



Untersuchungen zur Komplexbildung von Enzymen des Citratzyklus in *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte
DISSERTATION

von
Dipl.-Ing. (FH) Tobias Jung

aus
Bensheim

KIT-Dekan: Prof. Dr. Willem Klopper

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Mack

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2016

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Die Rolle von Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle	3
1.2 Proteinkomplexe ermöglichen einen effizienten Substratumsatz durch <i>substrate channeling</i>	6
1.3 Der Einfluss des umgebenden Zellmilieus auf die Bildung von PPI.....	7
1.4 Organisation prokaryotischer Gene in einem Operon.....	9
1.5 Der Citratzyklus als Modell für interagierende Enzyme aus dem Primärmetabolismus	11
1.5.1 Citratsynthase	12
1.5.2 Isocitrat-Dehydrogenase	13
1.5.3 Malat-Dehydrogenase	14
1.5.4 Bekannte PPI von Enzymen des Citratzyklus.....	15
1.6 Ziele der Arbeit.....	16
2 Material	18
2.1 Laborgeräte.....	18
2.2 Enzyme, Chemikalien und Komplettsysteme.....	19
2.3 Bakterienstämme	21
2.4 Plasmide	22
2.5 Oligonukleotide.....	23
2.6 Nährmedien	26
2.7 Datenbanken und Programme.....	27
3 Methoden	28
3.1 Mikrobiologische Methoden	28
3.1.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> und <i>Bacillus subtilis</i>	28
3.1.2 Kryopräservierung von Mikroorganismen.....	29
3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen.....	29
3.1.4 Transformation	30
3.1.5 Konstruktion von Integrationsstämmen.....	31
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	32
3.2.1 Isolierung genomischer DNA und Plasmid-DNA.....	32
3.2.2 Polymerasekettenreaktion	32
3.2.3 Analytische Agarose-Gelelektrophorese.....	33
3.2.4 Gelextraktion von DNA-Fragmenten mittels Agarase.....	33
3.2.5 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten	33
3.2.6 Restriktionshydrolyse, Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA	34
3.2.7 Ligation	34
3.2.8 Mutagenese von Plasmiden	34
3.2.9 TOPO-Klonierung	34

3.3	Biochemische Methoden	35
3.3.1	Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	35
3.3.2	Reinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen mittels Strep-Tactin-Matrices	35
3.3.3	Pufferwechsel, Aufkonzentrierung sowie Konzentrations- bestimmung von Proteinlösungen	36
3.3.4	Analyse und Identifizierung von Proteinen mittels SDS-PAGE, Dot Blot und Western Blot	37
3.3.5	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels SPINE	39
3.3.6	Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Sulfo-SDAD und DTSSP	39
3.3.7	Größenausschlusschromatographie	40
3.3.8	Isotherme Titrationskalorimetrie.....	41
3.3.9	Enzymassays zur Aktivitätsbestimmung	41
4	Ergebnisse	45
4.1	Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von <i>B. subtilis</i> CitZ, Icd und Mdh	47
4.1.1	Proteinreinigung von CitZ, Icd und Mdh.....	47
4.1.2	CitZ und Mdh bilden bei Vernetzung mit DTSSP hochmolekulare Aggregate.....	48
4.1.3	CitZ, Icd und Mdh interagieren <i>in vitro</i> in zellfreiem Extrakt.....	51
4.1.4	Die Interaktion von CitZ und Mdh ist transient	53
4.2	Untersuchungen zur Aktivität der sequentiellen MDH/CS-Reaktion im Enzymkomplex	56
4.2.1	MDH ist bei der sequentiellen Reaktion limitierend.....	56
4.2.2	Die Aktivität des MDH/CS-Komplexes ist abhängig von der Konzentration der umgebenden Makromoleküle.....	57
4.2.3	Ein CS-MDH-Fusionsenzym zeigt keine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu den Einzelenzymen	60
4.3	Eine inaktive MDH fördert die Aktivität des CitZ-Icd-Mdh-Metabolons.....	63
4.4	Auswirkung der Genorganisation auf die PPI von CitZ, Icd und Mdh.....	70
4.5	Artifizielles <i>gltA-icd-mdh</i> -Operon in <i>Escherichia coli</i>	75
4.5.1	Auswirkungen des artifiziiellen Operons auf die PPI von GltA, Icd und Mdh.....	77
4.5.2	Einfluss eines Metabolons auf das Wachstumsverhalten.....	80
5	Diskussion	83
5.1	Der Einfluss eines Operons auf die Interaktion der Genprodukte.....	83
5.2	Ein Citratzyklus-Metabolon ist aktiver als frei diffundierende Enzyme.....	87
6	Literaturverzeichnis.....	92
7	Anhang.....	102
8	Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

α -KG	α -Ketoglutarat
Amp	Ampicillin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Cam	Chloramphenicol
CS	Citratsynthase
CV	Säulenvolumen (<i>column volumes</i>)
DTT	Dithiothreitol
FA	Formaldehyd
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
ICD	Isocitrat-Dehydrogenase
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
Kan	Kanamycin
MDH	Malat-Dehydrogenase
MM	Minimalmedium
MTP	Mikrotiterplatte
OAA	Oxalacetat (<i>oxaloacetic acid</i>)
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
SEC	Größenausschlusschromatographie (<i>size exclusion chromatography</i>)
SPINE	<i>strep-protein interaction experiment</i>

Zusammenfassung

Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sind von zentraler Bedeutung für eine Vielzahl biologischer Vorgänge auf zellulärer Ebene. Sie sind in der Lage, die kinetischen Eigenschaften eines Proteins sowie dessen Bindungsfähigkeit und Spezifität für Substrate und Effektormoleküle maßgeblich zu beeinflussen. Die direkte Weitergabe eines Stoffwechselintermediats zwischen den aktiven Zentren interagierender Enzyme (*substrate channeling*) stellt einen erheblichen Vorteil im Hinblick auf die effiziente Abwicklung von Stoffwechselprozessen dar. Diese Organisation von Enzymen ist insbesondere im makromolekular hochkonzentrierten und viskosen Cytoplasma von Bedeutung, da dort die Diffusion und damit die Verteilung der an einem Stoffwechselweg beteiligten Enzyme erschwert ist. Multienzymkomplexe bilden damit ein wichtiges Strukturelement für den Stoffwechsel einer Zelle. In Prokaryoten sind Gene, die für Enzyme eines Stoffwechselwegs codieren, häufig in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit (Operon) organisiert. Durch die koordinierte Expression mehrerer Gene bzw. durch die gleichzeitige Bildung der dazugehörigen Proteine am Ribosom kommt es zu einer Kolokalisation. Ob diese räumliche Nähe die Interaktion der Proteine fördert, wurde bislang noch nicht experimentell untersucht. Das Hauptziel dieser Arbeit war, diesen Zusammenhang am Beispiel von drei Enzymen des Zentralstoffwechsels aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), der Citratzyklus-Enzyme Citratsynthase (CS), Isocitrat-Dehydrogenase (ICD) und Malat-Dehydrogenase (MDH), näher zu untersuchen. Die Gene dieser drei Enzyme bilden in *B. subtilis* eine Transkriptionseinheit (*citZ-icd-mdh*). Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Interaktion dieser bakteriellen Enzyme einen Anstieg der Enzymaktivität bzw. eine Erhöhung der Umsatzrate bewirkt.

Die oben genannten Citratzyklus-Gene wurden heterolog in *Escherichia coli* (*E. coli*) exprimiert und die dazugehörigen Genprodukte wurden mittels Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Eine Interaktion der drei Modellenzyme konnte *in vitro* nachgewiesen werden, wobei dieser Nachweis nur in einer komplexen Umgebung mit hoher Makromolekülkonzentration (einem bakteriellen Zellysat) möglich war. Zudem wurde gezeigt, dass eine solche Umgebung einen positiven Einfluss auf die Enzymaktivität hat. Hinweise auf eine potentielle Aktivitätssteigerung interagierender Enzyme ergaben Enzymtests zur Charakterisierung der sequentiellen MDH/CS-Reaktion. Diese zeigten, dass bei Zugabe eines hohen Überschusses inaktiver MDH die Aktivität der sequentiellen MDH/CS-Reaktion im Vergleich zu einer Kontrolle erhöht ist. Der gleiche Effekt wurde bei der ICD

nachgewiesen, welche wie die inaktive MDH nicht an der MDH/CS-Reaktionskatalyse beteiligt ist. So führte ein 40-facher Überschuss an inaktiver MDH bzw. ICD zu aktivem Enzym zu einer Aktivitätserhöhung um 100 %. Dies ist wahrscheinlich auf die Rolle dieser Enzyme als strukturgebende Proteine im CS-ICD-MDH-Enzymkomplex zurückzuführen. Mit Hilfe einer Analyse von *B. subtilis*-Integrationsstämmen, die sich jeweils in der Lokalisierung der (rekombinanten) Gene *citZ*, *icd* und *mdh* unterscheiden, konnte eine Interaktion von Strep-CS mit ICD und MDH nur in dem Stamm nachgewiesen werden, in dem diese Gene in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit codiert sind. Damit ist der positive Effekt kotranslatierter Gene auf die Förderung der Interaktion der Genprodukte exemplarisch für das Citratzyklus-Operon *citZ-icd-mdh* in *B. subtilis* gezeigt.

1 Einleitung

1.1 Die Rolle von Protein-Protein-Interaktionen in der Zelle

Proteine haben, neben katalytischen Aufgaben, auch eine wichtige Rolle im Hinblick auf die strukturelle Organisation einer Zelle (Braun & Gingras, 2012). Die Analyse von Proteinen ist daher seit vielen Jahren Gegenstand der biologischen Forschung (Las Rivas & Fontanillo, 2010). Proteine arbeiten jedoch nur selten isoliert. Neben der physikalischen Interaktion von Proteinen mit anderen Biomolekülen wie niedermolekularen Metaboliten, Lipiden oder Nukleinsäuren sind Protein-Protein-Interaktionen (PPI) entscheidend für eine Vielzahl zellulärer Abläufe, wie DNA-Replikation, Transkription, Translation, Spleißen, Signaltransduktion und Intermediärstoffwechsel (Braun & Gingras, 2012; Phizicky & Fields, 1995). Die Interaktion mehrerer Untereinheiten eines Proteins (Oligomerisierung) ist ein wichtiges Beispiel für eine physiologische Notwendigkeit einer PPI, bekannte Beispiele sind die Quartärstruktur des Hämoglobins, die Organisation der RNA-Polymerase und die Topologie der Tryptophan-Synthase (siehe Abb. 1.1 auf Seite 4). Komplexere Zusammenlagerungen verschiedener Proteinuntereinheiten zeigen z. B. der Pyruvat-Dehydrogenase- sowie der α -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex (Phizicky & Fields, 1995). Die letztgenannten Autoren beschreiben fünf messbare Effekte, die zur Charakterisierung einer solchen Interaktion herangezogen werden können. Demnach können PPI (1) die kinetischen Eigenschaften eines Proteins verändern, (2) die direkte Weitergabe eines Intermediats zwischen aktiven Zentren ermöglichen (*substrate channeling*, siehe 1.2), (3) neue Bindestellen für Effektormoleküle schaffen, (4) ein Protein inaktivieren oder zerstören und (5) die Spezifität eines Proteins für sein Substrat ändern (Phizicky & Fields, 1995).

Die Gesamtheit aller PPI, die in einem Organismus gebildet werden können, wird als Interaktom bezeichnet (Cusick *et al.*, 2005). Die Analyse solch hochkomplexer Netzwerke von PPI ist ein wichtiger Bestandteil der aktuellen biologischen Forschung in einem ähnlichen Umfang, wie dies die Genom-Projekte als Triebkraft für die Molekularbiologie vor 20 Jahren waren (Las Rivas & Fontanillo, 2010). Die Analyse des Interaktoms hat, maßgeblich durch die Entwicklung moderner Hochdurchsatzverfahren getrieben, bereits wichtige Einblicke in die globale Organisation zellulärer Systeme ermöglicht (Braun & Gingras, 2012; Las Rivas & Fontanillo, 2010). Insbesondere die Molekularbiologie kann durch moderne Techniken zur Detektion von PPI profitieren, indem unbe-

kannte Genfunktionen durch Analyse von Interaktionen der Genprodukte mit bereits charakterisierten Proteinen aufgeklärt werden können (Werther & Seitz, 2008).

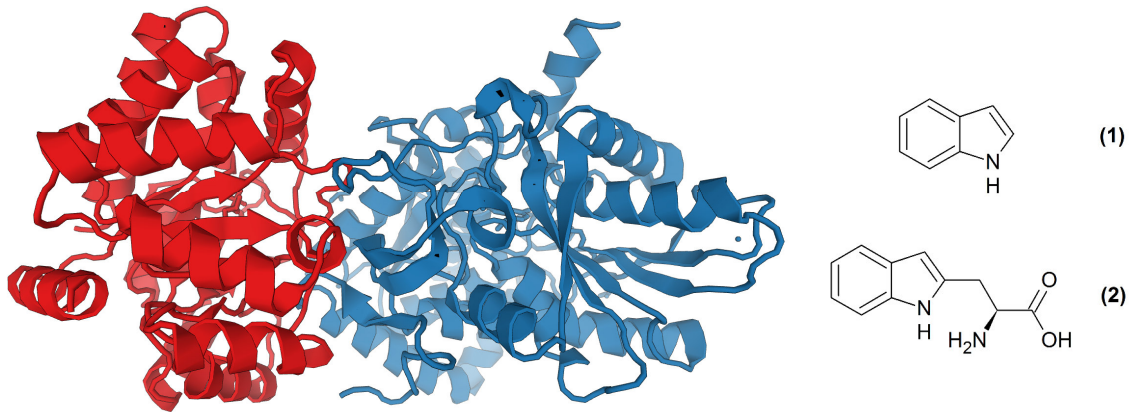


Abbildung 1.1: Bändermodell der dimeren $\alpha\beta$ -Untereinheit des $\alpha_2\beta_2$ -Tryptophan-Synthase-Tetramers aus *Salmonella enterica* als Beispiel einer Protein-Protein-Interaktion. Die aktiven Zentren der beiden Untereinheiten dieses Bienenzymkomplexes sind durch einen intramolekularen Tunnel verbunden, der einen direkten Transfer des Intermediats Indol (1) von der α -Untereinheit (rot) zum Ort der L-Tryptophan(2)-Synthese (β -Untereinheit, blau) ermöglicht (Ngo *et al.*, 2007; PDB Code: 2J9X; <http://www.rcsb.org>).

Entscheidend für die Bildung und Stabilisierung eines (nicht-kovalenten) Proteinkomplexes sind hydrophobe Interaktionen unpolarer Seitenketten (Chothia & Janin, 1975), die zu einer Reduzierung der Kontaktfläche mit dem wässrigen Milieu führen (hydrophober Effekt). Dies ist die Triebkraft bei einer räumlichen Annäherung und Bindung von zwei Proteinoberflächen, während die Spezifität durch deren Komplementarität erreicht wird. Dies bezieht sich nicht nur auf die Form der Kontaktflächen, sondern auch auf deren Ladungsverteilung und der daraus resultierenden elektrostatischen Anziehungskräfte, sowie auf die Ausbildung von Wasserstoffbrücken, Salzbrücken und van-der-Waals-Kräften (Jones & Thornton, 1995). Die Art einer PPI wird zumeist dadurch unterschieden, ob der resultierende Komplex permanent oder transient ist. Während permanente oder statische PPI durch eine starke, irreversible Bindung der Interaktionspartner gekennzeichnet sind, können transiente Proteinkomplexe aufgelöst und neu geformt werden, wobei hier nochmals zwischen starker und schwacher transienter Interaktion unterschieden wird (Perkins *et al.*, 2010). Permanente Interaktionen bestehen beispielsweise bei dem zuvor beschriebenen Hämoglobin oder der Tryptophan-Synthase, die dauerhaft als Komplex von mehreren Untereinheiten auftreten. Transiente PPI erfolgen nur, wenn bestimmte intrazelluläre Bedingungen vorliegen, die eine Interaktion auslösen oder begünstigen. Dies können Proteinmodifikationen (z. B. Phosphorylierung

oder Acetylierung), die Bindung eines Substrates oder Cofaktors oder das Vorhandensein einer bestimmten Konformation sein (Phizicky & Fields, 1995). Diese nicht permanenten Interaktionen kontrollieren eine Vielzahl an zellulären Prozessen und sind gekennzeichnet durch Dissoziationskonstanten im mikromolaren Bereich, während die meisten permanenten PPI hohe Bindungsaffinitäten mit einem K_D im nanomolaren Bereich aufweisen (Phizicky & Fields, 1995; Perkins *et al.*, 2010).

