



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

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 elektrokompetenter <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 $_{\text{Strep}}\text{OdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$	64
3.5.3	Proteinkristallisation von $_{\text{Strep}}\text{OdhI}\Delta 43\text{-OdhA}\Delta 354$	66
3.5.4	Strukturmodell für $\text{OdhA}\Delta 354$	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