Ansatz mit 0,2 M Natrium Malonat, 0,1 M HEPES pH 7,5 und PEG 3350 zu erstellen. In diesem Ansatz lag die Fällungsmittelkonzentration zu Beginn der Kristallisation bei 16,58 % (w/v) und die Konzentration von HisOdhI-T14D bei 8,1 mg/ml (0,7 μl 23 mg/ml HisOdhI-T14D + 1,3 μl Additiv). Im Äquilibrium des Kristallisationsansatzes betrug die Fällungsmittelkonzentration 18 % (w/v) und die Proteinkonzentration 12,5 mg/ml.

Das im Folgenden beschriebene Strukturmodell, ausgehend von den am ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) in Grenoble durch Dr. Labahn gemessenen Röntgenbeugungsdaten lieferte überraschenderweise keine Informationen über die Lage der aminoterminalen Aminosäurereste von $_{\text{His}}\text{Odhl-T14D}$. Deswegen wurde für eine Analyse mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie der entsprechende $_{\text{His}}\text{Odhl-T14D}$ -Kristall in 10 μl 0,1 %iger TFA (Trifluoressigsäure) gelöst und die Probe mittels ZipTip (Millipore) konzentriert. Als Matrix wurde 5 g/l DHB (2,5-dihydroxy Benzoessäure) in 30 % TA (0,1 % (v/v) TFA in H_2O + 30 % (v/v) Acetonitril) auf Stahlplatte verwendet und die Messung erfolgte mit der Methode „3000-20137 LP_ProtMix“. Die erwartete Masse für die Volllänge von $_{\text{His}}\text{Odhl-T14D}$ liegt bei 16,6 kDa. Das Massenspektrum des gelösten Kristalls wies jedoch keine Massen größer als 13 kDa auf. Die ermittelten Massen im Kristall zwischen 11,267 und 12,388 kDa stimmten hingegen mit theoretisch ermittelten Massen für aminoterminal verkürztes $\text{Odhl}\Delta 1\text{-}40$ bzw. $\text{Odhl}\Delta 1\text{-}27$ überein (Daten nicht gezeigt). Demzufolge enthielt der Kristall kein Volllängen-Protein, sondern aminoterminal verkürztes Odhl. Diese Informationen stimmten mit den Röntgenstrukturdaten und der Elektronendichtekarte des erstellten Strukturmodells (Abbildung 3.9) überein. Offensichtlich fand im Kristallisationsansatz proteolytischer Abbau des aminoterminalen Endes statt, so dass die erhoffte Verringerung der Flexibilität des N-Terminus durch Interaktion der eingebauten T14D-Mutation nicht erfolgte.

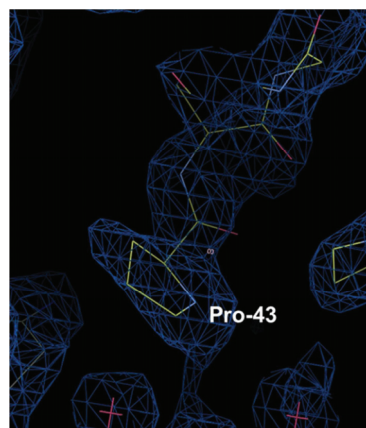


Abbildung 3.9: Elektronendichtekarte der Aminosäure Prolin an Position 43 im Odhl-Polypeptid von *C. glutamicum*. Die fehlende Elektronendichte aminoterminal von Pro-43 weist auf das Fehlen des N-Terminus von $_{\text{His}}\text{Odhl-T14D}$ im Kristall hin.

Die Röntgenbeugungsdaten wurden an der Beamline ID14-1 am ESRF in Grenoble durch Dr. Labahn gesammelt und ausgewertet (Tabelle 3.9). Die Datensammlung enthielt insgesamt 91 Röntgenbeugungsbilder mit einem Drehwinkel von jeweils 1° , woraus ein Datensatz mit 20.894 Reflektionen resultierte, von denen 6.634 einzigartige Reflektionen waren, also aufgrund der Symmetrie der Raumgruppe nicht mehrfach registriert wurden.

Tabelle 3.9: Statistiken der Datensammlung eines Odhl-Kristalls und Verfeinerung des Strukturmodells. Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

Datensammlung	
Auflösung [Å]	51,03 – 2,11 (6,33 – 2,00)
Reflektionen gesamt	20.894 (3.067)
Reflektionen einzigartig	6.634 (946)
Vollständigkeit [%]	99,2 (99,7)
R_{merge}	0,106 (0,265)
Prozessierungs-Software	Mosflm, CCP4
Gitterkonstanten	$a = 51,03 \text{ Å}$ $b = 51,23 \text{ Å}$ $c = 35,53 \text{ Å}$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
Verfeinerung	
Modellierung / Verfeinerung	Phenix, Coot
Proteinatome	764
Wasseratome	82
Bindungslängen [Å]	0,007
Bindungswinkel [°]	1,091
Ramachandran favorisierte Regionen [%]	92,8
Ramachandran unerlaubte Regionen [%]	1

Die kristallographische Raumgruppe, welche die Symmetrie der Elementarzelle im _{HIS}Odhl-T14D-Kristall am besten beschrieb, war die Raumgruppe $P2_12_12$ (orthorhombische Raumgruppe Nr. 18). Durch die Raumgruppensymmetrie-Operationen wird aus asymmetrischen Einheiten die Elementar- oder auch Einheitszelle aufgebaut. Dabei kann die asymmetrische Einheit aus einem aber auch mehreren Molekülen bestehen und

beschreibt die kleinste Einheit eines Kristalls, die sich nicht weiter durch kristallographische Symmetriebeziehungen zerlegen lässt. Die Abmessungen der Einheitszelle im Kristall betragen $a = 51,03 \text{ \AA}$, $b = 51,23 \text{ \AA}$, $c = 35,53 \text{ \AA}$ mit $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$ (orthorhombische Raumgruppe). Für die kristallographische Auswertung der gemessenen Datensätze und die Bestimmung der Proteinstruktur ist es von großer Bedeutung zu wissen, aus wie vielen Proteinmolekülen sich die asymmetrische Einheit in der Elementarzelle zusammensetzt. Der Solvenzgehalt im Kristall spielt dabei eine entscheidende Rolle und sollte bei durchschnittlich 50 % liegen (McPherson, 1999). Die hier ermittelten Maße der Elementarzelle, zusammen mit einem Lösungsmittelgehalt des Odhl-Kristalls von etwa 35,08 %, dem theoretischen Molekulargewicht für aminoterminal verkürztes Odhl und weiteren Parametern, lassen mit einer Wahrscheinlichkeit von 100 % auf das Vorliegen eines Monomers von aminoterminal verkürztem Odhl in der asymmetrischen Einheit schließen. Auf die vier asymmetrischen Einheiten in der orthorhombischen Elementarzelle bezogen, bedeutet dies eine Anzahl von 4 Odhl-Molekülen in der Einheitszelle.

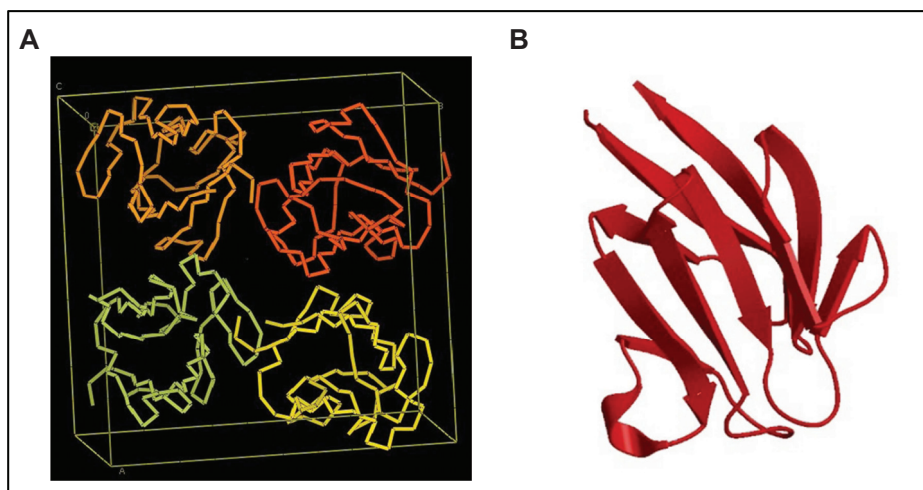


Abbildung 3.10: Kristallographische Analyse von Odhl aus *C. glutamicum*. Links ist die Position und Orientierung der 4 Odhl-Moleküle in der Einheitszelle gezeigt (A). Die Einheitszelle ist als gelbes Prisma dargestellt und die Positionen der übrigen drei Odhl-Moleküle sind durch die Symmetrieeoperationen der Raumgruppe $P2_12_12$ vorgegeben. Rechts ist das Strukturmodell für das Monomer von Odhl als Cartoon dargestellt (B). Die elf β -Stränge bilden das für FHA-Domänen charakteristische β -Sandwich.

Das Packungsmodell der Einheitszelle im Kristall mit dem enthaltenen Odhl-Tetramer ist in Abbildung 3.10 (links, A) dargestellt und verdeutlicht die nahezu identischen Kantenlängen von a und b in der Einheitszelle. Ein Proteinstrukturmodell wurde dabei auf Basis der gemessenen Daten mittels *molecular replacement* (molekularer Ersatz) berechnet. Als Vorlage fungierte dabei die bekannte NMR-Struktur von unphosphoryliertem Odhl

(PDB-Eintrag 2KB4; Barthe *et al.*, 2009). Das nach Verfeinerung erhaltene Strukturmodell von aminoterminal verkürztem OdhI ist in Abbildung 3.10 (rechts, B) als Cartoon dargestellt.

3.5.2 Heterologe Überproduktion und Reinigung sowie Bestimmung der nativen molekularen Masse des Interaktionskomplexes $\text{StrepOdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$

Wie bereits in Abschnitt 3.3.1 beschrieben, ist die FHA-Domäne von OdhI ausreichend für die Interaktion mit OdhA. Untersuchungen bezüglich OdhA zeigten, dass ein Derivat ohne die aminoterminalen 354 Aminosäuren noch immer katalytisch aktiv ist und mit OdhI interagiert (3.2.2). Nach umfangreichen erfolglosen Versuchen, beide Proteine aus getrennten Expressionskulturen zu isolieren, anschließend zu vereinen und daraus einen homogenen Interaktionskomplex zu isolieren, wurde eine veränderte Strategie gewählt und beide Proteine in derselben *E. coli*-Zelle überproduziert. Dazu wurden die kodierenden Gene für *Strep_odhI* $\Delta 43$ und *odhA* $\Delta 354$ so kloniert, dass sie als eine mRNA transkribiert werden. Durch die Veränderung der Strategie bestand die Erwartung, dass unmittelbar nach Translation eine Interaktion der beiden Proteine in *E. coli* stattfinden und es so zu einem stabilen und stöchiometrisch korrekten Komplex kommen würde.

Der Interaktionskomplex $\text{StrepOdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$ konnte in *E. coli* DH5 α in einer hohen Löslichkeit überproduziert werden. Dafür wurden 500 ml-Expressionskulturen zunächst bei 37 °C kultiviert und die 4-stündige Expression bei 30 °C schließlich mit 0,1 mM IPTG induziert. Der Interaktionskomplex konnte anhand des StrepTag-II am aminoterminalen Ende von OdhI $\Delta 43$ mittels Affinitätschromatographie aus dem Rohextrakt isoliert werden (Daten nicht gezeigt). Zur weiteren Reinigung und Bestimmung des nativen apparenten Molekulargewichts von $\text{StrepOdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$ wurden die konzentrierten Elutionsfraktionen nach Affinitätschromatographie auf einer Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 200) in Komplex-Puffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0) getrennt. Ausgewählte Fraktionen wurden im Anschluss in einem SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Ein Chromatogramm dieser Trennung sowie die dazugehörige Gel-Analyse sind exemplarisch in Abbildung 3.11 und 3.12 dargestellt.