Die biochemischen Methoden zur Detektion von PPI sind vielfältig und müssen gegebenenfalls den untersuchten Zielproteinen angepasst werden. So eignet sich die klassische Aufreinigung von Proteinen mittels Affinitätschromatographie nur für permanente und nicht für transiente PPI, es sei denn die molekularen Komponenten, die die transiente Interaktion steuern, sind bekannt und gegenwärtig. Diese Methode wurde erstmals in den siebziger Jahren zur Detektion der Interaktion bakterieller und Phagen-Proteine mit verschiedenen Formen der *E. coli* RNA-Polymerase genutzt (Ratner, 1974). Die heute am häufigsten angewendeten Hochdurchsatz-Verfahren zur Identifizierung von Proteinkomplexen sind *two-hybrid*- sowie TAP(*tandem affinity purification*)-Verfahren (Williamson & Sutcliffe, 2010). Hierbei dient ein bekanntes Protein als Köder, mit dem die interagierenden (unbekannten) Zielproteine eingefangen und mit Hilfe weiterer biochemischer Methoden identifiziert und analysiert werden können (Las Rivas & Fontanillo, 2010). Dieses Konzept nutzen viele Methoden zur Bestimmung von PPI, wie zum Beispiel die Co-Immunopräzipitation. Immer häufiger werden zudem massenspektrometrische Methoden genutzt (Golemis & Adams, 2005). Mit Hilfe fluoreszenzbasierter Verfahren, wie dem Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) und der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) ist ein direkter Nachweis in lebenden Zellen möglich, was insbesondere den Vorteil bietet, die ansonsten schwer zugänglichen transienten Interaktionen *in vivo* nachweisen zu können (Golemis & Adams, 2005; Hu *et al.*, 2002). Dies ist ebenso unter Verwendung proteinvernetzender Agenzien, sog. Quervernetzern oder *crosslinkern* (Vasilescu *et al.*, 2004; Sutherland *et al.*, 2008), möglich, die transiente Interaktionen *in vivo* fixieren und damit gängigen Aufarbeitungstechniken zur Isolierung der Proteinkomplexe zugänglich machen. Dieses Konzept kommt zum Beispiel im *strep-protein interaction experiment* (SPINE) zum Einsatz (Herzberg *et al.*, 2007).

1.2 Proteinkomplexe ermöglichen einen effizienten Substratumsatz durch *substrate channeling*

Protein-Protein-Interaktionen spielen, wie zuvor beschrieben, im Metabolismus einer Zelle eine entscheidende Rolle. Die intrazellulären Konzentrationen von Enzymen übersteigen normalerweise die der zugehörigen Intermediärmetabolite, wodurch ein effizienter Stoffwechsel durch Dissoziation und zufälliger Diffusion der wenigen Stoffwechselprodukte in der wässrigen Umgebung zwischen den Enzymen nicht machbar wäre (Srivastava & Bernhard, 1986). Durch das sog. *substrate channeling* ist ein direkter Transfer der Intermediate zwischen den aktiven Zentren komplexierter Enzyme ohne Dissoziation in das Cytoplasma möglich (Milani *et al.*, 2003; siehe Abbildung 1.2). Viele zelluläre Reaktionen werden durch Multienzymkomplexe, und nicht durch frei diffundierende Enzyme, katalysiert (Conrado *et al.*, 2008). Solche Komplexe, die oft die Katalyse mehrerer Schritte eines Stoffwechselweges übernehmen, werden als Metabolon bezeichnet (Srere, 1985). In diesem Fall spricht man auch vom *metabolite channeling* (Zhang, 2011).

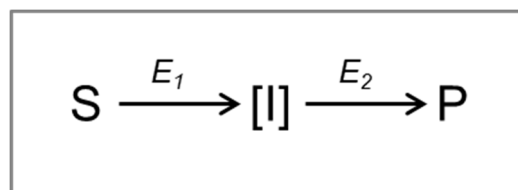


Abbildung 1.2: Graphische Illustration der Umwandlung eines Substrats (S) in ein Produkt (P) durch zwei Enzyme (E) bei direkter Weitergabe des Reaktionsintermediats (I) zwischen den beteiligten aktiven Zentren (*substrate channeling*).

Die Vorteile multifunktionaler Enzymkomplexe und dem dort stattfindenden *substrate channeling* liegen in (1) der Beschleunigung von Reaktionsraten durch Reduktion der Transitzeit intermediärer Metabolite (Easterby, 1981; Huang *et al.*, 2001), (2) dem Schutz und der Stabilisierung chemisch instabiler Intermediate oder Cofaktoren (Rudolph & Stubbe, 1995), (3) der Isolation der Intermediate vor anderen konkurrierenden Reaktionen und Enzymen (Debnam *et al.*, 1997; Elcock *et al.*, 1996), (4) dem zellulären Schutz vor einer Akkumulation toxischer Zwischenprodukte (Dueber *et al.*, 2009) sowie (5) der Umgehung nicht gewünschter Equilibrien und Kinetiken durch andere cytoplasmatische Metabolite (Ovádi *et al.*, 1994; Spivey & Ovádi, 1999). Im *metabolic engineering* werden diese Vorteile genutzt, um durch Kolokalisation und gezielter Enzymkoppelung eine Verbesserung in der Ausbeute für ein bestimmtes Stoffwechselprodukt zu erzielen. Dabei gibt es verschiedene Ansätze, die von einer einfachen Proteinfusion über die gezielte Co-Immobilisierung bis hin zu Gerüststrukturen auf Protein- oder DNA-

Basis mit kovalent gebundenen Enzymen oder einer Kompartimentierung von Enzymen und damit einer Isolierung ganzer Stoffwechselwege vom restlichen Metabolismus reichen (Zhang, 2011; Lee *et al.*, 2012; Conrado *et al.*, 2012).

Die natürliche, direkte Weitergabe von Intermediaten zwischen Enzymen wurde sowohl für den Primär- (z. B. Glykolyse, Calvin-Zyklus oder Citratzyklus), als auch für den Sekundärmetabolismus (z. B. der Isoprenoid-, Alkaloid- oder Flavonoid-Biosynthese) in einer Vielzahl an Fällen bestätigt (Zhang, 2011). Eines der bekanntesten Beispiele für das *substrate channeling* in einem *in vivo*-Enzymkomplex sind die Tryptophan-Synthasen aus Bakterien, Hefen, Schimmelpilzen und Pflanzen (Zhang, 2011; Dunn *et al.*, 2008). Diese $\alpha_2\beta_2$ -Multienzymkomplexe katalysieren die letzten beiden Schritte der L-Tryptophan Biosynthese. Am Beispiel dieses Komplexes aus dem Bakterium *Salmonella typhimurium* wurde der Transfer des Metaboliten Indol von der α -Untereinheit (Indolsynthese) zur β -Untereinheit (Tryptophansynthese) über einen intramolekularen, hydrophoben Tunnel mit der Länge 2,5 nm gezeigt, dessen Durchmesser dem von Indol entspricht (Dunn *et al.*, 2008; Conrado *et al.*, 2008). Die Bildung solcher Enzymkomplexe hängt maßgeblich von deren Dissoziationskonstanten sowie den umgebenden Bedingungen ab. Deshalb ist es wichtig, bei der Analyse von PPI zwischen *in vivo* und *in vitro* Bedingungen zu unterscheiden. Der nächste Abschnitt soll den entscheidenden Einfluss sowie die Auswirkungen intrazellulärer Bedingungen auf die Assemblierung von (Multi)Enzymkomplexen verdeutlichen.

1.3 Der Einfluss des umgebenden Zellmilieus auf die Bildung von PPI

Die im Abschnitt 1.1 erwähnten Methoden zur Detektion von PPI sollen ein realistisches Bild des Interaktionsnetzwerkes innerhalb einer Zelle liefern. Ein Nachteil vieler *in vitro* Verfahren stellt die Tatsache dar, dass bei der Isolierung von Proteinkomplexen unphysiologische Bedingungen herrschen, die zwar für die Reinigung notwendig sind, die Stabilität eines transienten Komplexes aber maßgeblich beeinträchtigen und unter Umständen eine Co-Aufreinigung von Interaktionspartnern unmöglich machen. Daher ist sowohl bei der Isolierung transientser Proteinkomplexe aus einer komplexen Probe, als auch bei deren kinetischer Analyse *in vitro* das Vorhandensein einer physiologischen Umgebung der isolierten Proteine von Vorteil.

Ein häufig vernachlässigter Aspekt bei der Analyse von Enzymaktivitäten ist die Tatsache, dass das Zellinnere eine sehr hohe Konzentration an Makromolekülen aufweist (*macromolecular crowding*). Das Volumen des Cytoplasmas wird zu 30-60 % von Biomakromolekülen eingenommen (Aumiller *et al.*, 2014), wobei Proteine ~70 % des gesamten Makromolekülgewichts ausmachen. Dies entspricht einer Konzentration von 200 bis 300 mg/mL (Zimmerman & Trach, 1991) und steht in starkem Gegensatz zu den üblicherweise bei *in vitro* Bestimmung von Enzymkinetiken eingesetzten Proteinkonzentrationen von 10^{-1} bis 10^{-3} mg/mL (Zhang, 2011). Durch das im Zellinneren dicht gedrängte Auftreten der verschiedenen (Struktur-)Proteine, Nukleinsäuren, Polysaccharide und Lipide kommt es zu einer Verringerung des zur Diffusion zugänglichen Cytoplasmavolumens und einer Abnahme in der Entropie des Systems, da jedes Molekül durch die Position eines anderen Moleküls beeinflusst wird (Phillip & Schreiber, 2013). Dies nennt man den *excluded volume effect*, wodurch betont wird, dass es sich um einen physikalischen, unspezifischen Effekt der sterischen Hinderung und Abstoßung unterschiedlicher Biomoleküle handelt (Ellis, 2001a). Damit ist die effektive Konzentration („thermodynamische Aktivität“), zum Beispiel eines Proteins, höher als die tatsächliche Konzentration, was einen großen Einfluss auf dessen kinetische und thermodynamische Eigenschaften, wie der Komplexbildung, hat (Ellis, 2001a). Der Zustand eines Proteins, der durch Faltung und Komplexbildung weniger Volumen in Anspruch nimmt, ist thermodynamisch begünstigt (Ellis, 2001b). *In vitro*-Studien haben gezeigt, dass sowohl die Stabilität der Proteinkomplexe, als auch deren Bildungsrate in einer Lösung mit einer hohen Makromolekülkonzentration erhöht ist (Phillip & Schreiber, 2013). Das *macromolecular crowding* hat somit einen elementaren Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse durch Veränderung von Proteinstabilität, -aktivität, -bindungsfähigkeit und -beweglichkeit (Poggi & Slade, 2015) und stellt damit eine maßgebliche evolutionäre Triebkraft in der Entstehung von PPI dar (Meynial Salles *et al.*, 2007).

Am Beispiel der Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) wurde gezeigt, dass sich die Wechselzahl k_{cat} in Anwesenheit von *crowding agents*, die das intrazelluläre *macromolecular crowding in vitro* simulieren, vergrößert (Norris & Malys, 2011). Als *crowding agents* werden üblicherweise Proteine wie BSA oder Lysozym (Poggi & Slade, 2015) oder inerte Polymere unterschiedlicher Kettenlänge wie PEG (Polyethylenglycol), Dextran oder Ficoll (Jiao *et al.*, 2010) eingesetzt.

Die Bildung einer PPI erfordert allerdings auch die Diffusion und Kollision der Interaktionspartner. Diese Prozesse sind durch die hohe Viskosität, begründet durch das *macromolecular crowding*, verlangsamt (Phillip & Schreiber, 2013). Zudem wird der Diffusionsweg durch die Vielzahl an Makromolekülen in der Zelle, die teilweise als große Agglomerate vorliegen und damit als Diffusionsbarrieren auftreten, verlängert (Spitzer & Poolman, 2013). Dieser vermeintliche Nachteil des hochviskosen Cytoplasmas auf die Komplexbildung von Proteinen würde nicht ins Gewicht fallen, wenn ein kurzer Diffusionsweg zwischen den Interaktionspartnern liegt. Während Prokaryoten im Vergleich zu Eukaryoten eine reduzierte Zellarchitektur und -organisation aufweisen, ist mit dem Vorhandensein von Operon-Strukturen dennoch eine Möglichkeit zur Organisation von Makromolekülen gegeben. Durch polycistronische Transkription von Genen, deren Produkte in unmittelbarer räumlicher Nähe gebildet werden, ist ein Aufeinandertreffen dieser Interaktionspartner wahrscheinlich und nicht diffusionslimitiert.

1.4 Organisation prokaryotischer Gene in einem Operon

Eines der wichtigsten Strukturelemente bakterieller und archaealer Genome ist die Organisation mehrerer Gene in Operon-Strukturen (Bratlie *et al.*, 2010). Als Operon bezeichnet man eine eng benachbarte Gruppe von Genen, deren Transkription eine einzige polycistronische mRNA erzeugt. Neben den Strukturgenen dienen Promotor und Operator als Steuerungselemente der Genexpression. Aufgrund von horizontalem Gentransfer liegen sie häufig in verschiedenen Arten konserviert vor (Wolf *et al.*, 2001; Ermolaeva *et al.*, 2001). Ungefähr die Hälfte aller proteincodierenden Gene in Prokaryoten befinden sich in einer solchen kompakten DNA-Struktureinheit (Price *et al.*, 2006), in denen die einzelnen Gene häufig durch weniger als 20 Basenpaaren voneinander getrennt sind (Moreno-Hagelsieb & Collado-Vides, 2002). Oft sind Gene in einem Operon zusammengefasst, die funktionell verwandt sind, indem sie zum Beispiel für Enzyme und Transporter eines gemeinsamen Abbauwegs codieren (Daruvar *et al.*, 2002). Dies ist beispielsweise bei dem Lactose- oder *lac*-Operon aus *E. coli*, dessen Gene für die Aufnahme und Hydrolyse des Disaccharids verantwortlich sind, der Fall (siehe Abb. 1.3 auf Seite 10).

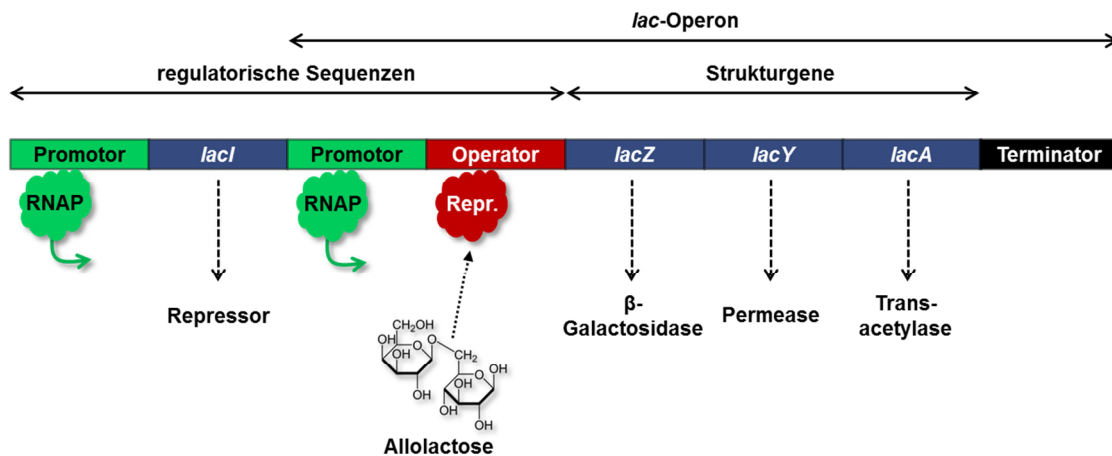


Abbildung 1.3: Das *lac*-Operon aus *E. coli* enthält die Gene *lacZ*, *lacY* und *lacA*, die für Transport und Abbau der Lactose verantwortlich sind. Sobald der Induktor (Allo-)Lactose präsent ist, bindet dieser an das Repressorprotein (codiert durch *lacI*), wodurch das Protein seine Affinität zum Operatorbereich verliert. Daraufhin kann die RNA-Polymerase (RNAP) die Strukturgene transkribieren (Jacob & Monod, 1961).