Das Chromatogramm zeigte ein Absorptionsmaximum bei etwa 63 ml und die Analyse der zugehörigen Fraktionen zu diesem Peak im SDS-Gel zwei distinkte Banden. Eine der Banden wies eine apparente Masse von etwa 100 kDa auf, wohingegen die andere eine Masse von 13 kDa hatte. Aufgrund der theoretisch berechneten molekularen Massen von 96,1 kDa für OdhA $\Delta 354$ und 12,6 kDa für $\text{StrepOdhI}\Delta 43$ ist davon auszugehen, dass es sich bei den beiden Banden um das verkürzte OdhA und OdhI handelt. Das Elutionsvolumen von etwa 63 ml entspricht einem errechneten Molekulargewicht von 220 kDa. Daraus

ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der Interaktionskomplex aus zwei Molekülen OdhA Δ 354 und zwei Molekülen $\text{StrepOdhI}\Delta$ 43 zusammengesetzt ist. Dieser hochreine Komplex konnte nach Gelfiltration auf etwa 4,5 mg/ml für Kristallisationsexperimente konzentriert werden.

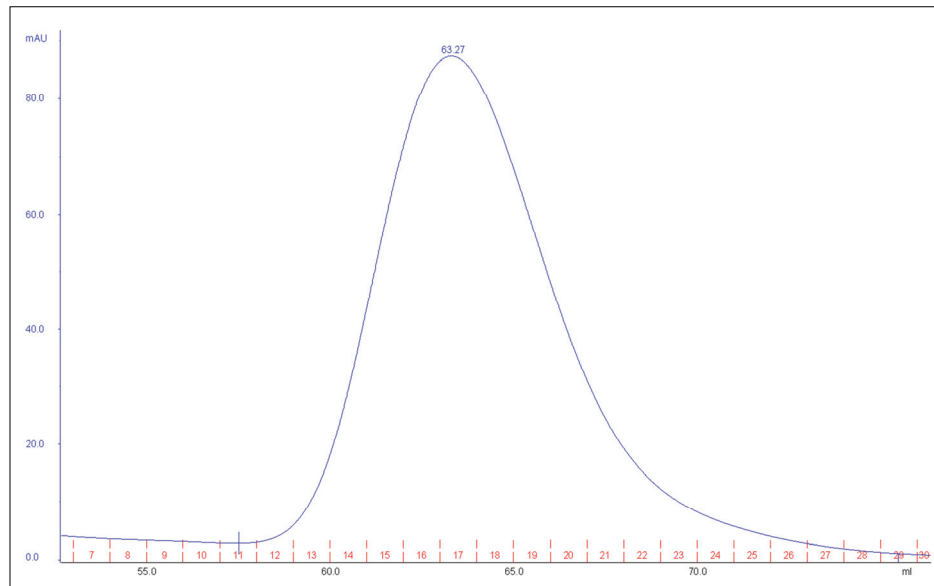


Abbildung 3.11: Größenausschluss-Chromatographie zur Reinigung und Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von $\text{StrepOdhI}\Delta$ 43-OdhA Δ 354. Gezeigt ist das Chromatogramm einer Trennung von $\text{StrepOdhI}\Delta$ 43-OdhA Δ 354 in 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7,0. Dabei zeigt die blaue Kurve die Absorption bei 280 nm in mAU und die X-Achse gibt das Elutionsvolumen in ml an. Die gesammelten Fraktionen sind in rot nummeriert angegeben.

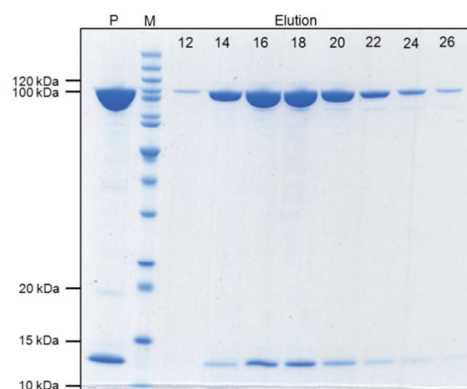


Abbildung 3.12: Reinigung von $\text{StrepOdhI}\Delta$ 43-OdhA Δ 354 aus *E. coli* DH5 α . Dargestellt ist ein mittels Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel. M: PageRuler Unstained Protein Ladder (Fermentas), P: injizierte Probe, Elution: Elutionsfraktionen nach Gelfiltration.

3.5.3 Proteinkristallisation von $\text{StrepOdhl}\Delta 43\text{-OdHA}\Delta 354$

OdHA ist ein Thiamindiphosphat- (ThDP) abhängiges Enzym und setzt im Komplex mit der E2- (AceF) und der E3- Untereinheit (Lpd) 2-Oxoglutarat über Hydroxybutyl-ThDP zu Succinyl-CoA um (Hoffelder *et al.*, 2010). Zusätzlich zu ThDP spielt ebenfalls zweiwertiges Magnesium (Mg^{2+}) als Kofaktor für OdHA eine Rolle. Sowohl ThDP als auch Mg^{2+} befinden sich im Fall der zu OdHA homologen E1o-Untereinheiten SucA aus *E. coli* (Frank *et al.*, 2007) bzw. KGD aus *M. smegmatis* (Wagner *et al.*, 2011) im aktiven Zentrum.

In einem ersten *screening* mit standardisierten Kristallisationsbedingungen konnte bereits nach einigen Tagen eine vielversprechende Kristallbildung beobachtet werden. Bei diesen Kristallen handelte es sich um Proteinnadeln, da die Kristallbildung in einer Richtung scheinbar zu schnell verlief. Eine Analyse dieser Nadelkristalle mittels SDS-PAGE lieferte eine Proteinbande bei etwa 100 und eine weitere bei etwa 13 kDa (Daten nicht gezeigt). Somit konnte der Beleg erbracht werden, dass sowohl $\text{StrepOdhl}\Delta 43$ als auch $\text{OdHA}\Delta 354$ in den Proteinnadeln vorlagen. Um zu analysieren, ob der pH-Wert oder die Molekülmasse des PEGs eine Rolle für die Kristallisation von $\text{StrepOdhl}\Delta 43\text{-OdHA}\Delta 354$ spielen, wurden pH-Variationen von 6,8-7,8 und PEG-Variationen von 4000-6000 eingesetzt. Zusätzlich wurde der Einfluss von Kaliumglutamat, MgCl_2 und 2-Oxoglutarat als stabilisierende Additive in den Reservoiarlösungen überprüft.

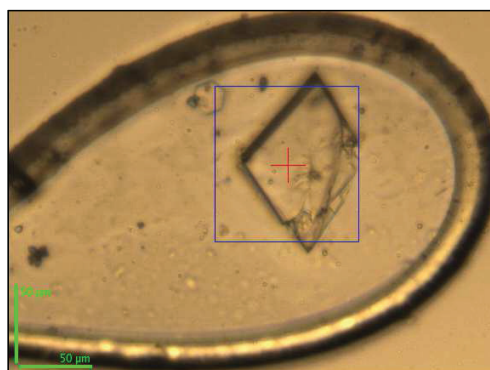


Abbildung 3.13: Plattenförmiger Kristall von $\text{StrepOdhl}\Delta 43\text{-OdHA}\Delta 354$ in einem *cryo loop*. Der Kristall ist unter den folgenden Bedingungen gewachsen: 0,1 M HEPES pH 7,5, 1 mM MgCl_2 und 25 % (w/v) PEG 5000 MME; eingesetzte Proteinkonzentration 3 mg/ml $\text{StrepOdhl}\Delta 43\text{-OdHA}\Delta 354$ + 1mM ThDP, im Äquilibrium Proteinkonzentration bei 8 mg/ml, *sitting-drop*, 20 °C.

Die entscheidende Optimierung der Kristallisationsbedingungen lieferte der Zusatz von 1 mM ThDP zu dem gereinigten Proteinkomplex unmittelbar vor Präparation der Kristallisationsansätze. Bereits nach acht Tagen konnten in vielen Ansätzen Kristalle

identifiziert werden, welche jedoch als relativ dünnen Platten vorlagen. Die Kristallbildung konnte demnach optimiert werden, es bestand allerdings der Eindruck, dass weder der pH-Wert, noch die Molekülmasse des PEGs, noch eines der Additive neben ThDP eine entscheidende Rolle für die Kristallisation spielen.

Der in Abbildung 3.13 dargestellte Kristall konnte aus einem Ansatz isoliert werden, der 3 mg/ml des mit 1 mM ThDP versetzten Interaktionskomplexes $\text{Strep-OdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$ enthielt, ebenso wie 0,1 M HEPES pH 7,5, 1 mM MgCl_2 und 25 % (w/v) PEG 5000 MME (Monomethylether). Im Äquilibrium des Kristallisationsansatzes betrug die Proteinkonzentration 8 mg/ml. Dieser plattenförmige Kristall lieferte schließlich ein Röntgenbeugungsmuster. Nach der abgeschlossenen Datensammlung wurde der gemessene Kristall gelöst und mittels polyklonalem Anti-OdhI-Antikörper in einem Western Blot analysiert, um die Anwesenheit sowohl von verkürztem OdhI als auch von OdhA im Kristall zu bestätigen. Mit dieser experimentellen Vorgehensweise konnte jedoch lediglich die Anwesenheit von $\text{OdhA}\Delta 354$, welches ebenfalls durch den Anti-OdhI-Antikörper gebunden wird, im Kristall nachgewiesen werden, nicht aber $\text{Strep-OdhI}\Delta 43$ (Daten nicht gezeigt).

3.5.4 Strukturmodell für $\text{OdhA}\Delta 354$

Ebenso wie die Röntgenbeugungsdaten zum OdhI-Kristall wurden auch die Daten für den Kristall bestehend aus $\text{OdhA}\Delta 354$ an der Beamline ID14-1 am ESRF in Grenoble durch Dr. Labahn gesammelt und ausgewertet (Tabelle 3.10). Die kristallographische Raumgruppe, welche die Symmetrie der Elementarzelle im Proteinkristall am besten beschrieb, war die Raumgruppe $P2_12_12$ (orthorhombische Raumgruppe Nr. 18). Die Abmessungen der Einheitszelle betrugen $a = 124,4 \text{ \AA}$, $b = 164,1 \text{ \AA}$, $c = 88,6 \text{ \AA}$ mit $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$. Die Datensammlung enthielt insgesamt 287 Röntgenbeugungsbilder mit einem Drehwinkel von jeweils $0,3^\circ$, woraus ein Datensatz mit 100.726 Reflexionen resultierte, von denen 29.892 einzigartige Reflexionen waren.

Tabelle 3.10: Statistiken der Datensammlung. Werte in Klammern beziehen sich auf die Schale mit der höchsten Auflösung.

Auflösung [Å]	99,1 - 3,20 (3,37 - 3,20)
Reflexionen gesamt	100726 (14989)
Reflexionen einzigartig	29892 (4328)
Vollständigkeit [%]	97,8 (97,8)
R_{merge}	11,5 (31,8)

Wie bereits zuvor für OdhI wurde ein Proteinstrukturmodell auf Basis der gemessenen Daten mittels *molecular replacement* berechnet. Für dieses Modell wurde die Struktur von SucA aus *E. coli* (PDB-Eintrag 2jgd; Frank *et al.*, 2007) als Vorlage verwendet, welches 44 % Aminosäuresequenzidentität mit der carboxyterminalen E1-Dehydrogenase-/Decarboxylase-Domäne von OdhA aus *C. glutamicum* aufweist. Die Maße der Elementarzelle zusammen mit dem theoretischen Molekulargewicht für OdhA Δ 354 und einem Wassergehalt des Kristalls von etwa 40 % ließen mit einer Wahrscheinlichkeit von 93 % auf das Vorliegen eines Dimers von OdhA Δ 354 in der asymmetrischen Einheit schließen. Dieses Dimer-Modell unterscheidet sich nur unwesentlich von dem SucA-Dimer aus *E. coli* (Frank *et al.*, 2007). Die Wahrscheinlichkeit, dass sich zusätzlich zu OdhA Δ 354 ebenfalls $\text{StrepOdhI}\Delta 43$ in der Einheitszelle befindet, liegt deutlich unter der Wahrscheinlichkeit für das OdhA Δ 354-Dimer. Bedauerlicherweise war die Qualität der Röntgenbeugungsdaten nicht ausreichend für eine Verfeinerung des Strukturmodells von OdhA Δ 354.

4 Diskussion

4.1 Der gemischte PDH-/ODH-Komplex in *C. glutamicum*

In *C. glutamicum* konnte erstmals ein noch nicht zuvor beschriebener gemischter Multienzym-Komplex identifiziert werden, der sowohl Pyruvat- als auch Oxoglutarat-Dehydrogenase-Aktivität zeigt (Niebisch *et al.*, 2006). Die Entdeckung, dass durch OdhA neben der universellen E3-Untereinheit Lpd auch die beiden Enzyme der Pyruvat-Dehydrogenase AceE und AceF ko-gereinigt wurden, war ausschlaggebend für die Annahme eines gemischten PDH-/ODH-Komplexes (Niebisch *et al.*, 2006). Bereits 1996 konnten Usuda *et al.* belegen, dass die Dehydrogenase-/Decarboxylase-Reaktion der ODH durch das OdhA-Polypeptid katalysiert wird. Zusätzlich zeigt OdhA am aminoterminalen Ende hohe Sequenzidentität mit der katalytischen Domäne der E2-Acyltransferase aus *B. subtilis* (Usuda *et al.*, 1996). Die charakteristischen Lysinreste, an deren ϵ -Aminogruppe Lipoylreste gebunden sind, fehlen aber. Darüber hinaus ist AceF das einzige lipoylierte Protein in *C. glutamicum* (Hoffelder *et al.*, 2010). Trotzdem zeigt OdhA *in vitro* Acyltransferase-Aktivität und die Deletion von *aceF* führt nicht nur zu dem Verlust der PDH-, sondern auch der ODH-Aktivität (Hoffelder *et al.*, 2010). All dies zusammengenommen bestätigt die enge Interaktion der einzelnen Enzyme im gemischten PDH-/ODH-Komplex und zeigt ferner, dass die E2-Domäne von OdhA die Lipoylreste des AceF-Polypeptids nutzt.

AceF besitzt drei Lysinreste (Kalinowski *et al.*, 2003), an deren ϵ -Aminogruppe jeweils eine Liponsäure post-translational gebunden werden kann. Diese Lysinreste sind in einem stark konservierten Motiv eingebettet, wie es erstmals für *Bacillus stearothermophilus* beschrieben wurde (Wallis *et al.*, 1994). Die Lipoyldomänen sind durch kurze flexible *Linker* bestehend aus Alanin, Prolin und geladenen Aminosäuren untereinander und mit der carboxyterminalen katalytischen Domäne verbunden (Packman *et al.*, 1986). Dadurch wird deren Interaktion mit den katalytischen Zentren der E1- und E3-Untereinheit im Reaktionszyklus ermöglicht. Ob alle drei Lysinreste in AceF lipoyliert sind geht weder aus der Sequenz noch aus dem positiven Nachweis mit dem gegen Liponsäure gerichteten Antikörper (Hoffelder *et al.*, 2010) hervor. Für AceF aus *E. coli* wurde beschrieben, dass alle drei Lipoyldomänen zwar katalytisch funktional sind, aber offenbar lediglich zwei der Lysinreste zeitgleich lipoyliert vorliegen (Packman *et al.*, 1984a). Dagegen weisen die E2-Untereinheiten der PDH (E2p) in *Bacillus spec.* grundsätzlich lediglich einen lipoylierbaren Lysinrest auf (Guest *et al.*, 1985), ebenso wie die E2o-Untereinheit in *Azotobacter vinelandii* (Berg *et al.*, 1996) und SucA in *E. coli* (White *et al.*, 1980). Auch

DlaT aus *M. tuberculosis* besitzt nur zwei Lipoyldomänen (Tian *et al.*, 2005a). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit AceF-Muteinen in *C. glutamicum* zeigen, dass von den drei Domänen des Wildtyps, L1, L2, und L3, mindestens L1 und L3 lipoyliert vorliegen müssen. Dies kann aufgrund der Aktivität des PDH-/ODH-Komplexes geschlossen werden, da jeweils bei den anderen zwei Domänen durch Ersatz des Lysinrestes durch einen Glutaminrest deren Lipoylierung unterbunden ist. War in AceF ausschließlich L3 lipoyliert, zeigte sich kein Phänotyp bei der entsprechenden Mutante. Auch die kinetischen Parameter waren nicht beeinflusst. Das zeigt, dass dieser Rest die volle Funktion des Komplexes gewährleistet. Diese Situation entspricht somit der des SucA-Polypeptids in ODH von *E. coli*, welches von vornherein nur eine einzige Lipoyldomäne besitzt (White *et al.*, 1980). Nicht erwartet wurde, dass bei ausschließlicher Lipoylierung von L1 die maximale Aktivität und katalytische Effizienz verringert ist, und zwar besonders stark bezüglich der ODH-Aktivität. Dadurch wird deutlich, dass die Lipoyldomäne 1 von AceF in *C. glutamicum* geringer für die Komponenten des PDH-/ODH-Komplexes zugänglich ist als die Domäne L3 und dass eine besonders schlechte Zugänglichkeit der Domäne L1 für die an der ODH-Aktivität beteiligten Komponenten besteht. Da der Lipoylrest bzw. der mit den Reaktionsintermediaten beladene Lipoylrest am gesamten Reaktionszyklus beteiligt ist kann nicht unterschieden werden, ob die E1- oder die E2-Aktivität bei ausschließlicher Lipoylierung von L1 beeinträchtigt ist. Es ist allerdings nicht anzunehmen, dass die E3-Aktivität im Reaktionszyklus reduziert ist, da die Dihydrolipoyl-Dehydrogenase den unbeladenen reduzierten Lipoylrest als Substrat zur FAD-abhängigen Oxidation nutzt.

4.2 Die Rolle von OdhA und OdhI in *C. glutamicum* bei Wachstum auf Glutamin

Im gemischten PDH-/ODH-Komplex von *C. glutamicum* spielt das OdhA-Protein eine Schlüsselrolle bei der Umsetzung von Oxoglutarat zu Succinyl-CoA. Der Grund ist, dass OdhA nicht nur E1- und E2-Aktivität zeigt (Hoffelder *et al.*, 2010), sondern zusätzlich durch Interaktion mit dem regulatorischen Protein OdhI (NCgl1385) in seiner Aktivität reguliert wird (Niebisch *et al.*, 2006). Für das zu OdhI homologe GarA (Rv1827) aus *M. tuberculosis* sind sogar drei Interaktionspartner bekannt. Dies ist die zu OdhA homologe Ketoglutarat-Decarboxylase (KGD), sowie die Glutamat-Dehydrogenase und die α -Untereinheit GltB der Glutamat-Synthase (Nott *et al.*, 2009). Interessanterweise ist jedes dieser drei Enzyme im Zentralstoffwechsel an der Stickstofffixierung beteiligt. Dies deutet darauf hin, dass GarA eine übergeordnete Kontrolle bei der Verknüpfung des Kohlenstoffflusses mit dem Stickstofffluss zukommt. Gleiches könnte ebenfalls für OdhI der Fall sein. Zumindest ist die Glutamin-Verstoffwechselung durch *C. glutamicum* bei unphosphoryliertem OdhI

beeinträchtigt (Niebisch *et al.*, 2006). Darüber hinaus scheint ein Zusammenhang zwischen der Odhl-bedingten Hemmung der ODH-Aktivität und der Glutamatproduktion mit *C. glutamicum* zu bestehen. So konnte gezeigt werden, dass unter unterschiedlichen Glutamat-produzierenden Bedingungen die ODH-Aktivität reduziert ist (Kawahara *et al.*, 1997). Schultz *et al.* (2007) konnten zeigen, dass die Deletion von *odhl* zu einer drastischen Abnahme der Glutamat-Produktion um bis zu 99 % führt. Ferner liegt in einer *pknG*-Deletionsmutante Odhl hauptsächlich unphosphoryliert vor was durch Bindung an OdhA die ODH-Aktivität hemmt, wodurch die Glutamat-Produktion signifikant erhöht ist (Schultz *et al.*, 2007). Da auch die Dephosphorylierung von Odhl in *C. glutamicum* 2262 unter Glutamat-induzierenden Bedingungen beobachtet wurde (Boulahya *et al.*, 2010) ist naheliegend, dass der Phosphorylierungsstatus von Odhl ein wesentliches Element bei der Erklärung des Phänomens „Glutamatbildung mit *C. glutamicum*“ darstellt.

Die stark beeinträchtigte Glutamin-Verstoffwechselung durch *C. glutamicum* bei unphosphoryliertem Odhl in *C. glutamicum* $\Delta pknG$ (Schultz *et al.*, 2007) ermöglichte es Suppressormutanten zu isolieren und zu untersuchen, die auf Minimalmedium mit L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle wieder wuchsen. Es wurden Mutationen in *odhl* oder *odhA* erwartet, welche die Wiederherstellung des Wachstums ermöglicht haben könnten. Die Sequenzierung von *odhA* und *odhl* in 24 Suppressormutanten ergab allerdings für 14 Mutanten weder eine Mutation in *odhl* noch in *odhA*. Der Phänotyp „Wachstum auf Glutamin“ wurde in diesen 14 Mutanten also nicht auf Grund der Interaktion zwischen Odhl und OdhA hervorgerufen. Da für alle vier Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen in *C. glutamicum* gezeigt wurde, dass sie Odhl phosphorylieren können (Schultz *et al.*, 2009), ist möglicherweise eine der in *C. glutamicum* $\Delta pknG$ verbliebenen Proteinkinasen in den Suppressormutanten mutiert oder zeigt eine veränderte Expression, so dass Odhl-Phosphorylierung erfolgt. Die Substrat-Spezifität von Proteinkinasen hängt unter anderem von einzelnen Aminosäureresten in der Bindestelle der Kinase ab, die mit benachbarten Resten der Phosphorylierungsstelle im Substrat interagieren (Kobe *et al.*, 2005). Mutationen in der Bindestelle einer Proteinkinase könnten demnach zu veränderter Spezifität für Odhl und dadurch wieder zu dessen vermehrter Phosphorylierung führen.