Für das häufige Auftreten dieser Transkriptionseinheiten werden drei Gründe diskutiert. Erstens besteht der offensichtliche Zusammenhang, dass Gene in selben Operon auch ähnliche Expressionsmuster aufweisen (Jacob & Monod, 1961; Rocha, 2008), was für funktionell verwandte Gene, wie zum Beispiel *lacZ*, *Y* und *A* beim Lactoseabbau, sinnvoll erscheint. Dennoch gibt es eine Vielzahl an Beispielen für Operon-Strukturen, bei denen die beteiligten Gene keine offensichtliche funktionelle Beziehung zueinander aufweisen (Daruvár *et al.*, 2002). Dies lässt sich damit begründen, dass ein Operon vor allem ein genereller Regulationsmechanismus für die Expression und Repression einer Gruppe von Genen darstellt. Somit lässt sich mit einem Promotor die Expression von Genen koordinieren, die vielleicht nicht funktionell verwandt sind, aber gleichzeitig für das Wachstum der Zelle unter bestimmten Umweltbedingungen benötigt werden (Price *et al.*, 2006). Zudem wird durch ein Operon die Menge an regulatorischer Sequenzinformation reduziert, was gerade bei komplexen Mechanismen einen evolutionären Vorteil darstellt (Price *et al.*, 2005). Zweitens gibt es die sog. *selfish operon theory*, die den Vorteil von Genclustern durch einfacheren Austausch metabolischer Funktionen mittels horizontalem Gentransfer beschreibt, da ein begrenzter DNA-Abschnitt die vollständigen notwendigen Informationen für eine bestimmte Funktion enthält (Pál & Hurst, 2004). Drittens wird vorgeschlagen, dass die Gruppierung von Genen, die für Multienzymkomplexe codieren, vorteilhaft durch schnellere Faltung und Bildung der Proteinkomplexe seien (Pál & Hurst, 2004; Dandekar *et al.*, 1998); zudem sollen Unterschiede in der Stöchiometrie der Interaktionspartner reduziert werden (Swain, 2004). Dieser Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit am Beispiel eines Operons in *B. subtilis* untersucht, das eine koordinierte Expression der drei Citratzyklus-Gene *citZ*, *icd* und *mdh* ermöglicht.

1.5 Der Citratzyklus als Modell für interagierende Enzyme aus dem Primärmetabolismus

Der Citratzyklus; auch Citronensäure-, Tricarbonsäure- oder nach seinem Entdecker Krebs-Zyklus genannt, ist ein weit verbreitetes zentrales Stoffwechselsystem, das maßgeblich zur Kohlenhydrat-, Fettsäure- und Aminosäureoxidation beiträgt sowie eine Vielzahl an Vorstufen für zahlreiche Biosynthesen (z. B. Aminosäuren und Vitamine), liefert (Voet *et al.*, 2010). Die dazugehörigen Reaktionen werden von acht Enzymen katalysiert, wobei der Acetylrest eines Acetyl-CoA-Moleküls (Produkt aus Zucker-, Fett- und Proteinkatabolismus) vollständig zu zwei CO_2 -Molekülen oxidiert wird. Der freiwerdende Wasserstoff wird auf NAD^+ und FAD übertragen, die in einem Reaktionsschritt freiwerdende Energie wird genutzt, um GTP zu bilden (siehe Abbildung 1.4). Während GTP direkt als Energiequelle genutzt werden kann, dienen $\text{NADH} + \text{H}^+$ und FADH_2 als Wasserstoffdonatoren für die oxidative Phosphorylierung (Voet *et al.*, 2010).

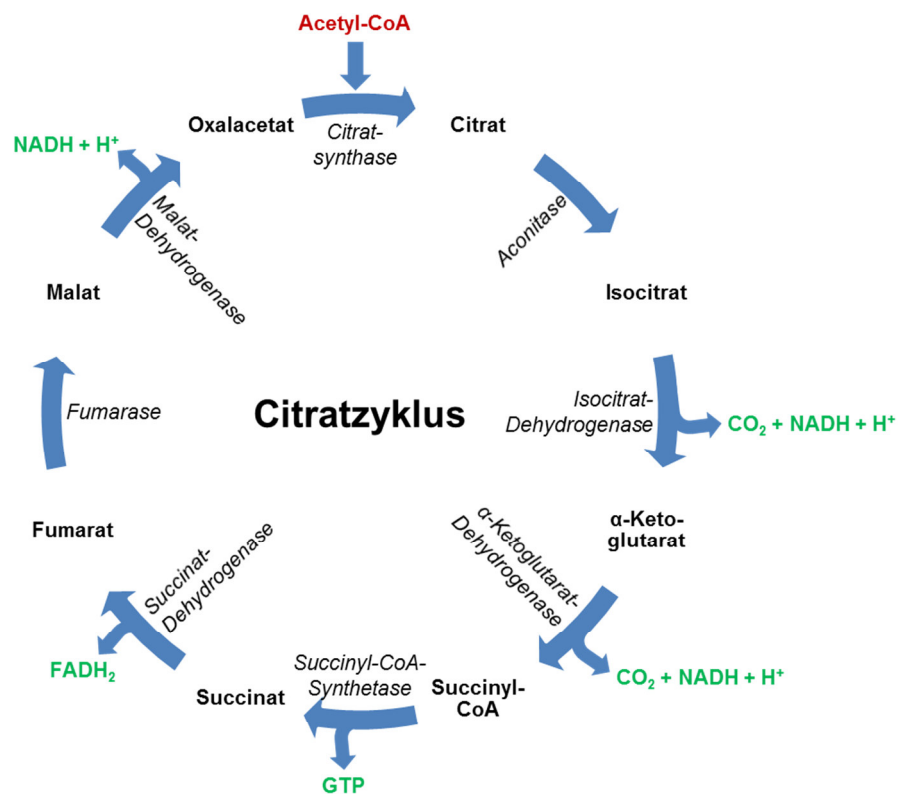


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des Citratzyklus, einem essentiellen Kreislauf biochemischer Reaktionen in aeroben Organismen. Das Schema zeigt vereinfacht die Oxidation von Acetat (rot, gebunden an Coenzym A) durch acht Enzyme (kursiv), wobei CO_2 , GTP und Reduktionsäquivalente für die oxidative Phosphorylierung (grün) gebildet werden.

Wie im vorigen Kapitel erwähnt, bilden drei Citratzyklus-Gene in *B. subtilis* ein Operon. *Bacillus subtilis* („Heubazillus“) ist ein fakultativ aerobes, endosporenbildendes Bodenbakterium mit einer Genomgröße von 4.214.810 bp (Kunst *et al.*, 1997). Das Bakterium ist der am besten charakterisierte grampositive Organismus und besitzt eine natürliche Kompetenz zur DNA-Aufnahme (Fuchs *et al.*, 2007). Die Analyse der Aktivität sowie der PPI der Genprodukte des *citZ-icd-mdh*-Operons (siehe Abb. 1.5), der Citratsynthase, der Isocitrat-Dehydrogenase sowie der Malat-Dehydrogenase aus *B. subtilis*, stehen im Vordergrund dieser Arbeit, weshalb diese Enzyme im Folgenden näher beschrieben werden.

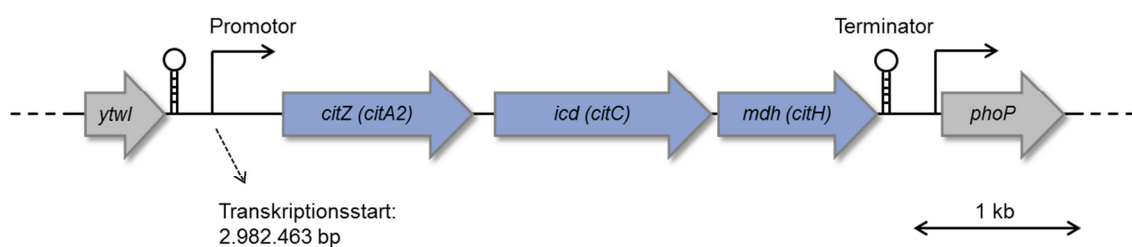


Abbildung 1.5: Ausschnitt aus dem *B. subtilis*-Chromosom. Gezeigt ist das *citZ-icd-mdh*-Operon (hellblau), das die Expression der Citratsynthase (CitZ), Isocitrat-Dehydrogenase (Icd) und Malat-Dehydrogenase (Mdh) koordiniert.

1.5.1 Citratsynthase

Die Citratsynthase (CS; früher auch „citratkondensierendes Enzym“ genannt; Srere *et al.*, 1963) katalysiert den ersten und für den Zyklus namensgebenden Schritt der geschwindigkeitsbestimmenden Bildung von Citrat durch Kondensation von Acetyl-CoA mit Oxalacetat (Jin & Sonenshein, 1994a). Das Enzym gehört somit zur Klasse der Transferasen. Typisch für CS grampositiver Bakterien wie *B. subtilis* ist ein geringes Molekulargewicht der einzelnen Untereinheiten, die zusammen ein Dimer bilden und durch ATP inhibiert werden (Jin & Sonenshein, 1994a). *B. subtilis* besitzt zwei unabhängige, homologe CS-Gene, *citA* und *citZ* (Jin & Sonenshein, 1994b), die in der exponentiellen sowie der frühstationären Wachstumsphase exprimiert werden (Jin & Sonenshein, 1996). Während ein Ausschalten des *citA*-Gens nur einen geringen Einfluss auf Wachstum, CS-Enzymaktivität und Sporulation hat, bewirkt die Deletion von *citZ* eine partielle Glutamat-Auxotrophie, einen nahezu vollständigen Verlust der CS-Enzymaktivität sowie einen signifikanten Sporulationsdefekt (Jin & Sonenshein, 1996). Aufgrund dieser Tatsache sowie vergleichender Transkriptanalysen, geht man davon aus, dass *citZ* für das CS-Hauptenzym codiert (Jin & Sonenshein, 1994b).

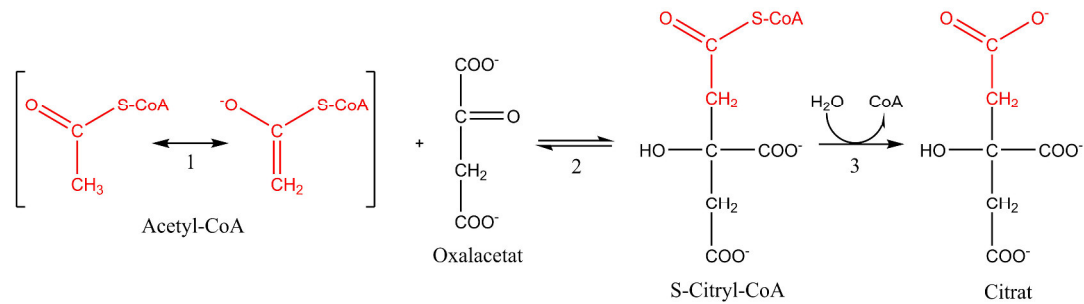


Abbildung 1.6: Schema der Citratsynthase-Reaktion (EC 2.3.3.1). Die Kondensation der Acetylgruppe mit Oxalacetat zur Bildung von Citrat verläuft in einem dreistufigen Mechanismus

Die Synthese von Citrat erfolgt durch eine gemischte Aldol-Claisen-Kondensation, die in einem dreistufigen Mechanismus abläuft (Voet *et al.*, 2010; Abbildung 1.6). Im ersten Schritt abstrahiert ein basischer Histidinrest ein Proton an C2 des Acetyl-Restes von Acetyl-CoA, wodurch die Enolisierung bzw. die Bildung eines carbanionischen Zwischenprodukts begünstigt wird. Im zweiten Schritt erfolgt ein stereospezifischer nukleophiler Angriff des Acetyl-CoA-Carbanions auf die Carbonylgruppe des Oxalacetats, wodurch zunächst Citryl-CoA entsteht. Die anschließende stark exergone Hydrolyse von Citryl-CoA stellt die Triebkraft der Gesamtreaktion dar und liefert Citrat sowie Coenzym A (Voet *et al.*, 2010).

1.5.2 Isocitrat-Dehydrogenase

Die Isocitrat-Dehydrogenase (ICD) ist das dritte Enzym des Citratzyklus und katalysiert die NADP⁺-abhängige oxidative Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat (Jin *et al.*, 1997; Voet *et al.*, 2010). Diese metallabhängige Enzym (Mn²⁺, Mg²⁺) bildet in *B. subtilis* ein Homodimer (Singh *et al.*, 2001) und wird durch Phosphorylierung mittels der bifunktionellen Isocitrat-Dehydrogenase-Kinase/Phosphatase inhibiert (Singh *et al.*, 2002). Die Dehydrogenase ist das Produkt von *icd* (Synonym *citC*). Eine *icd*-Deletionsmutante zeigt ein reduziertes Wachstum in Vollmedium und eine stark reduzierte Fähigkeit zur Sporulation (Jin *et al.*, 1997; Matsuno *et al.*, 1999).

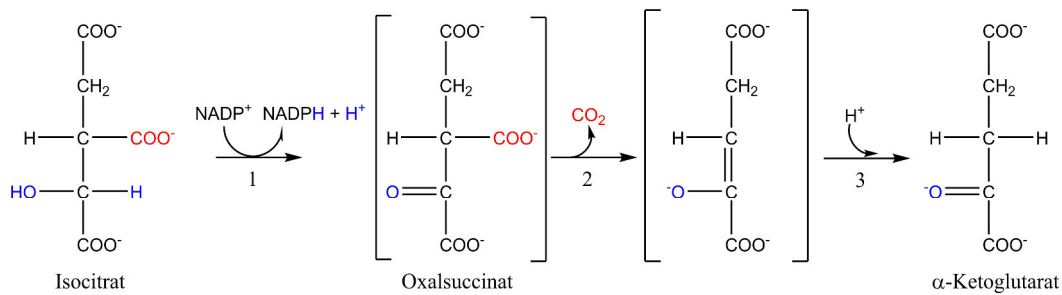


Abbildung 1.7: Schema der Isocitrat-Dehydrogenase-Reaktion (EC 1.1.1.42). Die Umsetzung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat erfolgt in einem dreistufigen Mechanismus. Das Intermediat Oxalsuccinat steht in Klammern, weil es während der Katalyse am Enzym gebunden vorliegt und direkt weiter umgesetzt wird.

Die Bildung von α -Ketoglutarat erfolgt in einem dreistufigen Mechanismus (Abbildung 1.7). Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation der Hydroxylgruppe am α -Kohlenstoffatom des Isocitrat-Moleküls durch Deprotonierung, wobei ein Hydrid auf NADP⁺ übertragen und eine Keton-Gruppe gebildet wird. Das so generierte Oxalsuccinat wird im zweiten Schritt decarboxyliert (β -Kohlenstoffatom), wodurch eine α - β ungesättigte Doppelbindung entsteht. Diese wird im dritten Schritt unter Bildung von α -Ketoglutarat abgesättigt (Nelson *et al.*, 2009).

1.5.3 Malat-Dehydrogenase

Die Malat-Dehydrogenase (MDH) ist das letzte Enzym im Citratzyklus und katalysiert die NAD⁺-abhängige Oxidation von Malat zur Regeneration von Oxalacetat, das daraufhin wieder als Substrat für die Citratsynthase zur Verfügung steht (Voet *et al.*, 2010). Das Enzym gehört wie die ICD zur Klasse der Oxidoreduktasen. In *B. subtilis* liegt das Enzym als Homotetramer vor (Yoshida, 1965) und wird durch *mdh* (Synonym *citH*) codiert. *B. subtilis mdh*-Disruptionsmutanten zeigen eine partielle Aspartat-Auxotrophie; in Abwesenheit dieser Aminosäure findet keine Sporulation mehr statt (Jin *et al.*, 1996).

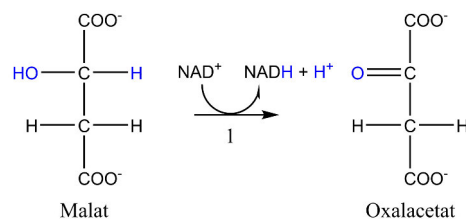


Abbildung 1.8: Schema der Malat-Dehydrogenase-Reaktion (EC 1.1.1.37). Die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat erfolgt in einem einstufigen Mechanismus.

Die Bildung von Oxalacetat erfolgt durch Oxidation der Hydroxylgruppe am α -Kohlenstoffatom des Malats zu einem Keton, wobei ein Hydrid-Ion auf NAD^+ übertragen wird (Voet *et al.*, 2010; Abbildung 1.8). Das aktive Zentrum der MDH besteht aus einer überwiegend hydrophoben Vakuole mit Bindestellen für das Substrat Malat und den Cofaktor NAD^+ . Sobald der ternäre Komplex entstanden ist, ergibt sich eine Konformationsänderung am Protein, wodurch die Vakuole verschlossen und die Substrate vom Wasser abgeschirmt werden (Goward & Nicholls, 1994; Minárik *et al.*, 2002).

1.5.4 Bekannte PPI von Enzymen des Citratzyklus

Eine Interaktion von verschiedenen Citratzyklus-Enzymen konnte bereits für *B. subtilis*, *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* sowie für Mitochondrien aus dem Schweineherzen gezeigt werden. So existiert sowohl in *E. coli*, als auch in *Pseudomonas aeruginosa* ein Multienzymkomplex aus den fünf sequentiellen Enzymen Fumarase, Malat-Dehydrogenase, Citratsynthase, Aconitase und Isocitrat-Dehydrogenase (Barnes & Weitzman, 1986; Mitchell, 1996). Von den mitochondrialen Citratzyklus-Enzymen zeigen sechs von acht sequentiellen Enzymen eine PPI. Diese Enzyme binden alle an die innere Membran der Mitochondrien (Morgunov & Srere, 1998; Lyubarev & Kurganov, 1989; Robinson & Srere, 1985). In *B. subtilis* wurde die Existenz eines Metabolons aus CS, ICD und MDH bewiesen; zudem konnte eine Interaktion von MDH mit Fumarase und Aconitase nachgewiesen werden (Meyer *et al.*, 2011; Bartholomae *et al.*, 2014).