Basierend auf der Länge von *odhA* und *odhl* wurde allerdings erwartet, dass wesentlich mehr Mutationen in dem 8,5-fach längeren *odhA* Gen auftreten als in *odhl*. Jedoch konnte in lediglich einer Mutante eine *odhA* Mutation identifiziert werden, während in sieben Mutanten *odhl* mutiert vorlag. Die erhaltene spezifische *odhA*-Mutation lag dabei dreimal in unabhängig erhaltenen Suppressormutanten vor. Das OdhA-Polypeptid ist essentiell für die ODH-Aktivität (Hoffelder *et al.*, 2010) und somit für das Wachstum auf Glutamin. Mutationen in *odhA*, die im OdhA-Polypeptid z. B. einen Einfluss auf die korrekte Ausbildung der Tertiär- und Quartärstruktur (Dobson, 2003), das aktive Zentrum, die

Bindung der Kofaktoren Thiamindiphosphat und Mg^{2+} oder die Interaktion mit den Lipoyldomänen von AceF im Komplex haben, führen möglicherweise zu einem Verlust der ODH-Aktivität und wären demnach geeignet ein Wachstum auf Glutamin zu verhindern.

4.3 Interaktionsmodell von OdhA und OdhI in *C. glutamicum*

Die Regulation der ODH-Aktivität durch post-translationale Modifikation des Regulatorproteins OdhI stellt einen vollkommen neuen Mechanismus der Aktivitätskontrolle in *C. glutamicum* dar. Im Zuge einer reversiblen Threonin-spezifischen Phosphorylierung im aminoterminalen Bereich von OdhI kommt es zu intramolekularer Wechselwirkung des Phospho-Threonins (pThr) mit der carboxyterminalen FHA-Domäne von OdhI. Dadurch werden Bereiche in OdhI blockiert, die für die Interaktion mit OdhA verantwortlich sind. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion zwischen OdhI und OdhA detailliert untersucht. Um ein Modell dieses Interaktionskomplexes erstellen zu können, wurden die interagierenden Bereiche in beiden Proteinen zunächst auf einzelne Domänen eingegrenzt.

In Ko-Reinigungsexperimenten konnte der für die Interaktion mit OdhI verantwortliche Bereich in OdhA auf die carboxyterminale E1-Domäne eingegrenzt werden. Die kleine aminoterminal E1-Domäne sowie die E2-Domäne spielen für die Bindung von OdhI keine Rolle (Krawczyk *et al.*, 2010). Verschiedene aminoterminal verkürzte OdhA-Derivate ergaben in dieser Arbeit eine weitere Eingrenzung des interagierenden Bereichs in OdhA. Das Derivat OdhA Δ 354, in dem die E2-Domäne und zusätzliche 18 Aminosäuren fehlen, zeigte im Vergleich mit der Volllänge von OdhA eine unveränderte *in vitro* Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität sowie eine unveränderte Interaktion mit OdhI. Die Deletion weiterer 41 Aminosäuren führte jedoch zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität dieses Polypeptids OdhA Δ 395. Es besteht die Vermutung, dass der Aktivitätsverlust die Folge einer fehlenden Dimerisierung von OdhA Δ 395 ist. In der Regel liegen die E1-Untereinheiten in den bislang untersuchten PDH- und ODH-Komplexen von Gram-positiven Bakterien als Heterotetramere ($\alpha_2\beta_2$) und in Gram-negativen als Homodimere (α_2) vor (Neveling *et al.*, 1998). Dies gilt jedoch weder für die E1p-Untereinheit AceE in *C. glutamicum* (Schreiner *et al.*, 2005) noch für das homologe SucA aus *E. coli* (Frank *et al.*, 2007), die jeweils als Homodimer bzw. Heterotetramer aktiv sind. Mit Hilfe von Größenausschluss-Chromatographie und Röntgenkristallographie konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass aminoterminal verkürztes OdhA Δ 354, untypisch für Gram-positive Organismen, ein Homodimer bildet. Dies trifft ebenfalls auf das homologe KGD-Protein aus *M. smegmatis* zu (Wagner *et al.*, 2011), welches 62 % Sequenzidentität mit OdhA aufweist. Gelfiltrationsanalysen ergaben, dass

die Derivate OdhA Δ 89 und OdhA Δ 354 ein Elutionsvolumen entsprechend des Molekulargewichtes des jeweiligen Dimers zeigten. Dies galt jedoch nicht für OdhA Δ 395, welches im Ausschlussvolumen der Säule eluierte. Erst kürzlich konnte für das homologe KGD aus *M. smegmatis* durch Röntgenstrukturanalyse gezeigt werden, dass eine kleine helikale Domäne von Aminosäure 361-445 an der Dimerisierung von KGD beteiligt ist (Wagner *et al.*, 2011). In OdhA Δ 395 sind jedoch die Aminosäurereste 361-395 deletiert. Dadurch fehlt in dem katalytisch inaktiven OdhA-Derivat OdhA Δ 395 eine Helix der für KGD beschriebenen Dimerisierungs-Domäne vollständig. Daraus ergibt sich die Annahme, dass OdhA Δ 395 nicht mehr in der Lage ist ein Dimer auszubilden und aus diesem Grund keine Dehydrogenase-/Decarboxylase-Aktivität vorhanden ist. Die Interaktion mit Odhl ist hier jedoch nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, dass die Dimerisierung von OdhA keine Voraussetzung zur Interaktion mit Odhl ist.

Für Odhl konnten die mit OdhA interagierenden Bereiche bereits mittels Ko-Reinigungsexperimenten und Oberflächen-Plasmon-Resonanz- (SPR-) Messungen identifiziert werden (Krawczyk *et al.*, 2010). Die Resultate dieser Messungen konnten in der vorliegenden Arbeit auf enzymatischer Ebene in vollem Umfang bestätigt werden. Erwartungsgemäß zeigte weder phosphoryliertes Odhl noch der ungeordnete N-Terminus von Odhl (AS 1-67) einen Einfluss auf die ODH-Aktivität *in vitro*. Im Gegensatz dazu führte die Anwesenheit von unphosphoryliertem Odhl, ebenso wie die gesamte FHA-Domäne (AS 44-143), zu einer fast vollständigen Reduktion der ODH-Aktivität. In Ko-Reinigungsexperimenten wurde gezeigt, dass das homologe native GarA-Protein (AS 1-162) neben KGD zusätzlich mit der Glutamat-Dehydrogenase (GDH) und einer Untereinheit der Glutamat-Synthase (GS) in *M. tuberculosis* interagiert (Nott *et al.*, 2009). Die Wechselwirkung mit diesen drei Proteinen blieb auch dann unverändert, wenn lediglich die konservierte FHA-Domäne von GarA (AS 55-149) eingesetzt wurde. Dagegen konnte durch den konservierten Bereich der FHA-Domäne von Odhl (AS 68-143) hier kein Einfluss auf die ODH-Aktivität und somit auch keine Interaktion mit OdhA nachgewiesen werden. Folglich scheinen die vollständigen carboxyterminalen 100 Aminosäuren von Odhl für die Interaktion mit OdhA notwendig zu sein.

Die Eingrenzung der interagierenden Domänen von OdhA und Odhl macht deutlich, dass die Aminosäuren 43-143 der FHA-Domäne von Odhl mit den carboxyterminalen Aminosäuren 396-1221 der E1-Domäne von OdhA interagieren. Mit Hilfe von *cross-linking* Experimenten sollten Bindestellen auf einzelne Peptide eingegrenzt werden. Dabei konnten drei *cross-links* zwischen Odhl und OdhA identifiziert werden, die mit der Eingrenzung der interagierenden Domänen übereinstimmen. Basierend auf den interagierenden Peptiden, der Form beider Proteine und den elektrostatischen Wechselwirkungen konnte mit Unterstützung von Dr. Jung-Hsin Lin (Staatliche Universität Taiwan) ein *docking*-Modell erstellt werden. Da für OdhA zu diesem Zeitpunkt jedoch keine

Strukturinformationen vorlagen, wurde zunächst ein Homologie-Modell für das Dimer von OdhA Δ 395 auf der Grundlage des homologen SucA-Polypeptids aus *E. coli* (Frank *et al.*, 2007) angefertigt, welches hohe Sequenzidentität mit der carboxyterminalen E1-Domäne von OdhA aufweist. Die experimentell ermittelten *cross-links* lieferten zwei Möglichkeiten für den Interaktionskomplex aus OdhI Δ 43 und dem Dimer von OdhA Δ 395. Basierend auf dem *cross-link* zwischen Glu-472 (OdhA) und Asp-126 (OdhI) ist das in Abbildung 4.1 gezeigte Modell bevorzugt. Dieses *docking*-Modell, basierend auf dem *cross-link* zwischen Glu-472 und Asp-126 OdhI (Abbildung 4.1) konnte durch die experimentellen Befunde aus 3.3.3 eindeutig bekräftigt werden (Abbildung 4.3).

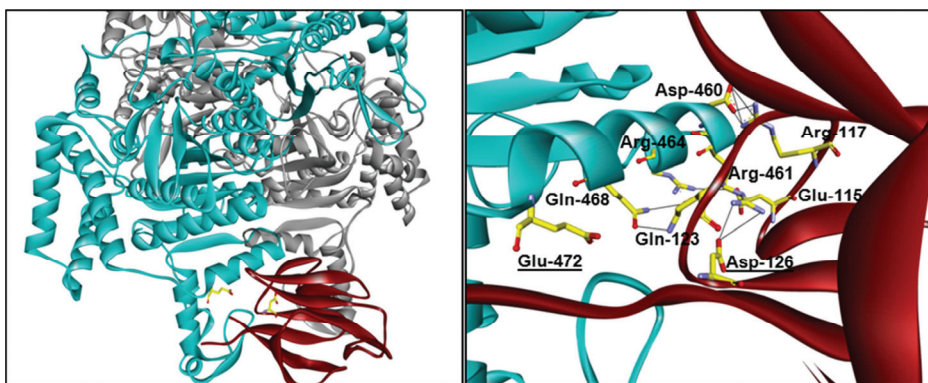


Abbildung 4.1: *Docking*-Modell von OdhA und OdhI aus *C. glutamicum*. Dargestellt ist das auf der Basis von 2jgd erstellte Homologie-Modell des Dimers von OdhA Δ 395 (grau: Monomer B; blau: Monomer C) in Wechselwirkung mit einem Monomer OdhI Δ 43 (rot). Die Aminosäuren der verknüpften Peptide aus OdhI und OdhA sind im Stäbchenmodell dargestellt und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen als schwarze Linien. Die Positionen der entsprechenden Aminosäuren sind jeweils in Bezug auf das native OdhI (143 AS) bzw. OdhA (1221 AS) angegeben.

Für die chemische Verknüpfung von Lysinresten zweier Proteine müssen die Reste zum einen für die *Linker*-Substanz zugänglich sein, sich zum anderen aber auch zum Zeitpunkt der Verknüpfung in räumlicher Nähe zueinander befinden (Leitner *et al.*, 2010). In weiterführenden *cross-linking* Experimenten mit OdhI Δ 43-Muteinen, die jeweils einen zusätzlichen Lysinrest enthielten, konnten jedoch keine *cross-links* identifiziert werden, da vermutlich eine dieser Bedingungen hier nicht erfüllt war.

In allen bislang untersuchten FHA-Domänen sind die elf vorliegenden β -Stränge durch *Loops* (z. B. β 1/2) miteinander verbunden. In den *Loops* β 3/4, β 4/5 und β 6/7 sind fünf hoch-konservierte Aminosäurereste lokalisiert, die eine herausragende Rolle für die Bindung des Phosphopeptids spielen (Durocher *et al.*, 2002). Im Folgenden sind die Aminosäurereste spezifisch für die FHA-Domäne von OdhI angegeben. Bei der Phosphopeptid-Bindung an die FHA-Domäne interagieren in der Regel ausschließlich Arg-71 und Ser-86 unmittelbar mit dem phosphorylierten Threoninrest. Gly-70 ist darüber

hinaus ausschlaggebend, weil es den β -Turn zwischen $\beta 3$ und $\beta 4$ initiiert und erst dadurch Arg-71 die entscheidende Position für die Phosphopeptid-Bindung ermöglicht (Durocher *et al.*, 2000a). Im Fall von OdhI besteht zusätzlich eine direkte Interaktion zwischen pThr-15 und Arg-87, die eher untypisch ist für die Interaktion zwischen FHA-Domänen und Phosphopeptiden (Barthe *et al.*, 2009). Die Konformation, in der das Phosphopeptid gebunden vorliegt, wird durch Gly-70 und His-89 stabilisiert. Dabei steht His-89 sowohl mit Gly-70 als auch mit Ser-86 in einer direkten Wechselwirkung (Durocher *et al.*, 2000a).

Der Serin- und der Histidinrest sind als SXXH-Motiv in allen bislang untersuchten FHA-Domänen hoch-konserviert (Pallen *et al.*, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass der Serinrest 86 in OdhI erwartungsgemäß keine Rolle für die Interaktion mit OdhA spielt. Dies gilt neuesten Ergebnissen zu Folge ebenfalls für das mycobakterielle GarA (Nott *et al.*, 2009) und ist wenig verwunderlich, weil der konservierte Serinrest in der FHA-Domäne spezifisch Phospho-Threoninreste bindet (Durocher *et al.*, 2000a). In vorherigen Arbeiten zu GarA wurde allerdings zunächst beschrieben, dass ein Austausch des homologen Serinrestes zu Alanin die Interaktion mit KGD blockiert (O'Hare *et al.*, 2008). Dadurch entstand zunächst die Vermutung, dass die Interaktion von OdhI und OdhA durch eine Phosphorylierung von OdhA beeinflusst werden könnte (Barthe *et al.*, 2009). Zur Bestimmung der Interaktion von OdhI und OdhA mittels SPR wurden jedoch nahezu alle eingesetzten Proteine aus *E. coli* isoliert (Krawczyk *et al.*, 2010). Da *E. coli* keine Serin-/Threonin-spezifischen Proteinkinasen vom eukaryotischen Typ besitzt, liegt das aus *E. coli* isolierte OdhA höchst wahrscheinlich in unphosphorylierter Form vor. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch bestätigt, dass aus *E. coli* isoliertes OdhI immer unphosphoryliert ist (Schultz *et al.*, 2007). Mit diesen Proteinen konnte immer eine eindeutige Interaktion zwischen OdhI und OdhA nachgewiesen werden (Krawczyk *et al.*, 2010).

Für den Histidinrest 89 im konservierten SXXH-Motiv von OdhI wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass der Austausch zu Alanin einen Verlust der Interaktion mit OdhA bewirkt. Der Histidinrest ist maßgeblich an der Stabilisierung der Phosphopeptid-Bindung mit der FHA-Domäne beteiligt (Durocher *et al.*, 2000a). Da die Interaktion von OdhI mit OdhA aber voraussichtlich nicht auf einer Phospho-Threonin-Bindung basiert besteht die Annahme, dass durch den Austausch von Histidin zu Alanin die Faltung der FHA-Domäne von OdhI beeinträchtigt ist. Ein solcher Effekt auf die Tertiärstruktur *in vivo* wurde bereits für Rad53 aus *S. cerevisiae* beschrieben (Durocher *et al.*, 2002). Mit Blick auf das Interaktionsmodell von OdhI und OdhA in Abbildung 4.1 und 4.3 zeigt sich, dass eine direkte Beteiligung von His-89 an der Interaktion mit OdhA eher unwahrscheinlich ist. His-89 nimmt keine exponierte Position in OdhI ein und ist ebenso wie Ser-86 an einer OdhA-abgewandten Seite von OdhI lokalisiert (Abbildung 4.3). Damit spielen die für die

Phosphopeptid-Bindung relevanten Reste Serin und Histidin im konservierten SXXH-Motiv der FHA-Domäne von Odhl vermutlich keine direkte Rolle für die Interaktion mit OdhA.

In dem Stamm *C. glutamicum* $\Delta pknG$ liegt Odhl im Wesentlichen unphosphoryliert vor (Schultz *et al.*, 2007), wodurch die ODH-Aktivität so stark reduziert ist, dass kein Wachstum auf Minimalmedium mit L-Glutamin als einziger C- und N-Quelle möglich ist (Niebisch *et al.*, 2006). Suppressormutanten mit wieder befähigtem Wachstum lieferten eine *missense*-Mutation in *odhA*, die zum Austausch von Cystein zu Arginin an Position 704 (C704R) im OdhA-Polypeptid führte. Durch den chromosomalen Nachbau der Mutation im *odhA*-Gen von *C. glutamicum* $\Delta pknG$ konnte bestätigt werden, dass allein der Austausch von Cys-704 zu Arg-704 in OdhA für das wiedererlangte Wachstum auf Glutamin verantwortlich ist und es dadurch wahrscheinlich zu reduzierter Interaktion zwischen unphosphoryliertem Odhl und OdhA-C704R *in vivo* kommt. Auch *in vitro* Experimente zeigten eine um 50 % verringerte Interaktion des Muteins OdhA Δ 89-C704R mit Odhl und bestätigen so die beeinträchtigte Interaktion von OdhA-C704R mit Odhl. Aus *in silico* Analysen zur Bedeutung des Cysteinrestes ergab sich kein Hinweis auf eine Beteiligung von Cys-704 an einer Disulfidbrücke in OdhA. Auch ist dieser Rest in homologen OdhA Proteinen nicht konserviert.

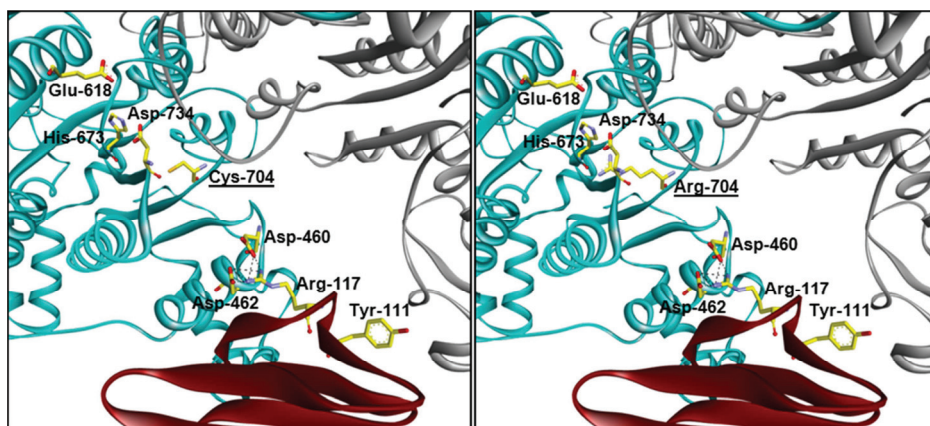


Abbildung 4.2: Interaktionsmodell von OdhA und Odhl aus *C. glutamicum*. Dargestellt ist das auf der Basis von 2jgd erstellte Homologie-Modell des Dimers von OdhA Δ 395 (grau: Monomer B; blau: Monomer C) in Wechselwirkung mit einem Monomer Odhl Δ 43 (rot). Der Interaktionsbereich ist vergrößert. Links: WT OdhA mit Cys704; Rechts: Austausch von Cystein 704 zu Arginin im OdhA-Monomer C (blau). Mögliche für die Interaktion relevante Aminosäuren von Odhl und OdhA sind im Stäbchenmodell dargestellt und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen als schwarze gestrichelte Linien. Die Positionen der entsprechenden Aminosäuren sind jeweils in Bezug auf das native Odhl (143 AS) bzw. OdhA (1221 AS) angegeben.

Allerdings wurde durch den Austausch von Cystein zu Arginin eine wesentlich längere Seitenkette eingebracht, die zusätzlich noch eine veränderte Ladung gegenüber dem ursprünglichen Cystein aufweist. Der Einfluss von Ladungseigenschaft und Größe wurde durch Austausch des Cysteins zu Glutamat oder zu Serin überprüft. Dabei führte der Serinrest ebenfalls zu einer Reduktion der Wechselwirkung mit OdhI, die Interaktion war jedoch nur geringfügig um etwa 30 % verringert. Bei Austausch des Cysteins gegen Glutamat wurde wie mit Arginin die um etwa 50 % reduzierte Hemmung erreicht. Damit spielt die Ladung der Aminosäure in dieser Position in OdhA möglicherweise eine geringere Rolle für die Interaktion mit OdhI als die Länge der Seitenkette. Jedoch wäre anhand des in Abbildung 4.1 gezeigten *docking*-Modells von OdhA und OdhI die lange Seitenkette von Arginin nicht in der Lage die Interaktion mit OdhI durch direkten Kontakt zu reduzieren. Es besteht daher die Vermutung, dass es durch den Austausch von Cystein in Position 704 von OdhA durch Glutamat oder Arginin (Abbildung 4.2) zu einer Störung der Ladungen verdeckter Aminosäuren wie z. B. Glu-618, His-673 und Asp-734 in OdhA kommt. Dies könnte eine geringfügige Umordnung von OdhA zur Folge haben, wodurch die Zugänglichkeit für OdhI etwas reduziert würde.

In Folge weiterer Mutationsanalysen zeigte sich überraschenderweise, dass der Austausch von Tyr-111 und Arg-117 in OdhI Δ 43 zu einem vollständigen Verlust der Interaktion mit OdhA führte. Zusammen mit der Struktur von OdhI (Barthe *et al.*, 2009) ergibt sich daraus eine interessante Interpretationsmöglichkeit für die Interaktion von unphosphoryliertem OdhI mit OdhA.

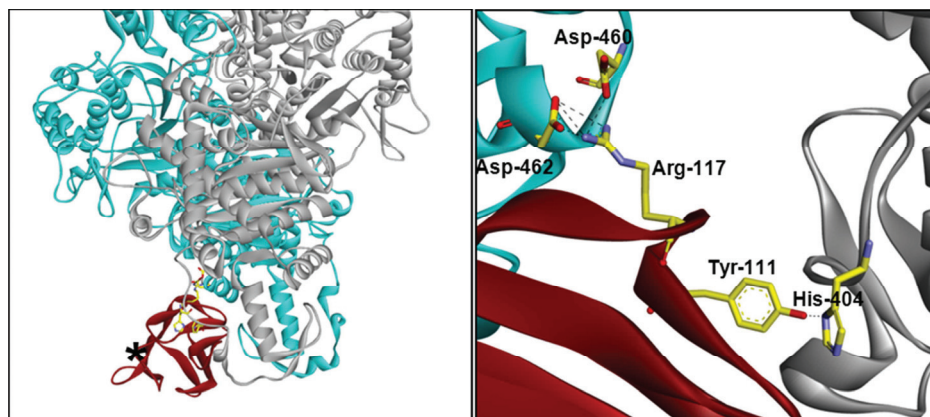


Abbildung 4.3: Interaktionsmodell von OdhA und OdhI aus *C. glutamicum*. Links: Dargestellt ist das auf der Basis von 2jgd erstellte Homologie-Modell des Dimers von OdhA Δ 395 (grau: Monomer B; blau: Monomer C) in Wechselwirkung mit einem Monomer OdhI Δ 43 (rot). Die Position des konservierten SXXH-Motivs in OdhI ist durch einen schwarzen Stern gekennzeichnet. Rechts: Vergrößerung des Interaktionsbereichs zwischen OdhI und OdhA. Mögliche für die Interaktion relevante Aminosäuren von OdhI und OdhA sind im Stäbchenmodell dargestellt und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen als schwarze gestrichelte Linien. Die Positionen der entsprechenden Aminosäuren sind jeweils in Bezug auf das native OdhI (143 AS) bzw. OdhA (1221 AS) angegeben.