Die Charakterisierung von *B. subtilis* CS, ICD und MDH im Rahmen dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Komplexbildung, dessen Verbindung zur genetischen Organisation sowie der Aktivität im Metabolon sind im nächsten Kapitel beschrieben.

1.6 Ziele der Arbeit

Protein-Protein-Interaktionen haben einen maßgeblichen Einfluss auf eine Vielzahl zellulärer Prozesse (Braun & Gingras, 2012). So wird zum Beispiel das Auftreten von Multienzymkomplexen beobachtet, was eine direkte Weitergabe der Stoffwechselintermediate zwischen den aktiven Zentren ermöglicht und dadurch unter anderem die Effizienz für eine bestimmte Stoffwechselleistung erhöht (Conrado *et al.*, 2008). Solche Enzymkomplexe existieren bei verschiedenen Enzymen des Citratzyklus, einem zentralen Stoffwechselweg aerober Zellen, so auch bei dem grampositiven Modellorganismus *Bacillus subtilis* (Meyer *et al.*, 2011). Die Gene für die drei Citratzyklus-Enzyme Citratsynthase (*citZ*), Isocitrat-Dehydrogenase (*icd*) und Malat-Dehydrogenase (*mdh*) sind in diesem Bakterium in einem Operon codiert (Jin *et al.*, 1996) und ermöglichen damit eine koordinierte Expression der Gene sowie eine Synthese der Enzyme in direkter räumlicher Nähe zueinander.

In dieser Arbeit wurde modellhaft untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen der genetischen Organisation von *citZ*, *icd* und *mdh* in einer Transkriptionseinheit und der Protein-Protein-Interaktion von CitZ, Icd und Mdh nach Translation der polycistronischen mRNA gibt (siehe Abbildung 1.9 auf Seite 17). Dadurch soll herausgefunden werden, ob das in der Gattung *Bacillus* konservierte *citZ-icd-mdh*-Operon neben der Möglichkeit zur koordinierten Expression auch die Aufgabe hat, die Assemblierung eines Proteinkomplexes zu fördern. Obwohl Komplexe von Enzymen, die in einem Stoffwechselweg aktiv sind („Metabolon“), schon länger beschrieben sind (Srere, 1985) und bioinformatische Analysen zeigen, dass Proteine, die in konservierten Genpaaren codiert sind, häufig interagieren (Dandekar *et al.*, 1998), wurde die mögliche Verbindung zwischen dieser genetischen Organisationsform und der räumlichen Interaktion der entsprechenden Genprodukte noch nicht konkret untersucht. Dazu wurden *B. subtilis*-Integrationsmutanten generiert, die sich in der Lokalisation und Organisation der drei Citratzyklus-Gene unterscheiden. Damit kann eine Aussage über den Zusammenhang zwischen Operonstruktur und PPI der Genprodukte durch biochemische Analyse der Mutanten hinsichtlich der PPI von CitZ, Icd und Mdh getroffen werden.

Neben der Bildung eines Metabolons wurde untersucht, ob sich die Umsatzrate durch einen solchen Enzymkomplex effizienter als durch frei diffundierenden Enzyme darstellt (siehe Abbildung 1.10 auf Seite 17). Dies wurde sowohl *in vitro* anhand gereinigter Enzyme und mit Hilfe inaktiver Mutanten, als auch *in vivo* mit Hilfe eines artifiziellen Operons in *E. coli* untersucht. Daneben wurde der Einfluss einer hohen, physiologischen Makromolekülkonzentration auf die Aktivität der genannten Enzyme ermittelt.

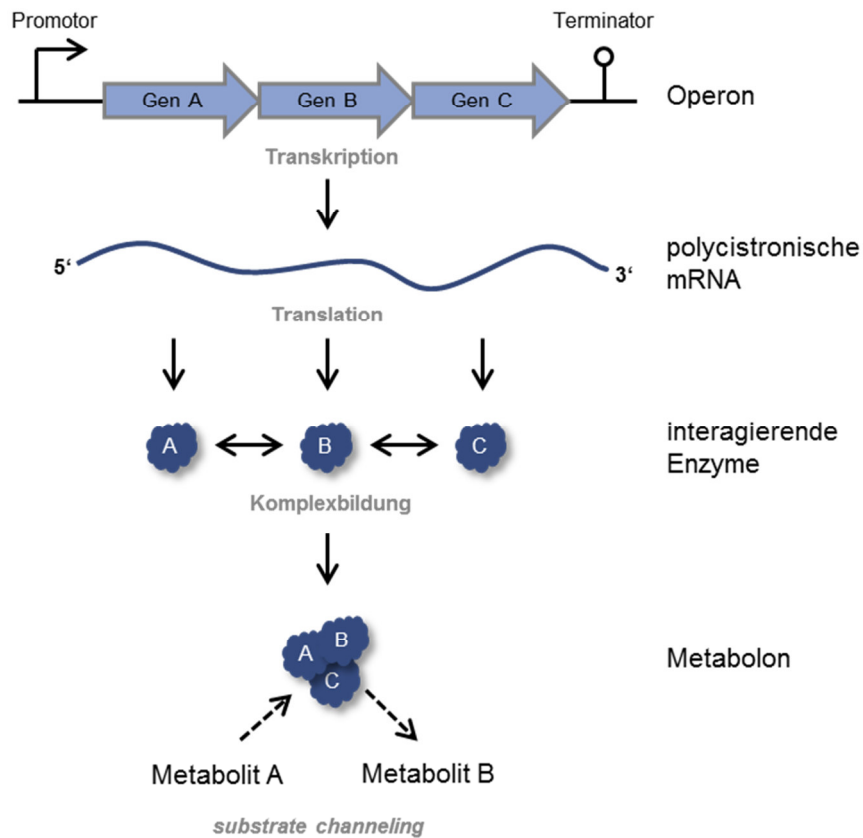


Abbildung 1.9: Schema zur polycistronischen Transkription, Translation und anschließenden Komplexbildung der in unmittelbarer räumlicher Nähe gebildeten Proteine. Anhand des *citZ-icd-mdh*-Operons aus *B. subtilis* wurde in dieser Arbeit beispielhaft der Zusammenhang zwischen Genorganisation und Komplexbildung der Genprodukte untersucht.

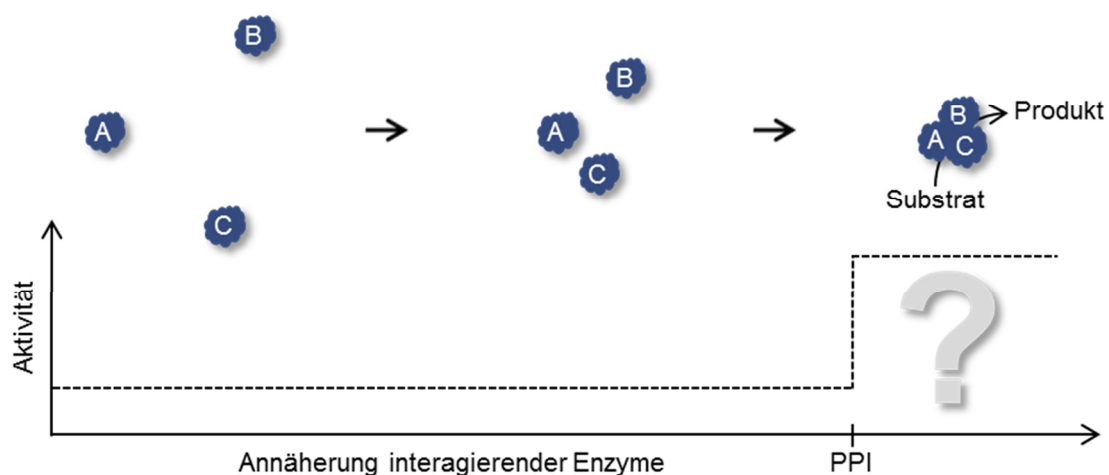


Abbildung 1.10: Schematische Darstellung des möglichen Zusammenhangs zwischen Komplexbildung mehrerer Enzyme und einer daraus gesteigerten Aktivität. Die zur Bildung des dargestellten Metabolons beteiligten Enzyme können sowohl katalytische, als auch strukturegebende Funktion haben.

2 Material

2.1 Laborgeräte

Tabelle 2.1: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Typ	Hersteller
Agarose-Geldokumentationssystem	Molecular Imager [®] GelDoc [™] XR, Quantity One 1D-Analysis Software	Bio-Rad, München
Autoklav	Varioklav [®] Dampfsterilisator 75 S	H+P Labortechnik, Habermos
Brutschrank	Modell 600	Memmert GmbH und Co. KG, Büchenbach
Chemilumineszenz-Detektor	Lumi-Imager [™] F1 mit LumiAnalyst 3.0	Roche Diagnostics, Mannheim
Elektroporationsgerät	Gene Pulser [®] II, Pulse Controller Plus	Bio-Rad, München
FPLC-System	ÄKTApurifier (P-900, UPC-900)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Gelscanner	Umax PowerLook III	Umax Technologies Inc., Dallas, USA
Heizbad	IKA [®] HBR4 digital	IKA GmbH, Staufen im Breisgau
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Horizontale Gelelektrophorese	Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
HPLC-System	LaChrom [®] (Interface D-7000, DAD L-7455, Autosampler L-7200, Pumpe L-7120) sowie Säulenofen BT0-04	Merck/Hitachi; W. O. Electronics, Langenzersdorf
Lichtmikroskop	BH-2	Olympus Europe, Hamburg
Mikrotiterplatten-Photometer	Tecan GENios Pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, CH
Reinstwassererzeugung	Milli-Q [®] Gradient	Millipore GmbH, Schwalbach
Schüttelinkubator	Certomat [®] IS	Sartorius Stedim GmbH, Göttingen
Sicherheitswerkbank	Variolab Mobilien W 90	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG Wangen
Spannungsquellen	Power Pac 200, Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	NanoVue	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Spektralphotometer	DU [®] 640 Spectrophotometer	Beckmann Coulter, Krefeld
Spektralphotometer	Ultrospec [™] 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg

Thermocycler	C1000™ Thermal Cycler, dual 48/48	Bio-Rad, München
Titrationsskalorimeter	MicroCal iTC200	Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK
Vertikale Gelelektrophorese	Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad, München
Western Blot-Transfersystem	Trans-Blot® SD, Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Zellaufschlussystem	French Press	Constant Systems Limited, Northants, UK
Zellaufschlussystem	Schwingmühle	Retsch, Haan
Zentrifuge	Eppendorf 5415 D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Heraeus Fresco 21	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Heraeus Multifuge® 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge	Sorvall WX Ultrazentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Enzyme, Chemikalien und Komplettsysteme

Für molekularbiologische Arbeiten wurden Enzyme von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Die Restriktionshydrolyse von DNA wurde mit „*Fast Digest*“-Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Neben Enzymen sind Ladepuffer sowie Komplettsysteme in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 2.2) aufgeführt. In Tabelle 2.3 sind Chemikalien und Reagenzien für biochemische Arbeiten aufgelistet.

Tabelle 2.2: Enzyme und Komplettsysteme für molekularbiologische Arbeiten

Enzym / Komplettsystem	Katalog-Nr.:	Hersteller
DNA Loading Dye (6 x)	R0611	Thermo Fisher Scientific
TriTrack DNA Loading Dye (6 x)	R1161	“
Agarase	EO0461	“
DreamTaq Green DNA Polymerase	EP0712	“
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	EF0654	“
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	K0721	“
GeneJET PCR Purification Kit	K0702	“
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	K0503	“
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM0311	“
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	EP0502	“
<i>Phusion</i> Hot Start II High-Fidelity DNA Polymerase	F-549S	“
T4 DNA Ligase	EL0011	“
T4 Polynucleotide Kinase	EK0031	“

QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200521-5	Stratagene Europe Amsterdam, NL
Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit	45-0159	Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA

Tabelle 2.3: Chemikalien und Reagenzien für biochemische Arbeiten

Chemikalie / Reagenz	Katalog-Nr.:	Bezugsquelle
Avidin, Egg White	189725	Calbiochem (Merck Millipore), Darmstadt
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	500-0006	Bio-Rad, München
cOmplete™, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	11836145001	Roche Life Science, Basel, CH
D-Biotin	2-1016-002	IBA GmbH, Göttingen
D-Desthiobiotin	2-1000-005	IBA GmbH, Göttingen
DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid); Ellmans Reagenz)	D-8130-1G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DTSSP (3,3'-dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate))	21578	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ficoll® 70000	46326	Fluka Biochemika, München
Lysozym	54268	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
Malonic acid, ReagentPlus®, 99%	M1296-100G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
PageBlue Protein Staining Solution	24620	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	26620	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd	0335.2	Carl Roth, Karlsruhe
Pierce™ CN/DAB Substrate Kit	PL209231	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Proteinase K	A3830	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sodium Arsenite Solution, Volumetric, 0.05 M	35000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Sulfo-SDAD (Sulfo-NHS-SS-Diazirine) (sulfosuccinimidyl 2-((4,4'-azipentanamido)ethyl)-1,3'-dithiopropionate)	26175	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate	34075	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.3 Bakterienstämme

Tabelle 2.4: Verwendete Bakterienstämme

Organismus	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	<i>F ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> <i>λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Novagen, Merck Millipore, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	<i>F λ⁻ ilvG- rfb-50 rph-1</i>	Prof. Soppa, Frankfurt
<i>Escherichia coli</i> S17-1 λpir	<i>TpR SmR recA, thi, pro, hsdR-M+RP4:</i> <i>2-Tc:Mu: Km Tn7 λpir</i>	Prof. Ingram, Gainesville, FL, USA
<i>Escherichia coli</i> TOP10	<i>F mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1</i> <i>araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15</i> <i>galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ⁻</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168	<i>trpC2</i>	Bacillus Genetic Stock Center, Columbus, OH, USA

2.4 Plasmide

Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide mit Angaben zur Funktion in dieser Arbeit sowie der vermittelten Resistenz gegenüber Ampicillin (Amp), Chloramphenicol (Cam) und Kanamycin (Kan).

Bezeichnung	Resistenz	Funktion	Herkunft
pDG268	Amp, Cam	<i>B. subtilis</i> -Integrationsvektor (<i>amyE</i>)	Antoniewski <i>et al.</i> , 1990
pET24a(+)	Kan	<i>E. coli</i> -Expressionsvektor	Novagen, Merck Millipore
pLOI2225	Cam	<i>E. coli</i> -Integrationsvektor	Martinez-Morales <i>et al.</i> , 1999
pLOI2403	Amp	Klonierungsvektor für pLOI2225	Martinez-Morales <i>et al.</i> , 1999
pGP172	Amp	Expression von Strep-Tag-Fusionsproteinen (<i>N</i> -terminal) in <i>E. coli</i>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004
pGP1764	Amp	Expression von Strep- <i>mdh</i> (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004
pGP1776	Amp	Expression von Strep- <i>citZ</i> (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	Merzbacher <i>et al.</i> , 2004
pDG268_citZ	Amp, Cam	Integration von Strep- <i>citZ</i> in <i>amyE</i> (<i>B. subtilis</i>)	diese Arbeit
pDG268_citZicdmh	Amp, Cam	Integration von Strep- <i>citZicdmh</i> in <i>amyE</i> (<i>B. subtilis</i>)	diese Arbeit
pET24a_gltA	Kan	Expression von Strep- <i>gltA</i> (<i>E. coli</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET24a_gltAicdmh	Kan	Expression des Strep- <i>gltAicdmh</i> -Operons (<i>E. coli</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET24a_icd	Kan	Expression von Strep- <i>icd</i> (<i>E. coli</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET24a_malE	Kan	Expression von Strep- <i>malE</i> (<i>E. coli</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET24a_malEicdmh	Kan	Expression des Strep- <i>malEicdmh</i> -Operons in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pET24a_mdh	Kan	Expression von Strep- <i>mdh</i> (<i>E. coli</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGP172_citZmdh	Amp	Expression des Strep-CitZ-Mdh-Fusionsproteins (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGP172_icd	Amp	Expression von Strep- <i>icd</i> (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGP1764_His180Gln	Amp	Expression von Strep- <i>mdhHis180Gln</i> (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pGP1776_Asp308Asn	Amp	Expression von Strep- <i>citZAsp308Asn</i> (<i>B. subtilis</i>) in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pLOI2225_gltA	Cam	Integration von Strep- <i>gltA</i>	diese Arbeit
pLOI2225_gltAicdmh	Cam	Integration von Strep- <i>gltAicdmh</i>	diese Arbeit
pLOI2225_tsf	Cam	Integration von Strep- <i>tsf</i>	diese Arbeit

2.5 Oligonukleotide

Sämtliche Oligonukleotide wurden von Sigma Life Science, München bezogen.