Wie erwähnt lagert sich durch Phosphorylierung von Odhl an Thr-15 der Phospho-Threoninrest (pThr-15) mit den umliegenden Aminosäuren Val-12 bis Phe-18 an die Phosphopeptid-Bindestelle an. Der Phenylalaninrest 18 befindet sich dabei in Odhl an der +3-Position (pT+3) bezogen auf pThr-15. Diese Position spielt eine wichtige Rolle für die selektive Erkennung von Phosphopeptiden durch FHA-Domänen (Liang *et al.*, 2008). Zusätzlich bewirkt die Phosphorylierung auch die Ausbildung einer α -Helix in der aminoterminalen Peptidkette im Bereich von Ala-20 bis Ser-29. Diese Helix steht in Wechselwirkung mit Tyr-111 und Pro-116 abseits der Phosphopeptid-Bindestelle (Barthe *et al.*, 2009). In den Derivaten von Odhl Δ 43 mit ausgetauschten Tyr-111 und Arg-117 fehlen jedoch die aminoterminalen 43 Aminosäuren. Vor diesem Hintergrund besteht die Möglichkeit, dass Tyr-111 und Arg-117 einen direkten Einfluss auf die Bindung mit OdhA haben und nicht nur eine Rolle für die Bindung des N-Terminus von Odhl spielen. Tatsächlich zeigt das in Abbildung 4.3 dargestellte Interaktionsmodell die direkte Interaktion von Tyr-111 und Arg-117 in Odhl mit OdhA. In diesem Modell, welches auch die Daten zum *cross-link* zwischen Glu-472 in OdhA und Asp-126 in Odhl berücksichtigt, ist zur Vereinfachung lediglich ein Odhl Δ 43-Molekül im Komplex mit dem Dimer von OdhA Δ 395 gezeigt. Die Interaktion erfolgt über mögliche Wasserstoffbrücken zwischen Tyr-111 von Odhl (im Modell rot) und His-404 des grau-gefärbten OdhA-Monomers. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen liegen zwischen Arg-117 von Odhl und Asp-460 und Asp-462 des blau-gefärbten zweiten OdhA-Monomers vor. Diese Interaktion könnte zusätzlich durch Salzbrücken z. B. zwischen Glu-432 des OdhA-Monomers (blau) und Arg-53 von Odhl oder auch Arg-730 und Glu-98 derselben Moleküle stabilisiert werden. Zusammengefasst bekräftigen die experimentellen Befunde das in Abbildung 4.1 dargestellte *docking*-Modell von Odhl und OdhA.

Literaturverzeichnis

Abe S, Takayama KI, Kinoshita S (1967) Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *Journal of General and Applied Microbiology* **13**: 279-301

Allen AG, Perham RN, Allison N, Miles JS, Guest JR (1989) Reductive acetylation of tandemly repeated lipoyl domains in the pyruvate-dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli* is random order. *Journal of Molecular Biology* **208**: 623-633

Barthe P, Roumestand C, Canova MJ, Kremer L, Hurard C, Molle V, Cohen-Gonsaud M (2009) Dynamic and structural characterization of a bacterial FHA protein reveals a new autoinhibition mechanism. *Structure* **17**: 568-578

Belanger AE, Hatfull GF (1999) Exponential-phase glycogen recycling is essential for growth of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **181**: 6670-6678

Bensadoun A, Weinstein D (1976) Assay of proteins in presence of interfering materials. *Analytical Biochemistry* **70**: 241-250

Berg A, Vervoort J, de Kok A (1996) Solution structure of the lipoyl domain of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex from *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Biology* **261**: 432-442

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**: 293-300

Bhowruth V, Alderwick LJ, Brown AK, Bhatt A, Besra GS (2008) Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochemical Society Transactions* **36**: 555-565

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**: 1513-1523

Bott M (2007) Offering surprises: TCA cycle regulation in *Corynebacterium glutamicum*. *Trends in Microbiology* **15**: 417-425

Bott M, Niebisch A (2003) The respiratory chain of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Biotechnology* **104**: 129-153

Boulahya K-A, Guedon E, Delaunay S, Schultz C, Boudrant J, Bott M, Goergen J-L (2010) OdhI dephosphorylation kinetics during different glutamate production processes involving *Corynebacterium glutamicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **87**: 1867-1874

Burkovski A (2005) Nitrogen Metabolism and its regulation. In Eggeling L, Bott M, Handbook of *Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, pp 241-273

Bussmann M, Baumgart M, Bott M (2010) RosR (Cg1324), a hydrogen peroxide-sensitive MarR-type transcriptional regulator of *Corynebacterium glutamicum*. *J Biol Chem* **285**: 29305-29318

- Chami M, Bayan N, Dedieu JC, Leblon G, Shechter E, Gulik-Krzywicki T (1995)** Organization of the outer layers of the cell envelope of *Corynebacterium glutamicum* - a combined freeze-etch electron microscopy and biochemical study. *Biology of the Cell* **83**: 219-229
- Creaghan IT, Guest JR (1972)** Amber mutants of alpha-ketoglutarate dehydrogenase gene of *Escherichia coli* K12. *Journal of General Microbiology* **71**: 207-220
- Cremer J, Eggeling L, Sahm H (1990)** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Molecular and General Genetics* **220**: 478-480
- de Carvalho LPS, Zhao H, Dickinson CE, Arango NM, Lima CD, Fischer SM, Ouerfelli O, Nathan C, Rhee KY (2010)** Activity-based metabolomic profiling of enzymatic function: Identification of Rv1248c as a mycobacterial 2-hydroxy-3-oxoadipate synthase. *Chemistry & Biology* **17**: 323-332
- de Kok A, Hengeveld AF, Martin A, Westphal AH (1998)** The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex from gram-negative bacteria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**: 353-366
- Dobson CM (2003)** Protein folding and misfolding. *Nature* **426**: 884-890
- Durocher D, Henckel J, Fersht AR, Jackson SP (1999)** The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif. *Molecular Cell* **4**: 387-394
- Durocher D, Jackson SP (2002)** The FHA domain. *FEBS Lett* **513**: 58-66
- Durocher D, Taylor IA, Sarbassova D, Haire LF, Westcott SL, Jackson SP, Smerdon SJ, Yaffe MB (2000a)** The molecular basis of FHA domain: Phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Molecular Cell* **6**: 1169-1182
- Eggeling L, Bott M (2005)** *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press
- Eikmanns BJ (2005)** Central metabolism: tricarboxylic acid cycle and anaplerotic reactions. In Eggeling L, Bott M, *Handbook of Corynebacterium glutamicum*. CRC Press, pp 241-273
- Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H (1991)** A family of *Corynebacterium glutamicum*/*Escherichia coli* shuttle vectors for cloning, controlled gene-expression and promoter probing. *Gene* **102**: 93-98
- England P, Wehenkel A, Martins S, Hoos S, Andre-Leroux G, Villarino A, Alzari PM (2009)** The FHA-containing protein GarA acts as a phosphorylation-dependent molecular switch in mycobacterial signaling. *FEBS Lett* **583**: 301-307
- Frank RA, Price AJ, Northrop FD, Perham RN, Luisi BF (2007)** Crystal structure of the E1 component of the *Escherichia coli* 2-oxoglutarate dehydrogenase multienzyme complex. *J Mol Biol* **368**: 639-651
- Frunzke J, Engels V, Hasenbein S, Gaetgens C, Bott M (2008)** Co-ordinated regulation of gluconate catabolism and glucose uptake in *Corynebacterium glutamicum* by two functionally equivalent transcriptional regulators, GntR1 and GntR2. *Mol Microbiol* **67**: 305-322

Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D (1990) Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 4645-4649

Guest JR, Creaghan IT (1973) Gene-protein relationships of the α -ketoacid dehydrogenase complexes of *Escherichia coli* K12: Isolation and characterization of lipoamide dehydrogenase mutants. *Journal of General Microbiology* **75**: 197-210

Guest JR, Lewis HM, Graham LD, Packman LC, Perham RN (1985) Genetic reconstruction and functional analysis of the repeating lipoyl domains in the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* **185**: 743-754

Hanahan (1985) Techniques for transformation of *Escherichia coli*. *DNA cloning 1*, pp., Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford: 109-136

Hanahan D (1983) Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *Journal of Molecular Biology* **166**: 557-580

Henning U, Herz C (1964) Ein Strukturgen-Komplex für den Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex von *Escherichia coli* K 12. *Zeitschrift für Vererbungslehre* **95**: 260-275

Herbert AA, Guest JR (1969) Studies with α -ketoglutarate dehydrogenase mutants of *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* **105**: 182-190

Hermanson GT (1996) *Bioconjugate techniques*. Academic Press

Hochuli E (1988) Large-scale chromatography of recombinant proteins. *Journal of Chromatography* **444**: 293-302

Hoffelder M, Raasch K, van Ooyen J, Eggeling L (2010) The E2 domain of OdhA of *Corynebacterium glutamicum* has succinyltransferase activity dependent on lipoyl residues of the acetyltransferase AceF. *J Bacteriol* **192**: 5203-5211

Hoffmann C, Leis A, Niederweis M, Plitzko JrM, Engelhardt H (2008) Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**: 3963-3967

Hofmann K, Bucher P (1995) The FHA domain: a putative nuclear signaling domain found in protein kinases and transcription factors. *Trends in Biochemical Sciences* **20**: 347-349

Ikeda M, Nakagawa S (2003) The *Corynebacterium glutamicum* genome: features and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology* **62**: 99-109

Jager W, Schafer A, Puhler A, Labes G, Wohlleben W (1992) Expression of the *Bacillus subtilis* *sacB* gene leads to sucrose sensitivity in the Gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum* but not in *Streptomyces lividans*. *Journal of Bacteriology* **174**: 5462-5465

Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M, Huthmacher K, Kramer R, Linke B, McHardy AC, Meyer F, Mockel B, Pfefferle W, Puhler A, Rey DA, Ruckert C, Rupp O, Sahm H, Wendisch VF, Wiegrabe I, Tauch A (2003) The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *Journal of Biotechnology* **104**: 5-25

Kawahara Y, TakahashiFuke K, Shimizu E, Nakamatsu T, Nakamori S (1997) Relationship between the glutamate production and the activity of 2-oxoglutarate dehydrogenase in *Brevibacterium lactofermentum*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **61**: 1109-1112

Keilhauer C, Eggeling L, Sahm H (1993) Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum* - Molecular analysis of the *llvb-llvn-llvc* operon. *Journal of Bacteriology* **175**: 5595-5603

Kinoshita S, Udaka S, Shimono M (1957) Studies on the amino acid fermentation, production of L-glutamic acid by various microorganisms. *Journal of General and Applied Microbiology* **50**: 331-343

Kobe B, Kampmann T, Forwood JK, Listwan P, Brinkworth RI (2005) Substrate specificity of protein kinases and computational prediction of substrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* **1754**: 200-209

Krawczyk S, Raasch K, Schultz C, Hoffelder M, Eggeling L, Bott M (2010) The FHA domain of OdhI interacts with the carboxyterminal 2-oxoglutarate dehydrogenase domain of OdhA in *Corynebacterium glutamicum*. *FEBS Lett* **584**: 1463-1468

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685

Leger J, Kempf M, Lee G, Brandt R (1997) Conversion of serine to aspartate imitates phosphorylation-induced changes in the structure and function of microtubule-associated protein tau. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 8441-8446