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide

Name/ Verwendung	Sequenz 5' → 3'	Funktion
Klonierung		
citZ_fw	GATAGAGCTCATGACAGCGACACG CG	Amplifikation <i>citZ</i> für pGP172_citZmdh
citZ_rv	GTAAGGTACCTGCGGCTCTTTCTT CAATCG	Amplifikation <i>citZ</i> für pGP172_citZmdh
mdh_fw	GTAAGGTACCGGTGCAATGGGAAA TACTCGTAAAAAAG	Amplifikation von <i>mdh</i> für pGP172_citZmdh
mdh_rv	GCGGGATCCTTAGGATAATACTTT CATGACATTTTTGAC	Amplifikation von <i>mdh</i> für pGP172_citZmdh
gltA_fw	GCGCGGAAGCTTCAACAAAGTTGT TACAAACATTACCAGGAAAAGCAT ATAATGCG	Amplifikation von <i>gltA</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
gltA_rv	CTTACGAATCTTAGGCGCCTTTT TCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGCG CCACGCTTGATATCGCTTTTAAAG TCGCG	Amplifikation von <i>gltA</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
icd_fw	GGCGCCTAAGAATTCGTAAGCGCT CGAAGGAGAGGTGAATG	Amplifikation von <i>icd</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
icd_rv	GCGACTTTCATCCTAAACTCCTTA TTATATTACATGTTTTTCGATGATC GCGTCACC	Amplifikation von <i>icd</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
mdh_fw	GGTGACGCGATCATCGAAAACATG TAATATAATAAGGAGTTTAGGATG AAAGTCGCAGTCC	Amplifikation von <i>mdh</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
mdh_rv	GGCGCCGCATGCGTTAACGCTGCA GGTCACCATTCAGG	Amplifikation von <i>mdh</i> für pLOI2225_gltAicdmdh (synthet. Operon)
4kb_fw	GCGCGGAAGCTTCAACAAAGTTG	Amplifikation synthetisches <i>gltAicdmdh</i> -Operon
4kb_rv	GGCGCCGCATGCGTTAACGCTG	Amplifikation synthetisches <i>gltAicdmdh</i> -Operon
tsf_fw	GGCCTCGCGCGTGCCGTGACTGCC ACGGATCCTGCTGTACACAGCGCC AACAATTATTGGTG	Amplifikation von <i>rpsBtsf</i> für pLOI2225_tsf
tsf_rv	GATAAGGTACCTTAGGCGCCTTTT TCGAACTGCGGGTGGCTCCAGGCG CCAGACTGCTTGGACATCGCAGCA ACTTC	Amplifikation von <i>rpsBtsf</i> für pLOI2225_tsf
gltApet_fw	GAGATATACATATGGCTGATACAA AAGCAAAAC	Amplifikation von <i>gltA</i> für pET24a_gltA
gltApet_rv	GTATATAAGCTTACGCTTGATATC GCTTTTAAAG	Amplifikation von <i>gltA</i> für pET24a_gltA
icdpet_fw	GAGATGCACATATGGAAAGTAAAG TAGTTGTTT	Amplifikation von <i>icd</i> für pET24a_icd
icdpet_rv	GTATATAAGCTTTCATGTTTTTCGAT GATCGCGTC	Amplifikation von <i>icd</i> für pET24a_icd

mdhpet_fw	GAGATATACATATGAAAGTCGCAG TCCTCGGCG	Amplifikation von <i>mdh</i> für pET24a_mdh
mdhpet_rv	GTCGCCAAGCTTCTTATTAACGAA CTCTTCGC	Amplifikation von <i>mdh</i> für pET24a_mdh
operonpet_rv	GAATTCGGATCCGTTACTTATTAA CGAACTCTTC	Amplifikation von <i>mdh</i> für pET24a_Operon
malE_fw	GCCACGGCGGGAGCGGCAGACGC ATTAATGAAAATAAAAACAGGTGC ACGC	Amplifikation von <i>malE</i> für pET24a_malE / pET24a_malEicdmh
malE_rv	ATATTCGAACTGCGGGTGGCTCCA GGCGCCCTTGGTGATACGAGTCTG CGC	Amplifikation von <i>malE</i> für pET24a_malE / pET24a_malEicdmh
citprom_fw	GCGGGGATCCATTATAGGTAAAC ATTTAAC	Amplifikation von <i>citZ</i> für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh
citprom_rv	GTATACTAGTGGCTCTTTCTCAA TCGGAAC	Amplifikation von <i>citZ</i> für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh
icdop_fw	CTAAGGTACCAGAACCATTGGAGG CTGGCTTG	Amplifikation von <i>icd</i> für pDG268_citZicdmh
mdhop_rv	GATAGCTCAGCGAAAGGCTGTATT AAGCAAG	Amplifikation von <i>mdh</i> für pDG268_citZicdmh
icdpgp_fw	CAGGAGCTCGGTGGCACAAGGTGA AAAAATTAC	Amplifikation von <i>icd</i> für pGP172_icd
icdpgp_rv	CGCCGGATCCTCATTAGTCCATGT TTTTGATCAG	Amplifikation von <i>icd</i> für pGP172_icd

Sequenzierung

amyfront_fw	TGCAAAACATTCTTGACACTCC	Sequenzierung pDG268
amyfront_rev	ATCATACCACCAGTGATTATGC	Sequenzierung pDG268
bla_fw	GACACGGAAATGTTGAATACTC	Sequenzierung pDG268
amyback_fw	TCCGCTCCCTCAGG	Sequenzierung pDG268
citZmdh_linker_fw	CGCAACACTTTCTGACATCT	Sequenzierung Fusionsgen <i>citZmdh</i>
pLOI2225_fusion_1_fw	ATGATGGTGTTTTTGAGGTG	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_2_fw	CTTCACTTCAACCGCATCCT	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_3_fw	CAGCTCCGTAAACACATTC	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_4_fw	CAGTCGAGAAAGCCTATAAA	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_5_fw	TAAAGACGTGATTGCTGATG	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_6_fw	GGCGCAGATGCTTCTTAT	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
pLOI2225_fusion_7_rv	CATACGATTTAGGTGACACT	Sequenzierung synthetisches <i>gltAicdmh</i> - Operon
SeqSpine_M13_puc_for	GTAAAACGACGGCCAGTG	Sequenzierung TOPO-Vektoren
SeqSpine_M13_puc_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	Sequenzierung TOPO-Vektoren
rpsB_seq	TCAAAGAAGCAAACAACCTG	Sequenzierung pLOI2225_tsf

M13_fw	AGGGTTTTCCAGTCACGACGTT	Sequenzierung TOPO-Vektoren
M13_rv	GAGCGGATAACAATTTACACAGG	Sequenzierung TOPO-Vektoren
icd_seqrev	GTAAATTTCCATCCAGGAG	Sequenzierung pET24a_malEicdmh
Insert268_fw	GCGTAGCGAAAAATCCTT	Sequenzierung pDG268
citZoperon1_fw	GCAACACTTTCTGACATCT	Sequenzierung pDG268_citZicdmh
citZoperon2_fw	TCGAAAGGTTTGGGAAGCAG	Sequenzierung pDG268_citZicdmh
citZoperon3_fw	CAACTACGAAACAGGACAT	Sequenzierung pDG268_citZicdmh
T7_prom	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierung pET-Vektoren
T7_term	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenzierung pET-Vektoren

Mutagenese

CitZ_Asp308Asn_fw	GAAGCCGAATAGAAATTAACGTTA GGCGGAAGC	Mutageneseprimer <i>B. subtilis</i> Citrat- synthase-Mutante
CitZ_Asp308Asn_rv	GCTTCGCCTAACGTTAATTTCTA TTCGGCTTC	Mutageneseprimer <i>B. subtilis</i> Citrat- synthase-Mutante
Mdh_mut_His180Gln_fw	CATATCGTCACCCTGTCCGCCGAG TACGA	Mutageneseprimer <i>B. subtilis</i> Malat- Dehydrogenase-Mutante
Mdh_mut_His180Gln_rv	TCGTACTCGGCGGACAGGGTGACG ATATG	Mutageneseprimer <i>B. subtilis</i> Malat- Dehydrogenase-Mutante

Kolonie-PCR

cat_fw	CCTTTATTACATTCTTGCCCGCC	analytischer Primer (Amplifikation Teilbe- reich <i>cat</i> -Gen)
cat_rv	GGTGAAAACGGGGCGAAGAAG	analytischer Primer (Amplifikation Teilbe- reich <i>cat</i> -Gen)
gltA_integr_fw	CAGTGACGGTATGAAGATTGCC	analytischer Primer (Amplifikation Teilbe- reich synthet. <i>gltAicdmh</i> -Operon)
mdh_integr_rv	GAAGGCAGTTGGGTTTTAACAG	analytischer Primer (Amplifikation Teilbe- reich synthet. <i>gltAicdmh</i> -Operon)

Linker-DNA

term_linker_a	CTTATCAAAAAGGAGCCGCCTGAG GGCGGCTG	Linker-DNA für pLOI2225_tsf
term_linker_b	TCGACAGCCGCCCTCAGGCGGCTC CTTTTGGATAAGGTAC	Linker-DNA für pLOI2225_tsf
Strep_linker_a	GATCCGTTAGGCGCCTTTTTCGAA CTGCGGGTGGCTCCAGGCGCCA	Linker-DNA für pET24a_gltA / pET24a_Operon
Strep_linker_b	AGCTTGGCGCCTGGAGCCACCCGC AGTTCGAAAAGGCGCCTAACG	Linker-DNA für pET24a_gltA / pET24a_Operon
Strep2_linkerA_a	CTAGTGGCGCCTGGAGCCACCCGC AGTTCGAAAAGGCGCCTAACG	Linker-DNA für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh
Strep2_linkerA_b	TCAGCTTAGGCGCCTTTTTCGAAC TGCGGGTGGCTCCAGGCGCCA	Linker-DNA für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh
Strep2_linkerB_a	CTAGTGGCGCCTGGAGCCACCCGC AGTTCGAAAAGGCGCCTAACGTA C	Linker-DNA für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh
Strep2_linkerB_b	CTTAGGCGCCTTTTTCGAACTGCG GGTGGCTCCAGGCGCCA	Linker-DNA für pDG268_citZ / pDG268_citZicdmh

2.6 Nährmedien

Tabelle 2.7: Verwendete Komplex- und Minimalnährmedien (MM). Wenn nicht anders angegeben, wurden Einzelkomponenten vor dem aseptischen Mischen autoklaviert (121 °C, 20 min., 1,4 bar Überdruck). Sterilfiltriert wurde über Filter mit 0,22 µm Porenweite. Bei Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 15 g/L Agar-Agar hinzugegeben.

Nährmedium	Zusammensetzung und Herstellung
LB-Lennox (lysogeny broth, Bertani, 1951)	5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Natriumchlorid; auf pH 7,0 mit 1 M Natriumhydroxid einstellen, auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, autoklavieren
SOC (Hanahan, 1983)	20 g/L Bacto Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 0,5 g/L Natriumchlorid, 0,19 g/L Kaliumchlorid; autoklavieren, danach aseptische Zugabe von 20 mM MgCl ₂ , 20 mM Glucose (sterilfiltriert)
GYT (Tung & Chow, 1995)	10 % (v/v) Glycerin, 0,125 % Hefeextrakt, 0,25 % Trypton, sterilfiltrieren
<i>E. coli</i>-M9-MM (Sambrook <i>et al.</i> , 2001)	776,9 mL Milli-Q-H ₂ O, 200 mL 5 x <u>M9 Salze</u> , 20 mL 20 % Glucose, 2 mL 1 M Magnesiumsulfat, 0,1 mL 1 M Calciumchlorid; einzeln autoklavieren und aseptisch mischen; 1 mL 1 mg/mL Thiamin HCl (sterilfiltriert) aseptisch hinzugeben <u>5 x M9 Salze</u> : 64 g/L Dinatriumhydrogenphosphat-Heptahydrat, 15 g/L Kaliumdihydrogenphosphat, 2,5 g/L Natriumchlorid, 5 g/L Ammoniumchlorid, auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, autoklavieren
<i>E. coli</i>-MOPS-Acetat-MM (Neidhardt <i>et al.</i> , 1974)	840 mL Milli-Q-H ₂ O, 100 mL <u>10 x MOPS-Gemisch</u> , 10 mL 0,132 M Dikaliumhydrogenphosphat, 50 mL 2 M Natriumacetat, mischen, auf pH 7,2 mit 10 M Natriumhydroxid einstellen, sterilfiltrieren <u>10 x MOPS-Gemisch</u> : 83,72 g/L MOPS, 7,17 g/L Tricin, auf pH 7,4 mit 10 M Kaliumhydroxid einstellen, danach Zugabe (Reihenfolge einhalten) von 10 mL 0,01 M Eisensulfat-Heptahydrat, 50 mL 1,9 M Ammoniumchlorid, 10 mL 0,276 M Kaliumsulfat, 0,25 mL 0,02 M Calciumchlorid-Dihydrat, 2,1 mL 2,5 M Magnesiumchlorid, 100 mL 5 M Natriumchlorid, 0,2 mL <u>Spurenelementlösung</u> , auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen und sterilfiltrieren (Aliquots können eingefroren werden) <u>Spurenelementlösung</u> : 0,009 g Ammoniummolybdat, 0,062 g Borsäure, 0,018 g Kobaltchlorid, 0,006 g Kupfersulfat, 0,04 g Manganchlorid, 0,007 g Zinksulfat, auf 50 mL mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, sterilfiltrieren
<i>B. subtilis</i>-C-Malat-MM (Commichau <i>et al.</i> , 2008)	670 mL Milli-Q-H ₂ O, 200 mL <u>5 x C-Salze</u> , 100 mL 5 % (w/v) Malat, 10 mL 5 mg/mL L-Tryptophan (sterilfiltriert), 10 mL 2,2 mg/mL Ammoniumeisen(III)-citrat, 10 mL <u>III'-Salze</u> aseptisch mischen <u>5 x C-Salze</u> : 20 g/L Kaliumdihydrogenphosphat, 80 g/L Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, 16,5 g/L Ammoniumsulfat, auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, autoklavieren <u>III'-Salze</u> : 0,232 g Mangansulfat-Tetrahydrat, 12,3 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 12,5 mL 100 mM Zinkchlorid, auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, autoklavieren
Medien zur Herstellung kompetenter <i>B. subtilis</i>-Zellen (Harwood & Cutting, 1990)	T Base: 2 g/L Ammoniumsulfat, 18,3 g/L Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat, 6 g/L Kaliumdihydrogenphosphat, 1 g/L Trinatriumcitrat-Dihydrat auf 1 L mit Milli-Q-H ₂ O auffüllen, autoklavieren SpC: 20 mL T Base, 0,2 mL 50 % (w/v) Glucose, 0,3 mL 1,2 % (w/v) Magnesiumsulfat-Trihydrat, 0,4 mL 10 % (w/v) Bacto Hefeextrakt, 0,5 mL 1 % (w/v) Casaminoäuren direkt vor Nutzung aseptisch mischen SpII: 200 mL T Base, 2 mL 50 % (w/v) Glucose, 14 mL 1,2 % (w/v) Magnesiumsulfat-Trihydrat, 2 mL 10 % (w/v) Bacto Hefeextrakt, 2 mL 1 % (w/v) Casaminoäuren, 1 mL 0,1 M Calciumchlorid direkt vor Nutzung aseptisch mischen SpII + EGTA: 200 mL SpII und 4 mL 0,1 M EGTA pH 8,0 aseptisch mischen

2.7 Datenbanken und Programme

Tabelle 2.8: Verwendete Datenbanken und bioinformatische Programme

Datenbank/Programm	Anwendung
BsubCyc <i>B. subtilis</i> Database (http://bsubcyc.org/)	<i>B. subtilis</i> Gen- und Enzymrecherche
EcoCyc <i>E. coli</i> Database (http://ecocyc.org/)	<i>E. coli</i> Gen- und Enzymrecherche
KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (http://www.genome.jp/kegg/)	Recherche Citratzyklus-Enzyme
BRENDA Enzyme Database (http://www.brenda-enzymes.org/)	Allgemeine Enzymrecherche
CLC Main Workbench Version 6.9.2 (CLC bio, Qiagen)	Nukleotidsequenzanalyse sowie -alignment; Plasmiddesign

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*

Sofern nicht anders beschrieben, wurden sowohl *Escherichia coli* (*E. coli*) als auch *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) bei 37 °C im Schüttelinkubator für Flüssigmedien bzw. im Brutschrank auf festen Nährböden kultiviert. Zur Vermehrung im Rahmen von Klonierungsarbeiten und für die Überproduktion rekombinanter Enzyme wurde LB-Medium verwendet. Die Inokulation einer Flüssigkultur erfolgte mittels Einzelkolonie von einer frischen Agarplatte bzw. mit einer frischen Übernachtskultur, angeimpft auf eine Anfangs-OD_{600nm} von 0,03/mL (*E. coli*) bzw. 0,10/mL (*B. subtilis*). Für Kulturvolumina bis 5 mL wurden Reagenzgläser verwendet, für größere Kulturmengen Erlenmeyerkolben mit Schikanen. Diese wurden je nach Gefäßgröße bei 180 bis 250 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Falls nötig, wurde den Medien Antibiotika zur Selektion hinzugegeben (siehe Tabelle 3.1). Zur Kultivierung des *B. subtilis* Wildtyp-Stamms Marburg 168 wurden die Minimalmedien mit L-Tryptophan supplementiert (20 µg/mL). Die Separation von Zellmasse und Kulturmedium erfolgte, sofern nicht anders beschrieben, durch Zentrifugation in 50 mL-Zentrifugenröhrchen (5 min. bei 8.000 x g, 4 °C) oder in 500 mL-Zentrifugenbechern (30 min. bei 4.500 x g, 4 °C).

Tabelle 3.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung	Finale Konzentration
Ampicillin	100 mg/mL in H ₂ O	100 µg/mL (<i>E. coli</i>)
Chloramphenicol	30 mg/mL in EtOH	30 µg/mL (<i>E. coli</i>); 5 µg/mL (<i>B. subtilis</i>)
Kanamycin	50 mg/mL in H ₂ O	50 µg/mL (<i>E. coli</i>)

3.1.2 Kryopräservation von Mikroorganismen

Zur Dauerkonservierung von Mikroorganismen wurden 670 μL einer frischen Übernachtskultur mit 330 μL 60 % (v/v) sterilem Glycerin in Kryoröhrchen mit Schraubdeckel gemischt. Diese Mischungen wurden anschließend bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Zur erneuten Kultivierung wurden ein paar Eiskristalle von der gefrorenen Zellsuspension mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einem Nährboden ausgestrichen.

3.1.3 Herstellung kompetenter Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-TOP10-Zellen (verwendet für Klonierungen und Plasmidkonservierung) wurden 50 mL LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0,03/\text{mL}$) und im Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 220 rpm bis zur einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,3/mL kultiviert. Nach Abtrennung der Zellen vom Nährmedium durch Zentrifugation ($4.700 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min.) wurde der Zelleniederschlag vorsichtig in 20 mL eiskalter, steriler Calciumchloridlösung (0,1 M) resuspendiert. Der Ansatz wurde 20 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert ($3.500 \times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 10 min.). Der Zelleniederschlag wurde in 2 mL eiskalter Calciumchlorid-Glycerinlösung (0,1 M CaCl_2 und 10 % Glycerin) resuspendiert und der Ansatz in 0,5 mL-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook *et al.*, 2001).

Für die Herstellung elektrokompetenter *E. coli* MG1655 (verwendet für genomische Integrationen) wurden je 2 x 100 mL LB-Medium mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft ($\text{OD}_{600\text{nm}}=0,05/\text{mL}$) und im Schikanekolben bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 230 rpm bis zur einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 0,4/mL kultiviert. Die Kultur wurde daraufhin direkt im Eiswasserbad 20 Minuten lang abgekühlt, in 4 vorgekühlte 50 mL-Zentrifugenröhrchen überführt und 15 Minuten bei $1000 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, die Zelleniederschläge in 100 mL eiskaltem H_2O resuspendiert und erneut 20 Minuten wie oben beschrieben zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellmasse in 50 mL eiskaltem 10%-Glycerin resuspendiert, danach wurde erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen, der Niederschlag vorsichtig in 5 mL eiskaltem 10%-Glycerin resuspendiert und 20 min erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und der Niederschlag in 1 mL eiskaltem GYT-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden in 0,5 mL-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

Zur Herstellung kompetenter *B. subtilis*-Zellen wurde der Wildtyp-Stamm auf LB-Festmedium ausgestrichen und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Die entstandene Zellmasse wurde am nächsten Morgen abgenommen und in 20 mL vorgewärmtem SpC-Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde bei 37 °C bis zum Erreichen der stationären Wachstumsphase inkubiert. Danach wurden 200 mL vorgewärmtes SpII-Medium mit 2 mL der stationären Kultur angeimpft und weiter bei 37 °C und etwas geringerer Schüttelfrequenz 90 Minuten lang inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (8000 x g, 5 Minuten, RT) geerntet. Der Überstand wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und der Zellschlag in 18 mL dieses Überstands resuspendiert. Zu dieser Suspension wurden 2 Milliliter steriles Glycerin gegeben und nach Mischen in 0,5 mL-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Harwood & Cutting, 1990).

3.1.4 Transformation

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde ein 50 µL-Aliquot TOP10-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 5 µL Ligationsansatz bzw. 100 ng Plasmid-DNA versetzt und nach Mischen 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte der Hitzeschock im 42 °C-Wasserbad 30 Sekunden lang mit anschließendem zweiminütigem Abkühlen auf Eis. Nach Zugabe von 250 µL SOC-Medium erfolgte die Regeneration 45 Minuten lang im Schüttelinkubator bei 37 °C. Je nach zu erwartender Koloniedichte wurde ein Teil des Transformationsansatzes auf LB-Nährböden mit entsprechendem Selektionsdruck ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Wenn nötig, wurden die Transformanten mittels fraktioniertem Verdünnungsausstrich weiter vereinzelt und die Aufnahme des rekombinanten Plasmids durch Präparation der Plasmid-DNA mit anschließender Restriktionshydrolyse überprüft.

Zur Transformation elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot TOP10 auf Eis aufgetaut, 50 µL davon mit 2 µL Ligationsansatz bzw. 50 ng Plasmid-DNA versetzt und das Gemisch in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (*Gene Pulser Cuvette* von Bio-Rad mit 0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Nach Elektroporation im *Gene Pulser II* von Bio-Rad (2,5 kV, 25 µF, 200 Ω) erfolgte die sofortige Zugabe von 1 mL SOC-Medium mit anschließender einstündiger Regeneration im Reagenzglas bei 37 °C im Schüttelinkubator. Die weiteren Schritte sind identisch mit dem Protokoll zur Transformation chemisch kompetenter Zellen.

B. subtilis wurde nach der „two-step *Bacillus subtilis* transformation procedure“ (Harwood & Cutting, 1990) transformiert. Dazu wurde ein 500 µL-Aliquot kompetenter Zellen (Marburg 168 Wildtyp) im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und danach direkt 500 µL SpII + EGTA hinzugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden pro Transformation je 500 µL dieser Zellsuspension in ein steriles 1 mL-Reaktionsgefäß mit 500 ng Plasmid-DNA überführt. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C im Schüttelinkubator wurde der gesamte Ansatz auf einen LB-Nährboden mit entsprechendem Selektionsdruck ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.1.5 Konstruktion von Integrationsstämmen

Die Integration von Genen in das *B. subtilis*-Chromosom erfolgte mittels pDG268 in den *amyE*-Locus. Dazu wurde *B. subtilis* mit dem rekombinanten Integrationsvektor transformiert (Selektion auf LB Cam 5 µg/mL). Von der Transformationsplatte wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Impföse aufgenommen und sowohl auf einem LB-Nährboden mit 1 % Stärke ausgestrichen, als auch auf einer Sicherungsplatte ohne Stärke. Nach Inkubation bei 37 °C über Nacht wurde die stärkehaltige Platte mit 2 mL verdünnter Lugol'scher Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung, 1:2 mit Wasser verdünnt) überschichtet. Bei erfolgreicher Integration in das *amyE*-Gen kann die Stärke im Wachstumsbereich des Integrationsstammes nicht abgebaut werden und die Lugol'sche Lösung färbt den Agar bläulich. Stämme, bei denen kein Rekombinationsereignis stattgefunden hat, erscheinen durch den noch funktionierenden Stärkeabbau heller. Mittels Kolonie-PCR wurden die Integrationsstämme daraufhin getestet, ob die Integration als *single*- oder *double-crossover*-Ereignis stattgefunden hat. Mit den Transformanten, die nicht den gesamten Vektor, sondern nur das gewünschte Gen integriert haben (*double-crossover* Mutanten), wurde weitergearbeitet.

Die Integration von Genen in das *E. coli*-Chromosom erfolgte mittels pLOI2225 nach dem Protokoll von Martinez-Morales (Martinez-Morales *et al.*, 1999). Bei dem in dieser Arbeit abgewandelten Verfahren wurde auf die Entfernung des Selektionsmarkers mittels FLP Rekombinase verzichtet.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Isolierung genomischer DNA und Plasmid-DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurde das *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* von Thermo Scientific gemäß den Angaben des Herstellers für gramnegative bzw. grampositive Bakterien verwendet. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* des gleichen Herstellers gemäß den empfohlenen Angaben; für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *B. subtilis* wurde ein abgewandeltes Protokoll verwendet. Dazu wurde eine Kultur in LB-Medium bis zu einer OD_{600nm} von ca. 1,0 inkubiert und 15 mL davon abzentrifugiert (3000 x g, 15 min., 4 °C). Der Niederschlag wurde in 250 μ L *Resuspension Buffer* des Kits nach Zugabe von 1 mg/mL Lysozym resuspendiert und 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die weiteren Schritte erfolgten gemäß Herstellerangaben.

3.2.2 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde in präparativem Maßstab zur Amplifikation von DNA-Fragmenten im Rahmen von Klonierungsarbeiten genutzt. Für diese Zwecke wurde die *Pfu* DNA Polymerase bzw. die *Phusion Hot Start II High Fidelity* DNA Polymerase von Thermo Scientific verwendet. Ein typischer PCR-Ansatz mit entsprechendem Temperaturprogramm ist den Herstellerangaben zu entnehmen. Die Bestimmung der optimalen Primer-Hybridisierungstemperatur erfolgte zuvor mittels Temperaturgradient in kleinem Maßstab (25 μ L). Durch Verwendung des GC Buffers für die *Phusion*-Polymerase bzw. durch Zugabe von DMSO, PEG 6000 oder Glycerin konnte das Schmelzverhalten in manchen Fällen soweit verändert werden, dass eine Amplifikation erst ermöglicht wurde.

Des Weiteren wurde die PCR in analytischem Maßstab zum Durchmustern rekombinanter Stämme nach einer Transformation verwendet (Kolonie-PCR). Dazu wurde mit einer sterilen Impföse etwas Zellmaterial von einer frisch bewachsenen Agarplatte entnommen und in 50 μ L sterilem H₂O resuspendiert. Ein Mikroliter dieser Zellsuspension wurde in den PCR-Ansatz gegeben. Die Amplifikation eines für einen rekombinanten Stamm spezifischen DNA-Fragments erfolgte mittels Thermo Scientific *DreamTaq* DNA Polymerase. Bei Verwendung des *DreamTaq Green Buffers* wurde ein Aliquot des Reaktionsgemischs nach Ablauf der PCR direkt auf ein analytisches Agarosegel aufgetragen.

3.2.3 Analytische Agarose-Gelelektrophorese

Die Analyse von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Dazu wurde eine 1%-Lösung der Biozym LE Agarose in TAE-Puffer (40 mM TRIS-HCl, 20 mM Natriumacetat, 2 mM EDTA, pH 8,3; Sambrook *et al.*, 2001) angesetzt, aufgeköcht und in entsprechende Kammern der Firma Bio-Rad gegossen. Nach Abkühlen und Auftrag der mit Ladepuffer (*6 x TriTrack DNA Loading Dye*, Thermo Scientific) versetzten Proben wurden diese eine Stunde lang bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion erfolgte nach Färben im Ethidiumbromidbad (1 µg/mL in H₂O) im Geldokumentationssystem GelDoc XR von Bio-Rad mittels UV-Licht.

3.2.4 Gelextraktion von DNA-Fragmenten mittels Agarase

Für die Extraktion von DNA-Fragmenten nach elektrophoretischer Auftrennung in einem *low-melting-point*-Agarosegel (1,25 %, *Top Vision Low Melting Point Agarose* von Thermo Scientific) wurde die Agarase von Thermo Scientific verwendet. Dazu wurde ein Gelstück, das das gewünschte DNA-Fragment enthielt, mit einem Skalpell ausgeschnitten, in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt und bei 70 °C 10 Minuten im Heizblock geschmolzen. Nach fünf Minuten Äquilibrieren bei 42 °C erfolgte die Zugabe von 1,25 Units Agarase pro 100 mg Gelstück und 30-minütiger Inkubation bei 42 °C. Danach wurde 0,3 M Natriumacetat (final) hinzugegeben und der Ansatz fünf Minuten auf Eis abgekühlt. Nicht verdaute Agarose wurde dadurch in einem Zentrifugationsschritt (12.000 x g, 10 min.) abgetrennt; der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Danach erfolgte die Fällung der DNA durch Zugabe von 2,5 Volumen Ethanol bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurde erneut zentrifugiert (12.000 x g, 15 min.), der Überstand verworfen und der DANN-Niederschlag im Heizblock bei 45 °C getrocknet. Dieser Niederschlag wurde im Anschluss in TE-Puffer aufgenommen.

3.2.5 Reinigung und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus enzymatischen Reaktionsansätzen (PCR, Restriktionsverdau, Dephosphorylierung) erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem *GeneJET PCR Purification Kit* von Thermo Scientific. Nach Reinigung wurde die DNA-Konzentration und -Reinheit mittels *NanoVue* von GE Healthcare Bio-Sciences bei 260 nm abgeschätzt.

3.2.6 Restriktionshydrolyse, Phosphorylierung und Dephosphorylierung von DNA

Der Verdau von DNA-Fragmenten erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen von Thermo Scientific. Die Restriktionshydrolysen wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt; es wurden sowohl konventionelle, als auch *FastDigest*-Enzyme verwendet. Die Dephosphorylierung von Plasmid-DNA erfolgte durch die alkalische Phosphatase *FastAP* (Thermo Scientific). Synthetische Oligonukleotide, die gepaart als Linker-DNA für Klonierungen eingesetzt wurden, wurden mittels T4 Polynukleotid-Kinase (Thermo Scientific) nach Herstellerangaben phosphoryliert, sofern der Vektor dephosphoryliert vorlag.

3.2.7 Ligation

Die kovalente Verknüpfung von DNA-Fragmenten erfolgte mit der T4 DNA Ligase von Thermo Scientific. Ligationen von Vektor- und Insert-DNA wurden in einem molaren Verhältnis von 1:3 durchgeführt und die Reaktionsansätze eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

3.2.8 Mutagenese von Plasmiden

Die gezielte Einführung von Mutationen zur Erzeugung inaktiver Enzyme erfolgte mit Hilfe des *QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit* von Stratagene (Agilent Technologies). Der Entwurf der dazugehörigen Primer erfolgte mit Hilfe des *QuikChange Primer Design-Tools* (<http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>); die Synthese der Primer (HPLC gereinigt) erfolgte durch Sigma-Aldrich. Die Mutagenese wurde gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung des Plasmids durch Eurofins Genomics, Ebersberg bestätigt.

3.2.9 TOPO-Klonierung

Zur Subklonierung eines PCR-Fragments wurde das *Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit* von Invitrogen (Life Technologies) gemäß Herstellerangaben verwendet. Damit ist eine ligasefreie Zwischenklonierung eines DNA-Fragments ohne Überhang in einen Vektor möglich. Für weitere Klonierungsschritte wurde der Vektor in vivo vermehrt und das gewünschte Fragment aus dem Vektor durch Restriktionshydrolyse gewonnen.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Die Überproduktion von Proteinen wurde mittels *E. coli* BL21(DE3) durchgeführt. Als Expressionsvektoren dienten pET24a(+) (Novagen, Merck Millipore) sowie pGP172 (Merzbacher *et al.*, 2004). Die Synthese erfolgte jeweils als Strep-Tag-Fusionsprotein; dabei tragen die mittels pET-Vektor produzierten Proteine einen C-terminalen Strep-Tag, die mittels pGP-Vektor produzierten Proteine einen N-terminalen Strep-Tag. Die Kultivierung der rekombinanten Expressionsstämme erfolgte mit entsprechendem Selektionsdruck in LB-Medium (0,5 – 1 L; je 250 mL Medium pro 1 L-Schikanekolben) bis zu einer OD_{600nm} von 0,6-0,8/mL. Dann wurde die Genexpression durch Induktion mit 1 mM IPTG gestartet. Die Zellernte erfolgte nach fünf Stunden Inkubation bei 30 °C. Durch Zentrifugation wurde die Zellmasse vom Nährmedium getrennt. Der Zellniederschlag wurde einmal mit Aufschlusspuffer (Puffer W, Tab. 3.2 auf Seite 36) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.3.2 Reinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen mittels Strep-Tactin-Matrices

Zur Reinigung von Strep-Tag-Fusionsproteinen bzw. -komplexen wurden Chromatographiesäulen der IBA GmbH, Göttingen verwendet. Je nach Anwendung und benötigter Menge an rekombinantem Protein wurde entweder mittels Zentrifugensäulchen (Strep-Tactin[®] Spin Columns, Katalog-Nr. 2-1850-010), Schwerkraftsäulen (*Gravity flow Strep-Tactin[®] Sepharose[®] column*, 1 mL, Katalog-Nr. 2-1202-001) oder einer FPLC-Säule (*Strep-Tactin[®] Superflow[®] high capacity cartridge*, 5 mL, Katalog-Nr. 2-1238-001) gearbeitet. Dabei wurden die Zentrifugen- bzw. Schwerkraftsäulen für die SPINE-Interaktionsexperimente genutzt; die FPLC-Säule zur Reinigung von Enzymen in größerem Maßstab für die aktivitätsbasierten Assays.