Leitner A, Walzthoeni T, Kahraman A, Herzog F, Rinner O, Beck M, Aebersold R (2010) Probing native protein structures by chemical cross-linking, mass spectrometry and bioinformatics. *Molecular & Cellular Proteomics*

Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K (2005) Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **69**: 1-8

Lewis GP, Mcmartin C, Yates C (1970) An amino-acid receptor in guinea-pig ileum. *British Journal of Pharmacology* **39**: 213-215

Liang XY, Van Doren SR (2008) Mechanistic insights into phosphoprotein-binding FHA domains. *Accounts of Chemical Research* **41**: 991-999

McPherson A (1985a) Crystallization of macromolecules: general principles. *Methods Enzymol* **114**: 112-120

McPherson A (1985b) Crystallization of proteins by variation of pH or temperature. *Methods Enzymol* **114**: 125-127

McPherson A (1999) *Crystallization of biological macromolecules*. Vol I. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Menkel E, Thierbach G, Eggeling L, Sahm H (1989) Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 684-688

Milne JLS, Shi D, Rosenthal PB, Sunshine JS, Domingo GJ, Wu XW, Brooks BR, Perham RN, Henderson R, Subramaniam S (2002) Molecular architecture and mechanism of an icosahedral pyruvate dehydrogenase complex: a multifunctional catalytic machine. *Embo Journal* **21**: 5587-5598

Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350

Murphy GE, Jensen GJ (2005) Electron cryotomography of the *E. coli* pyruvate and 2-oxoglutarate dehydrogenase complexes. *Structure* **13**: 1765-1773

Nakamura J, Hirano S, Ito H, Wachi M (2007) Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 gene, encoding a mechanosensitive channel homolog, induce L-glutamic acid production. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4491-4498

Napper S, Anderson JW, Georges F, Quail JW, Delbaere LTJ, Waygood EB (1996) Mutation of serine-46 to aspartate in the histidine-containing protein of *Escherichia coli* mimics the inactivation by phosphorylation of serine-46 in HPrs from gram-positive bacteria. *Biochemistry* **35**: 11260-11267

Nemeria N, Yan Y, Zhang Z, Brown AM, Arjunan P, Furey W, Guest JR, Jordan F (2001) Inhibition of the *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex E1 subunit and its tyrosine 177 variants by thiamin 2-thiazolone and thiamin 2-thiothiazolone diphosphates. Evidence for reversible tight-binding inhibition. *J Biol Chem* **276**: 45969-45978

Neveling U, Bringer-Meyer S, Sahm H (1998) Gene and subunit organization of bacterial pyruvate dehydrogenase complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **1385**: 367-372

Niebisch A, Kabus A, Schultz C, Weil B, Bott M (2006) Corynebacterial protein kinase G controls 2-oxoglutarate dehydrogenase activity via the phosphorylation status of the OdhI protein. *J Biol Chem* **281**: 12300-12307

Nott TJ, Kelly G, Stach L, Li JJ, Westcott S, Patel D, Hunt DM, Howell S, Buxton RS, O'Hare HM, Smerdon SJ (2009) An intramolecular switch regulates phosphoindependent FHA domain interactions in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science Signaling* **2**: ra12

O'Hare HM, Duran R, Cervenansky C, Bellinzoni M, Wehenkel AM, Pritsch O, Obal G, Baumgartner J, Vialaret J, Johnsson K, Alzari PM (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* **70**: 1408-1423

Packman LC, Hale G, Perham RN (1984a) Repeating functional domains in the pyruvate-dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli*. *Embo Journal* **3**: 1315-1319

Packman LC, Perham RN (1986) Chain folding in the dihydrolipoyl acyltransferase components of the 2-oxo-acid dehydrogenase complexes from *Escherichia coli*: Identification of a segment involved in binding the E3 subunit. *FEBS Letters* **206**: 193-198

Pallen M, Chaudhuri R, Khan A (2002) Bacterial FHA domains: neglected players in the phosphothreonine signalling game? *Trends in Microbiology* **10**: 556-563

Pascual C, Lawson PA, Farrow JAE, Gimenez MN, Collins MD (1995) Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16s ribosomal-RNA gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**: 724-728

Perham RN (1991) Domains, motifs and linkers in 2-oxo acid dehydrogenase multienzyme complexes: a paradigm in the design of a multifunctional protein. *Biochemistry* **30**: 8501-8512

Perham RN (2000) Swinging arms and swinging domains in multifunctional enzymes: Catalytic machines for multistep reactions. *Annual Review of Biochemistry* **69**: 961-1004

Phillips RM (1999) Inhibition of DT-diaphorase (NAD(P)H : quinone oxidoreductase, EC 1.6.99.2) by 5,6-dimethylxanthenone-4-acetic acid (DMXAA) and flavone-8-acetic acid (FAA): Implications for bioreductive drug development. *Biochemical Pharmacology* **58**: 303-310

Reed LJ (1974) Multienzyme complexes. *Accounts of Chemical Research* **7**: 40-46

Rinner O, Seebacher J, Walzthoeni T, Mueller L, Beck M, Schmidt A, Mueller M, Aebersold R (2008) Identification of cross-linked peptides from large sequence databases. *Nature Methods* **5**: 748-748

Russell GC, Machado RS, Guest JR (1992) Overproduction of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex of *Escherichia coli* and site-directed substitutions in the E1p and E2p subunits. *Biochemical Journal* **287**: 611-619

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Ed 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467

Schafer A, Tauch A, Jager W, Kalinowski J, Thierbach G, Puhler A (1994) Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids Pk18 and Pk19 - Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73

Schreiner ME, Fiur D, Holatkoj J, Patek M, Eikmanns BJ (2005) E1 enzyme of the pyruvate dehydrogenase complex in *Corynebacterium glutamicum*: Molecular analysis of the gene and phylogenetic aspects. *Journal of Bacteriology* **187**: 6005-6018

Schultz C, Niebisch A, Gebel L, Bott M (2007) Glutamate production by *Corynebacterium glutamicum*: dependence on the oxoglutarate dehydrogenase inhibitor protein OdhI and protein kinase PknG. *Appl Microbiol Biotechnol* **76**: 691-700

Schultz C, Niebisch A, Schwaiger A, Viets U, Metzger S, Bramkamp M, Bott M (2009) Genetic and biochemical analysis of the serine/threonine protein kinases PknA, PknB, PknG and PknL of *Corynebacterium glutamicum*: evidence for non-essentiality and for phosphorylation of OdhI and FtsZ by multiple kinases. *Mol Microbiol* **74**: 724-741

Schwinde JW, Hertz PF, Sahm H, Eikmanns BJ, Guyonvarch A (2001) Lipoamide dehydrogenase from *Corynebacterium glutamicum*: molecular and physiological analysis of the *lpd* gene and characterization of the enzyme. *Microbiology-Sgm* **147**: 2223-2231

Shiio I, Ujigawatakeda K (1980) Presence and regulation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex in a glutamate-producing bacterium, *Brevibacterium flavum*. *Agricultural and Biological Chemistry* **44**: 1897-1904

Shingu H, Terui G (1972) Studies on process of glutamic-acid fermentation at enzyme level: 1. Changes of alpha-ketoglutaric-acid dehydrogenase in course of culture. *Journal of Fermentation Technology* **49**: 400-405

Sinz A (2006a) Chemical cross-linking and mass spectrometry to map three-dimensional protein structures and protein-protein interactions. *Mass Spectrometry Reviews* **25**: 663-682

Sinz A, Ihling C, Schmidt A, Kalkhof S, Schulz DM, Stingl C, Mechtler K, Haack M, Beck-Sickingher AG, Cooper DMF (2006b) Isotope-labeled cross-linkers and Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structural analysis of a protein/peptide complex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **17**: 1100-1113

Skerra A, Schmidt TGM (2000) Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. In *Methods in enzymology*, Vol 326. Academic Press INC, pp 271-304

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* **150**: 76-85

Stackebrandt E, Rainey FA, L. W-RN (1997) Proposal of a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. . *Int J Syst Bacteriol* **47**: 479-491

Tauch A, Kirchner O, Löffler B, Gotker S, Puhler A, Kalinowski J (2002) Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Current Microbiology* **45**: 362-367

Tian J, Bryk R, Shi SP, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan C (2005a) *Mycobacterium tuberculosis* appears to lack α -ketoglutarate dehydrogenase and encodes pyruvate dehydrogenase in widely separated genes. *Molecular Microbiology* **57**: 859-868

Tian J, Bryk R, Itoh M, Suematsu M, Nathan C (2005b) Variant tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium tuberculosis*: Identification of α -ketoglutarate decarboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 10670-10675

Usuda Y, Tujimoto N, Abe C, Asakura Y, Kimura E, Kawahara Y, Kurahashi O, Matsui H (1996) Molecular cloning of the *Corynebacterium glutamicum* ('*Brevibacterium lactofermentum*' AJ12036) *odhA* gene encoding a novel type of 2-oxoglutarate dehydrogenase. *Microbiology-Uk* **142**: 3347-3354

van der Rest ME, Lange C, Molenaar D (1999) A heat shock following electroporation induces highly efficient transformation of *Corynebacterium glutamicum* with xenogeneic plasmid DNA. *Applied Microbiology and Biotechnology* **52**: 541-545

Villarino A, Duran R, Wehenkel A, Fernandez P, England P, Brodin P, Cole ST, Zimny-Arndt U, Jungblut PR, Cervenansky C, Alzari PM (2005) Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J Mol Biol* **350**: 953-963

Wagner T, Bellinzoni M, Wehenkel A, O'Hare Helen M, Alzari Pedro M (2011) Functional plasticity and allosteric regulation of α -ketoglutarate decarboxylase in central mycobacterial metabolism. *Chemistry & Biology* **18**: 1011-1020

Wallis NG, Perham RN (1994) Structural dependence of posttranslational modification and reductive acetylation of the lipoyl domain of the pyruvate dehydrogenase multienzyme complex. *Journal of Molecular Biology* **236**: 209-216

White RH, Bleile DM, Reed LJ (1980) Lipoic acid content of dihydrolipoyl transacylases determined by isotope-dilution analysis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **94**: 78-84

Yeaman SJ (1989) The 2-oxo acid dehydrogenase complexes: Recent advances. *Biochemical Journal* **257**: 625-632

Zamenhof PJ, Villarejo M (1972) Construction and properties of *Escherichia coli* strains exhibiting complementation of galactosidase fragments *in vivo*. *J Bacteriol* **110**: 171-178

Zhou ZH, McCarthy DB, O'Connor CM, Reed LJ, Stoops JK (2001) The remarkable structural and functional organization of the eukaryotic pyruvate dehydrogenase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 14802-14807

Zuber B, Chami M, Houssin C, Dubochet J, Griffiths G, Daffe M (2008) Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state. *Journal of Bacteriology* **190**: 5672-5680

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Michael Bott für die Überlassung des interessanten Themas, die Übernahme des Hauptreferates und für das Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Frau Prof. Dr. Martina Pohl danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Lothar Eggeling für die stets enthusiastische Diskussionsbereitschaft und die ansteckende Begeisterung für die vorliegende wissenschaftliche Arbeit, sowie für die gesamte Unterstützung während der vergangenen Jahre.

Herrn Dr. Jörg Labahn danke ich für die Möglichkeit alle Kristallisationsarbeiten im ICS-6 durchführen zu können und für all seine Unterstützung und Geduld.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der AG Eggeling und zwar Karin, Helga, Laure, Ramon, Jens S, Jan van, Jan M, Christina, Tina, Martin, Toni, Kristina, Stephan, Georg, Hoffi, Philana und Sabrina für die große Hilfsbereitschaft in allen Bereichen, die freundschaftliche Atmosphäre und für die unterhaltsamen Kaffee- und Mittagspausen.