Für die Anreicherung von Protein(komplexen) aus Kulturvolumina ≤ 100 mL erfolgte der Zellaufschluss nach Einengung durch Zentrifugation mittels Schwingmühle (1,2 g Glaskügelchen pro Aufschluss im 1,5 mL-Reaktionsgefäß, 15 min. bei voller Leistung). Für größere Kulturvolumina erfolgte der Aufschluss mittels French Press (2000 bar, 10 °C, je Probe 2-3 Durchläufe). Für beide Verfahren wurde der Zellniederschlag zuvor in Puffer W resuspendiert und mit Proteaseinhibitor-Gemisch (*cOmplete[™]* von Roche Life Science) nach Herstellerangaben versetzt. Nach Aufschluss wurden die unlöslichen Zell-

fragmente durch zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte (8.000 x g, 15 min., 4 °C; dann 108.000 x g, 30 min., 4 °C) abgetrennt und der zellfreie Extrakt für die Chromatographie eingesetzt.

Die Anreicherung von Proteinkomplexen mit den Zentrifugen- bzw. Schwerkraftsäulen erfolgte gemäß Herstellerangaben; es wurde lediglich die Anzahl an Waschschritten erhöht, um ein reineres Protein zu erhalten.

Für die Aufreinigung mittels FPLC-System (*ÄKTApurifier*) wurde zunächst die Affinitätssäule mit 5 CV (Säulenvolumen, \cong 5 mL) Puffer W (Chromatographie-Puffer in Tabelle 3.2) äquilibriert (Flussrate 2 mL/min, Maximaldruck 0,3 MPa). Nach Auftrag des zellfreien Extraktes mittels 10 mL-Probenschleife wurde solange gespült, bis das UV-Signal wieder unter 5 mAU gesunken war. Danach erfolgte die Elution mit Puffer E und proteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt. Zur Regeneration der Säule wurde mit 15 CV Puffer R gespült. Die Entfernung des im Regenerationspuffer enthaltenen Farbstoffkomplexes erfolgte durch Spülen mit 8 CV TRIS-Puffer sowie 2 CV NaOH-Lösung. Direkt im Anschluss wurde die Säule wieder in Puffer W eingespült und auch im selbigen Puffer bei 4 °C bis zur nächsten Verwendung gelagert.

Tabelle 3.2: Verwendete Puffer und Lösungen für die Reinigung der Strep-Fusionsproteine. Der Regenerationspuffer wurde als 10 x-Konzentrat von IBA bezogen; die anderen Lösungen wurden selbst hergestellt.

Puffer	Zusammensetzung
Puffer W (Waschpuffer)	100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA
Puffer E (Elutionspuffer)	100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 10 mM D-Desthiobiotin
Puffer R (Regenerationspuffer)	100 mM TRIS/HCl, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 1 mM HABA (hydroxy-azophenyl-benzoic acid), pH 8.0
Puffer BE (Elutionspuffer für <i>spin columns</i>)	100 mM TRIS/HCl pH 8,0, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA, 2 mM D-Biotin
Puffer W pH 10,5	100 mM TRIS/HCl pH 10,5, 150 mM Natriumchlorid, 1 mM EDTA
TRIS-Puffer	100 mM TRIS Base
NaOH-Lösung	100 mM NaOH

3.3.3 Pufferwechsel, Aufkonzentrierung sowie Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Der Pufferwechsel der aufgereinigten Proteine erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie mit der Säule *HiPrep 26/10 Desalting* (53 mL) von GE Healthcare am FPLC-System *ÄKTApurifier*. Die Proteine wurden dabei von Puffer W in PBS (Sambrook *et al.*, 2001) überführt.

Sofern eine Aufkonzentrierung der Proteinfractionen für nachfolgende Experimente notwendig war, wurde diese mittels Zentrifugalkonzentratoren durchgeführt. Je nach Probenvolumen wurden die Konzentratoren *Vivaspin 20* und *Vivaspin 6* (Polyethersulfon-Membranen mit einem *molecular weight cut-off* (MWCO) von 10.000) von GE Healthcare bzw. *Microcon YM-10* (ebenfalls 10.000 MWCO) von Millipore gemäß Herstellerangaben verwendet.

Die Konzentrationsbestimmung proteinhaltiger Lösungen erfolgte mittels *Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (#500-0006) in 1 mL-Halbmikroküvetten gemäß Angaben des Herstellers nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Die Umrechnung der Absorption bei 595 nm in eine apparente Proteinkonzentration erfolgte mittels BSA (Rinderserumalbumin)-Kalibriergerade.

3.3.4 Analyse und Identifizierung von Proteinen mittels SDS-PAGE, Dot Blot und Western Blot

Die Größenauftrennung von Proteingemischen erfolgte mittels SDS-PAGE unter Verwendung vorgefertigter Gele (*Mini-PROTEAN[®] TGX[™] Any kD[™]*) und Elektrophoresekammern (*Mini-PROTEAN Tetra System*) von Bio-Rad Laboratories. Die zu analysierenden Proben wurden mit 2 x-SDS-Probenpuffer (Pufferzusammensetzungen in Tabelle 3.3) gemischt und 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese im TRIS-Glycin-Laufpuffer (Laemmli, 1970) erfolgte bei 100-150 V mit anschließender Färbung des Gels mittels *PageBlue Protein Staining Solution* von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers.

Tabelle 3.3: Verwendete Puffer und Reagenzien für SDS-PAGE und Western Blot

Lösung	Zusammensetzung
Blockierungslösung	PBS mit 3 % (w/v) BSA, 0,5 % (v/v) Tween 20
PBS	10 x-Puffer: 140 mM Natriumchlorid, 10 mM Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat, autoklavieren. Vor Benutzung wurde entsprechend verdünnt.
PBST	PBS mit 0,1 % (v/v) Tween 20
SDS-Probenpuffer, reduzierend (2 x)	126 mM TRIS/HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 20 mM DTT
Towbin-Puffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20 % Methanol
TRIS-Glycin-Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS; pH 8,3

Für einen immunologischen Nachweis („Western Blot“) der im Polyacrylamid-Gel aufgetrennten Proteine wurden diese bei 0,04 Ampere pro Gel eine Stunde lang auf eine Nitrocellulosemembran (*Amersham™ Protran™ Premium 0,2 µm NC* von GE Healthcare Life Science) transferiert. Für den Transfer wurde der sog. Towbin-Puffer (Towbin *et al.*, 1979) verwendet.

Der Nachweis von Strep-Tag-markierten Proteinen erfolgte mittels *StrepMAB-Classic, HRP conjugate* (Katalog-Nr. 2-1509-001) der IBA GmbH nach den Angaben des Herstellers.

Der Nachweis der *B. subtilis* Citratsynthase (CitZ), Isocitrat-Dehydrogenase (Icd) und Malat-Dehydrogenase (Mdh) erfolgte mittels polyklonaler Antiseren aus dem Kaninchen gegen die jeweiligen Proteine. Die Antiseren gegen CitZ und Icd wurden von Prof. Sonenshein, Tufts University, Boston, MA zur Verfügung gestellt. Das Anti-Mdh-Serum wurde von der Davids Biotechnologie GmbH in Regensburg bezogen. Zur Herstellung wurde der Firma ein Aliquot gereinigter Strep-Mdh in PBS zur Immunisierung eines Kaninchens zur Verfügung gestellt. Nach Gewinnung des Antiserums wurde zusätzlich eine Anti-Tag-Depletion zur Abreicherung von Antikörpern gegen das Strep-Tag-Peptid durchgeführt. Damit war ein Nachweis von Mdh ohne Kreuzreaktivitäten gegen andere Strep-Fusionsproteine möglich.

Für den Nachweis von CitZ, Icd und Mdh wurde die Membran nach dem Elektrotransfer der Proteine 10 Minuten in PBS inkubiert. Danach wurde die Membran 30 Minuten mit 20 mL Blockierungslösung versetzt und anschließend 3 Mal 5 Minuten mit je 20 mL PBST gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Erstantikörper (α -CitZ, -Icd oder -Mdh, 1:8.000 in PBST) eine Stunde lang bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C. Der folgende Waschschrift erfolgte wie zuvor beschrieben. Der Zweitantikörper (*Anti-Rabbit IgG (whole molecule)–Peroxidase antibody produced in goat* von Sigma-Aldrich, Katalog-Nr.: A0545) wurde 1:20.000 in PBST verdünnt und ebenfalls eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift (s.o.) erfolgte die Detektion der Proteine entweder kolorimetrisch mittels *Pierce™ CN/DAB Substrate Kit* gemäß Angaben des Herstellers oder chemilumineszent mittels Lumi-Imager™ F1 von Roche Diagnostics unter Verwendung des *SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate* von Thermo Fisher Scientific nach den Angaben des Herstellers.

Dot Blots wurden zur Etablierung des zuvor beschriebenen Western Blot-Protokolls für den Nachweis von CitZ, Icd und Mdh durchgeführt. Dazu wurden pro Probe 5 µL der gereinigten Antigenlösung (0,5 mg/mL) punktförmig auf 1 cm² Nitrocellulosemembran aufgetragen und getrocknet. Die weiteren Schritte (Blockierung sowie Inkubation mit Erst- und Zweitantikörper) erfolgten wie zuvor beschrieben, jedoch mit unterschiedlichen Antikörperkonzentrationen zur Ermittlung des optimalen Verdünnungsbereichs.

3.3.5 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels SPINE

Das „*strep-protein interaction experiment*“ (SPINE) wurde zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) *in vivo* genutzt (Herzberg *et al.*, 2007). Zur Durchführung des Experiments und Nachweis der PPI in *B. subtilis* wurde der entsprechende Stamm (Wildtyp, Integrationsmutante 1 oder 2; siehe Abbildung 4.21 auf Seite 71) in insgesamt 2 L *B. subtilis*-C-Malat-MM bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von ca. 2,5 pro Milliliter (spätexponentiell) kultiviert und die Kultur anschließend geteilt. Ein Teil wurde auf Eis gekühlt, der andere Teil wurde mit 4 % Formaldehyd in PBS pH 6,5 (0,6 % Formaldehyd final) versetzt und 15 Minuten bei 30 °C zur Vernetzung der PPI inkubiert. Die Zellmasse wurde für beide Ansätze durch Zentrifugation vom Nährmedium abgetrennt und zweimal mit dem Aufschlusspuffer (Puffer W) gewaschen. Der Zellaufschluss erfolgte mittels French Press. Nach Reinigung der Proteinkomplexe (siehe 3.3.2) wurde das Eluat mittels Microcon-Säulchen eingeeengt, mit SDS-Probenpuffer gemischt und 20 Minuten bei 95 °C zur Spaltung der Protein-Protein-Komplexe aufgeköcht. Die Analyse der Eluate erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot.

Für den Nachweis von PPI in *E. coli* wurde der entsprechende Expressionsstamm (BL21 (DE3) mit rekombinantem pET24a) in 100 mL LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von ca. 0,8 pro Milliliter (exponentiell) kultiviert. Dann erfolgte die Induktion der Genexpression durch Zugabe von 400 µM IPTG und eine 3-stündige Expressionsphase bei 30 °C. Danach wurde die Kultur wie oben beschrieben mit Formaldehyd versetzt und weitere 10 Minuten bei 30 °C inkubiert. Nach Abtrennung der Zellmasse durch Zentrifugation wurden der Zellniederschlag einmal mit Puffer W gewaschen und mittels Schwingmühle aufgeschlossen (siehe 3.3.2). Nach Reinigung der Proteinkomplexe erfolgte die Detektion der potentiellen Interaktionspartner mittels aktivitätsbasierter Assays für CS, ICD und MDH.

3.3.6 Analyse von Protein-Protein-Interaktionen mittels Sulfo-SDAD und DTSSP

Die kovalente Vernetzung von Protein-Interaktionspartnern *in vitro* erfolgte mit den bifunktionellen Quervernetzern DTSSP und Sulfo-SDAD von Thermo Fisher Scientific. Zur Verwendung des homobifunktionellen Quervernetzers DTSSP wurden zunächst die „Köderproteine“ als rekombinante Strep-Tag-Fusion exprimiert und aufgereinigt. Nach Umpuffern in PBS wurden die Eluate auf 1 mg/mL eingestellt und je 100 µL einer Mischung potentieller Interaktionspartner mit 10 µL einer 7,75 mM DTSSP-Lösung in PBS

gemischt; dies entspricht einem 50-fachen molaren Überschuss an Quervernetzer zu Protein. Der Reaktionsansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zugabe von 5 μL 1 M TRIS-Lösung pH 7,5 und weiterer 15-minütiger Inkubation abgestoppt. Die Analyse der PPI erfolgte mittels SDS-PAGE. Zur Bestimmung von PPI mit dem heterobifunktionellen Quervernetzer Sulfo-SDAD wurden die Köderproteine nach Reinigung und Umpuffern ebenso auf 1 mg/mL eingestellt und je 500 μL davon mit 60 μL einer 10 mM Sulfo-SDAD-Lösung in PBS gemischt (\cong 50-fach molarer Überschuss an Quervernetzer zu Protein). Nach 2 Stunden Inkubation im Dunkeln auf Eis wurde die Reaktion durch Zugabe von 55,5 μL 1 M TRIS pH 7,5 und weiterer 15-minütiger Inkubation abgestoppt. Überschüssiger, nicht an Protein gebundener Quervernetzer wurde im folgenden Schritt durch die Microcon Zentrifugalkonzentratoren abgereichert (Einengen des Reaktionsansatzes auf \leq 50 μL , dann mit PBS wieder auf 500 μL auffüllen und diese Prozedur noch zweimal wiederholen). Der gesamte konzentrierte Reaktionsansatz wurde dann zu 250 μL konzentriertem *B. subtilis* bzw. *E. coli*-Lysat (gewonnen aus spätexponentiellen Kulturen der entsprechenden Wildtyp-Stämme) gegeben, die Probe(n) in eine 24-Well-Platte überführt und eine Stunde unter UV-Licht (366 nm, 8 Watt) mit geringem Abstand zur Strahlungsquelle unter Kühlung inkubiert. Die somit vernetzten Proteinkomplexe wurde im letzten Schritt mittels Strep-Tactin Zentrifugensäulchen aus dem zellfreien Rohextrakt aufgereinigt und per SDS-PAGE und Western Blot weiter analysiert.

3.3.7 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Identifizierung von Proteinkomplexen interagierender Enzyme erfolgte mittels des Merck/Hitachi HPLC-Systems LaChrom[®]. Zur Auftrennung der proteinhaltigen Proben wurde die SEC-Säule „BioSep SEC-S3000“ von Phenomenex (Maximaldruck 103 bar) bei einer Flussrate von 0,5 mL/min verwendet. Die verwendeten Laufmittel sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Verwendete Laufmittel für die SEC-Analysen

Lösung	Zusammensetzung
Nativer Laufpuffer	50 mM Natriumdihydrogenphosphat, 300 mM Natriumchlorid; pH 7,0
Denaturierender Laufpuffer	Nativer Laufpuffer mit 6 M Guanidiniumchlorid
Reinigungspuffer	50 mM Natriumcitrat; pH 3,0
Lagerungspuffer	10 % (v/v) Methanol in H ₂ O

3.3.8 Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Versuche zur isothermen Titrationskalorimetrie wurden mit dem Mikrotitrationskalorimeter MicroCal iTC200 von Malvern Instruments Ltd. durchgeführt. Zur Bestimmung der Interaktionsparameter für *B. subtilis* CitZ und Mdh wurden die gereinigten Enzyme gegen PBS im gleichen Gefäß mittels „Slide-A-Lyzer® G2 Dialysekassetten“ mit 10.000 MWCO von Thermo Fisher Scientific dialysiert, damit beide Enzyme im identischen Puffer vorlagen. Für die Messreihen wurde entweder CitZ oder Mdh in die Messzelle (200 µL) vorgelegt und das jeweils andere Enzym mittels Spritze (40 µL Gesamtvolumen) injiziert. Dabei erfolgte die Erstinjektion in einer Messreihe mit 0,4 µL Probenvolumen; alle weiteren Injektionen erfolgten mit 1,5 µL Probenvolumen. Injiziert wurde über 3 Sekunden mit einem *spacing* (Zeit zwischen den Injektionen) von 180 Sekunden. Die Messungen erfolgten bei 30 °C.