Ganz besonders herzlich danke ich Melanie, Jens N und vor allem Norma für die grandiose und unvergessliche Zeit. Man merkt immer erst im Nachhinein wie sehr jemand einem tatsächlich ans Herz gewachsen ist, aber zum Glück gibt es ja für die nächsten Jahre das Oishii.

Ein weiterer Dank gilt auch Sandra für das entspannte Rollern und die anschließenden Kaffeegespräche, Meike für die Motivations- und alle anderen Hilfen sowie Sabine, Christian und Graziella für die angenehme, unkomplizierte und produktive Zusammenarbeit.

Von ganzem Herzen danke ich Ralph für seine bedingungslose Liebe, Unterstützung und Geduld während der vergangenen Jahre und insbesondere in den letzten Monaten.

Abschließend und besonders herzlich danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Annika, dass sie immer für mich da waren und es auch immer sein werden. Danke für all die aufbauenden Telefongespräche, die Motivation und Hilfe, aber vor allem Danke für eure uneingeschränkte Unterstützung und Liebe.

1. **Methoden zur integrierten Analyse metabolischer Netzwerke unter stationären und instationären Bedingungen**
von S. A. Wahl (2008), 245 Seiten
ISBN: 978-3-89336-506-7
2. **Strukturelle Untersuchungen an membranassoziierten Proteinen: NMR-Strukturen des HIV-1 Virus Protein U (39-81) und des humanen CD4 (372-433)**
von M. Wittlich (2008), XVIII, 185 Seiten
ISBN: 978-3-89336-510-4
3. **Identifizierung von physiologischen und artifiziellen Liganden von GA-BARAP und Charakterisierung der resultierenden Interaktionen**
von J. Mohrlüder (2008), V, 158 Seiten
ISBN: 978-3-89336-511-1
4. **Struktur und Funktion von Transaminasen aus *Corynebacterium glutamicum***
von J. Marienhagen (2008), VI, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-512-8
5. **Implementierung eines Funk-Protokolls (IEEE 802.15.4) und Entwicklung eines adaptiven Zeitsynchronisationsverfahrens für ein Netzwerk intelligenter und autarker Sensoren**
von M. Schlösser (2008), 77 Seiten
ISBN: 978-3-89336-519-7
6. **Etablierung und Optimierung der sekretorischen Gewinnung thermostabiler Lipasen in Gram-positiven Bakterien**
von H. Brundiek (2008), VIII, 154 Seiten
ISBN: 978-3-89336-520-3
7. **Visuospatial Attention: Neural Correlates and Pharmacological Modulation in Healthy Subjects and Patients with Spatial Neglect**
by S. Vossel (2008), XIV, 176 pages
ISBN: 978-3-89336-526-5
8. **Analyse des Substratspektrums der ClpCP-Protease aus *Corynebacterium glutamicum***
von J.-E. Schweitzer (2008), V, 130 Seiten
ISBN: 978-3-89336-528-9
9. **Adaptive Verfahren zur automatischen Bildverbesserung kernspintomographischer Bilddaten als Vorverarbeitung zur Segmentierung und Klassifikation individueller 3D-Regionen des Gehirns**
von J. Castellanos (2008), VI, 100 Seiten
ISBN: 978-3-89336-539-5

10. **Posttranslationale Regulation der 2-Oxoglutarat-Dehydrogenase in *Corynebacterium glutamicum***
von C. Schultz (2009), VII, 151 Seiten
ISBN: 978-3-89336-560-9
11. **MtrA, ein bifunktionaler Antwortregulator aus *Corynebacterium glutamicum***
von M. Brocker (2009), VI, 125 Seiten
ISBN: 978-3-89336-561-6
12. **Strukturelle Charakterisierung von GABRAP-Ligand-Interaktionen**
von Y. Thielmann (2009), 166 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-563-0
13. **Acceleration on an image reconstruction algorithm for Positron Emission Tomography using a Graphics Processing Unit**
by T. Felder (2009), 97 pages
ISBN: 978-3-89336-566-1
14. **NMR-Lösungsstruktur der Loopregion Tyr⁶⁷ - Leu⁷⁷ des visuellen Arrestins im Komplex mit photoaktiviertem Rhodopsin**
von S. Feuerstein (2009), XVI, 140 Seiten
ISBN: 978-3-89336-571-5
15. **Development of a Process for the Cleavage of a Mucin Fusion Protein by Enterokinase**
by T. Kubitzki (2009), IV, 133 pages
ISBN: 978-3-89336-575-3
16. **Children's health and RF EMF exposure**
project coord. P. Wiedemann (2009), 49 pages
ISBN: 978-3-89336-594-4
17. **Entwicklung einer Signalerfassungselektronik für eine Halbleiter-Photomultiplier (SiPM) Matrix**
von C. Parl (2009), IV, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-595-1
18. **Medienorientierung biomedizinischer Forscher im internationalen Vergleich**
Die Schnittstelle von Wissenschaft & Journalismus und ihre politische Relevanz
herausg. von H. P. Peters (2009), 364 Seiten
ISBN: 978-3-89336-597-5
URN: urn:nbn:de: 0001-00542

19. **Identifizierung von Interaktionspartnern für HIV-1 Nef und ihre potentielle Relevanz bei der Entwicklung der HIV-assoziierten Demenz**
von J. Mötter (2010), VI, 172 Seiten
ISBN: 978-3-89336-604-0
20. **Biotransformationen mit Cytochrom P450 Monooxygenasen**
von D. Zehentgruber (2010), XI, 147 Seiten
ISBN: 978-3-89336-605-7
21. **Studies on central carbon metabolism and respiration of *Gluconobacter oxydans* 621H**
by T. Hanke (2010), 120 pages
ISBN: 978-3-89336-607-1
22. **Prozessentwicklung zur Produktion von 2-Keto-L-Gulonsäure, einer Vitamin C- Vorstufe**
von B. Osterath (2010), XXI, 213 Seiten
ISBN: 978-3-89336-612-5
23. **Visuell evozierte Antworten der corticalen Areale V1/V2 und V5/MT nach Schachbrettmusterumkehrreizung – Magnetenzecephalographische Untersuchungen in Kombination mit cytoarchitektonischen Wahrscheinlichkeitskarten**
von B. U. Barnikol (2010), III, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-615-6
24. **Biochemische und regulatorische Analyse des TCA-Zyklus und Glyoxylat-Shunts in *Escherichia coli***
von M. Kunze (2010), 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-620-0
25. **Metabolomanalyse als Grundlage für ¹³C-Stoffflussanalyse und dynamischer Modellierung am Beispiel der Lysinbiosynthese**
von M. G. Wellerdiek (2010), xvi, 182 Seiten
ISBN: 978-3-89336-621-7
26. **Neue Thiamindiphosphat-abhängige Enzyme für die Synthese enantiokomplementärer 2-Hydroxyketone**
von G. Kolter (2010), IX, 168 Seiten
ISBN: 978-3-89336-626-2
27. **Genetische Analyse von Substrat-Translokase-Wechselwirkungen bei der Tat-abhängigen Proteintranslokation in *Escherichia coli***
von F. Lausberg (2010), 174 Seiten
ISBN: 978-3-89336-628-6
28. **Silicium Nanodrähte für die extrazelluläre Ableitung elektrischer Aktivität**
von J. F. Eschermann (2010), xii, 191 Seiten
ISBN: 978-3-89336-639-2

29. **Causality measures between neural signals from invasively and non-invasively obtained local field potentials in humans**
by E. Florin (2010), xxix, 220 pages
ISBN: 978-3-89336-646-0
30. **Regulatory and metabolic aspects of the phosphate starvation response of *Corynebacterium glutamicum***
by H. M. Woo (2010), III, 111 pages
ISBN: 978-3-89336-664-4
31. **Ligand interaction analysis of membrane-anchored proteins**
by J. Glück (2010) VIII, 87 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-683-5
32. **Novel insights into characteristics, relevance, and regulation of corynebacterial aconitase**
by M. Baumgart (2010), V, 147 pages
ISBN: 978-3-89336-682-8
33. **Investigation of GABARAP complexes with apoptosis-related proteins and structural characterization of GABARAP lipidation**
by P. Ma (2011), VI, 139 pages (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-699-6
34. **GABARAP-artige Proteine, Nix und Bcl-2: Strukturelle Basis molekularer Interaktionen an der Schnittstelle zwischen Autophagie und Apoptose**
von M. Schwarten (2011), VIII, 164 Seiten (getr. pag.)
ISBN: 978-3-89336-700-9
35. **Einflussfaktoren auf die Stabilität und Aktivität der Benzaldehydlyase aus *Pseudomonas fluorescens* in Carboligasereaktionen mit aromatischen Aldehyden**
von M. Schwarz (2011), XI, 176 Seiten
ISBN: 978-3-89336-701-6
36. **Untersuchungen zur Bildung von D-Aminosäuren mit *Corynebacterium glutamicum***
von N. C. Stäbler (2011), VIII, 104 Seiten
ISBN: 978-3-89336-702-3
37. **Charakterisierung von Wirkstoffen für die Diagnose und Therapie von Morbus Alzheimer**
von D. Bartnik (2011), XII, 105 Seiten
ISBN: 978-3-89336-703-0
38. **Identifizierung und Charakterisierung von Regulatoren der Acyl-CoA Carboxylasen in *Corynebacterium glutamicum***
von J. Nickel (2011), IV, 127 Seiten
ISBN: 978-3-89336-712-2

39. **Metabolische ^{13}C -Stoffflussanalyse vom isotopisch stationären zum instationären Fall**
von K. Grönke (2011), getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-713-9
40. **Enzyme supported crystallization of chiral amino acids**
by K. Würges (2011), XI, getr. pag.
ISBN: 978-3-89336-715-3
41. **Systemische Analyse des Citratzyklus in *Corynebacterium glutamicum***
von J. van Ooyen (2011), 116 Seiten
ISBN: 978-3-89336-731-3
42. **Einfluss intrazellulärer Nukleotid-Cofaktoren auf Redoxreaktionen in rekombinanten Ganzellsystemen**
von D. Minör (2011), XII, 138 Seiten
ISBN: 978-3-89336-737-5
43. **Development of ^{18}F -labelled radioligands for molecular imaging of the dopamine D4 receptor**
by F. Kügler (2011), xiv, 161 pages
ISBN: 978-3-89336-738-2
44. **Personalisierte Medizin im Gesundheitssystem der Zukunft. Einflussfaktoren und Szenarien**
von C.R. Karger, B. Hüsing (2011), viii, 99 Seiten
ISBN: 978-3-89336-743-6
45. **Charakterisierung von Proteinen einer neuartigen Signaltransduktionskaskade in *Corynebacterium glutamicum***
von G. Bosco (2011), V, 128 Seiten
ISBN: 978-3-89336-754-2
46. **CopRS and CsoR: two regulatory systems involved in copper homeostasis of *Corynebacterium glutamicum***
by S. V. Schelder (2012), IV, 90 pages
ISBN: 978-3-89336-761-0
47. **Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for efficient succinate production**
by B. O. Litsanov (2012), III, 105 pages
ISBN: 978-3-89336-762-7
48. **Der Oxoglutarat-Dehydrogenase-Komplex in *Corynebacterium glutamicum* und seine Interaktion mit Odhl**
von K. Raasch (2012), VI, 86 Seiten
ISBN: 978-3-89336-764-1



Gesundheit / Health
Band / Volume 48
ISBN 978-3-89336-764-1