3.3.9 Enzymassays zur Aktivitätsbestimmung

Die Bestimmung der Enzymaktivitäten von CS, ICD und MDH erfolgte mittels Enzymassays entweder im Küvettenphotometer (Maßstab 1 mL) oder im Mikrotiterplatten(MTP)photometer (je 96 Kavitäten mit Rundboden, Maßstab 0,1 mL). Die entsprechenden Pipettierschemata sind tabellarisch nachfolgend dargestellt (Tabelle 3.5-3.7). Die Reagenzien wurden in der beschriebenen Reihenfolge pipettiert. Sämtliche Reagenzien wurden vor Ansatz der Reaktionsgemische frisch angesetzt.

Tabelle 3.5: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Citratsynthase-Aktivität bei 412 nm (Küvette) bzw. 410 nm (MTP). Vor Zugabe von Oxalacetat wurde die endogene Aktivität (Anwesenheit freier Thiolgruppen bzw. Deacetylaseaktivität) bestimmt und am Schluss von der Gesamtaktivität abgezogen. Methode nach (Srere *et al.*, 1963).

Reagenz	Küvette	MTP
PBS	920 µL	92 µL
30 mM Acetyl-CoA in H ₂ O	10 µL	1 µL
10 mM DTNB in EtOH	10 µL	1 µL
Enzymlösung	10 µL	1 µL
<i>Ansatz 5 Minuten bei 25 °C Äquilibrieren, dann Start der Reaktion durch Zugabe von</i>		
10 mM Oxalacetat in PBS	50 µL	5 µL

Tabelle 3.6: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Isocitrat-Dehydrogenase-Aktivität bei 340 nm. Methode nach (Bergmeyer, 1986).

Reagenz	Küvette	MTP
H ₂ O	703 µL	70,3 µL
250 mM Glycylglycin pH 7,4	167 µL	16,7 µL
8,8 mM Isocitrat in Glycylglycin-Puffer	50 µL	5 µL
20 mM NADP in H ₂ O	50 µL	5 µL
30 mM Manganchlorid in H ₂ O	20 µL	2 µL
<i>Ansatz 5 Minuten bei 37 °C Äquilibrieren, dann Start der Reaktion durch Zugabe von</i>		
Enzymlösung	10 µL	1 µL

Tabelle 3.7: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der Malat-Dehydrogenase-Aktivität bei 340 nm. Methode nach (Bergmeyer, 1986).

Reagenz	Küvette	MTP
PBS	945 µL	70 µL
10 mM Oxalacetat in PBS	25 µL	25 µL
20 mM NADH in H ₂ O	20 µL	4 µL
<i>Ansatz 5 Minuten bei 37 °C Äquilibrieren, dann Start der Reaktion durch Zugabe von</i>		
Enzymlösung	10 µL	1 µL

Die Bestimmung der sequentiellen MDH/CS-Aktivität erfolgte durch den nachfolgend dargestellten Assay (Tabelle 3.8). Malat wird durch die Malat-Dehydrogenase zu Oxalacetat oxidiert, während NAD^+ zu NADH reduziert wird. Die Citratsynthase katalysiert die nachfolgende Aldol-Kondensation des entstandenen Oxalacetats mit Acetyl-CoA zu Citrat.

Tabelle 3.8: Pipettierschema zur photometrischen Bestimmung der zusammengesetzten Citratsynthase und Malat-Dehydrogenase-Aktivität bei 412 nm (Küvette) bzw. 410 nm (MTP). Je nach Experiment wurden zusätzlich *crowding agents* wie BSA oder Ficoll 70 sowie weitere Enzyme zugesetzt und entsprechend weniger PBS eingesetzt.

Reagenz	Küvette	MTP
PBS	700 μL	70 μL
30 mM Acetyl-CoA in H_2O	10 μL	1 μL
10 mM DTNB in EtOH	10 μL	1 μL
15 mg/mL NAD^+ in PBS	10 μL	1 μL
Enzymmischung	20 μL	2 μL
<i>Ansatz 5 Minuten bei 25 °C Äquilibrieren, dann Start der Reaktion durch Zugabe von</i>		
2 mM Malat in PBS	250 μL	25 μL

Die Berechnung der Volumenaktivität (Units/mL) bzw. der spezifischen Aktivität (Units/mg) erfolgte mit Hilfe der folgenden Zusammenhänge (Bisswanger, 2012):

$$\frac{\text{Units}}{\text{mL}} = \frac{\frac{\text{Absorption}}{\text{min}} \times \text{Assayvolumen [mL]} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10\,000}{\varepsilon \left[\frac{\text{L}}{\text{mol} \times \text{cm}} \right] \times \text{Schichtdicke [cm]} \times \text{Enzymvolumen [mL]}}$$

$$\frac{\text{Units}}{\text{mg}} = \frac{\frac{\text{Units}}{\text{mL}}}{\text{Proteinkonzentration} \left[\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right]}$$

Die in den Formeln verwendeten Einheiten sind in nachfolgender Tabelle 3.9 (S. 44) beschrieben.

Tabelle 3.9: Einheiten zur Berechnung von Enzymaktivitäten.

Einheit	Erklärung
Absorption/min	Absorptionsänderung pro Minute bei bestimmter Wellenlänge im linearen Bereich
Assayvolumen	Küvette = 1 mL, MTP = 0,1 mL
ϵ	Molarer Absorptionskoeffizient [L/mol/cm] $\epsilon_{\text{TNB}} = 13.600$ (CS-Assay) $\epsilon_{\text{NAD(P)H}} = 6.300$ (ICD und MDH-Assay)
Schichtdicke	Küvette = 1 cm; MTP = 0,2275 cm (experimentell bestimmt)
Units/mg	Spezifische Aktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$]
Units/mL	Volumenaktivität [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mL}$]

4 Ergebnisse

Am Beispiel von Enzymen des Citratzyklus in *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) und *Escherichia coli* (*E. coli*) wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) deren Aktivität steigert. Als Modellenzyme wurden die Citratsynthase (CS), die Malat-Dehydrogenase (MDH) sowie die Isocitrat-Dehydrogenase (ICD) ausgewählt, deren Aktivität sich mittels etablierter Enzymassays *in vitro* einfach bestimmen lässt. Die ersten beiden Enzyme katalysieren sequentielle Reaktionen des Citratzyklus und sind mit dem dritten Enzym schon in der Literatur als potentielle Interaktionspartner beschrieben, die in *B. subtilis* das zentrale Metabolon im Citratzyklus bilden (Meyer *et al.*, 2011).

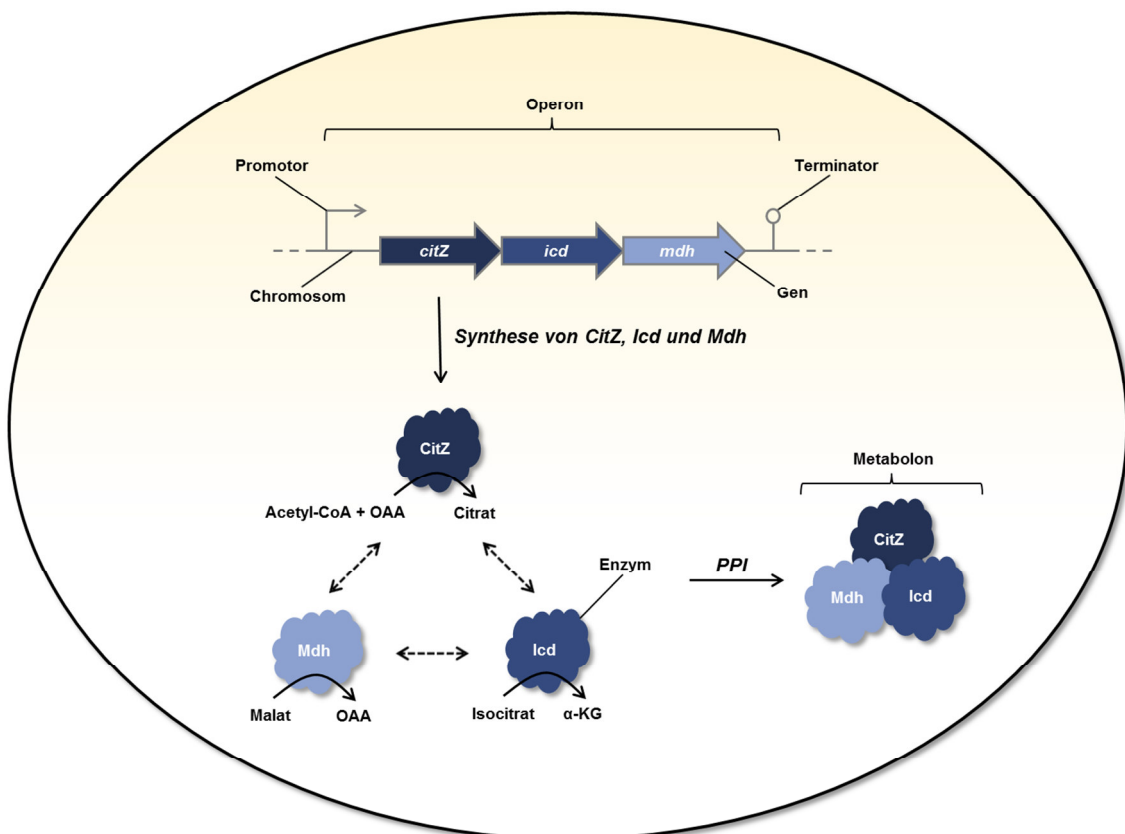


Abbildung 4.1: Schema einer *B. subtilis*-Zelle mit einem Ausschnitt des Chromosoms, der die Gene *citZ*, *icd* und *mdh* zeigt, sowie die Synthese der Genprodukte in räumlicher Nähe zueinander mit anschließender Protein-Protein-Interaktion (PPI) zur Bildung eines Metabolons. In dieser Arbeit wurde neben dem Einfluss der Organisation von *citZ*, *icd* und *mdh* als Operon auf die Förderung der Komplexbildung der Genprodukte auch die mögliche Aktivitätssteigerung, sobald diese Enzyme interagieren, untersucht.

Neben einer möglichen Aktivitätssteigerung der Enzyme in einem Proteinkomplex sollte modellhaft der mögliche Einfluss einer genetischen Organisationseinheit auf die Förderung der Komplexbildung der zuvor genannten Citratzyklus-Enzyme nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 45). Die entsprechenden Gene dieser Enzyme sind in *B. subtilis* in einem Operon (*citZ-icd-mdh*-Operon) organisiert. Derartige Transkriptionseinheiten sind in Prokaryoten häufig und sorgen dafür, dass die in einem Stoffwechselweg aktiven Proteine koordiniert gebildet werden. Die Arbeitshypothese ist dabei, dass durch die räumliche Nähe der Genprodukte nach der Translation eine Komplexbildung begünstigt wird. An diesen Komplexen kann durch direkte Weitergabe eines Intermediats zwischen den aktiven Zentren verschiedener Enzyme (*substrate channeling*) eine Kanalisierung des Substratflusses und damit eine Beschleunigung der Reaktionskaskade stattfinden.

Im Folgenden ist zunächst der Nachweis der PPI der *B. subtilis*-Enzyme CitZ, Icd und Mdh gezeigt (Kapitel 4.1). Die Ergebnisse dieser Arbeiten waren Voraussetzung für die nachfolgenden Untersuchungen. In Kapitel 4.2 und 4.3 sind Experimente zur Analyse der Aktivität des CS-MDH-Enzymkomplexes unter verschiedenen Bedingungen dargestellt, deren Ergebnisse auf eine gesteigerte Aktivität der interagierenden Enzyme hindeuten. Durch Trennung des *citZ-icd-mdh*-Operons in *B. subtilis* konnte der positive Einfluss einer Operonstruktur auf die Komplexbildung der Genprodukte gezeigt werden (Kapitel 4.4). Im letzten Abschnitt des Ergebnisteils wurde der in Kapitel 4.4 nachgewiesene Zusammenhang in *E. coli* anhand eines artifiziellen Operons der Enzyme *gltA*, *icd* und *mdh* untersucht (Kapitel 4.5).

4.1 Nachweis der Protein-Protein-Interaktion von *B. subtilis* CitZ, Icd und Mdh

In diesem Kapitel wird die Analyse der PPI der Citratsynthase (CitZ), Isocitrat-Dehydrogenase (Icd) und Malat-Dehydrogenase (Mdh) aus *B. subtilis*, die als Enzymkomplex das zentrale Metabolon des Citratzyklus bilden (Meyer *et al.*, 2011), beschrieben. Diese Interaktion konnte mit Hilfe verschiedener Techniken, wie der Größenausschlusschromatographie, der isothermen Titrationskalorimetrie sowie eines Verfahrens zur kovalenten Quervernetzung von Interaktionspartnern bestätigt und charakterisiert werden. Die Verifizierung der Interaktion erfolgte mit Hilfe von Reagenzien zur Vernetzung von Proteinen (DTSSP und Sulfo-SDAD, siehe 4.1.2 und 4.1.3). Versuche zur Coelution der Enzyme mittels Größenausschlusschromatographie sowie eine Analyse mittels isothermer Titrationskalorimetrie deuten auf eine transiente Interaktion der drei Citratzyklus-Enzyme hin (Kapitel 4.1.4). Als Ausgangsmaterial für diese *in vitro*-Interaktionsstudien dienten gereinigte Enzyme als Strep-Tag-Fusion (*N*-terminal), deren Darstellung im Folgenden gezeigt ist.

4.1.1 Proteinreinigung von CitZ, Icd und Mdh

Die heterologe Expression von *B. subtilis citZ*, *icd* und *mdh* in *E. coli* erfolgte mit dem Strep-Tag Expressionsvektor pGP172. Zellfreier Extrakt einer solchen Expressionskultur diente als Ausgangsmaterial für die Reinigung von CitZ, Icd und Mdh, die mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität erfolgte. Es konnten hochreine Proteinfractionen gewonnen werden. Der durch diese Methode erreichte hohe Reinheitsgrad der Enzyme war Voraussetzung für die nachfolgend dargestellten Analysen zur PPI. Abbildung 4.2 (Seite 48) zeigt beispielhaft eine solche Aufreinigung.

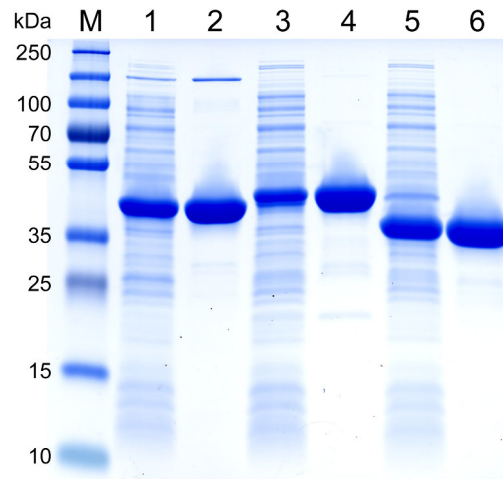


Abbildung 4.2: Reinigung von CitZ, Icd und Mdh aus *B. subtilis* mittels Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Dargestellt ist eine SDS-PAGE-Analyse der gereinigten Proteinfractionen aus *E. coli*-Rohextrakten. 1, CitZ Rohextrakt; 2, CitZ Eluat; 3, Icd Rohextrakt; 4, Icd Eluat; 5, Mdh Rohextrakt; 6, Mdh Eluat; M, Molekulargewichtsmarker. Bei der zusätzlichen Bande im hochmolekularen Bereich von Spur 2 handelt es sich um ein Multimer von CitZ; dies konnte mittels Western Blot bestätigt werden. Es wurden pro Spur 10 µg Protein aufgetragen.

4.1.2 CitZ und Mdh bilden bei Vernetzung mit DTSSP hochmolekulare Aggregate

Die Komplexbildung von CitZ und Mdh wurde mit dem Proteinvernetzer DTSSP (3,3'-Dithiobis(sulfosuccinimidylpropionat); (1) Abb. 4.3 auf Seite 49) untersucht. Dieser homobifunktionelle Quervernetzer wurde verwendet, um in einem Vorversuch die Möglichkeit der kovalenten Vernetzung von Proteinaggregaten und damit deren Interaktion zu untersuchen. Die Vernetzung von zwei Proteinen erfolgt hierbei jeweils durch den Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimid(NHS)-Ester. Damit können sowohl Proteinuntereinheiten desselben Proteins, als auch verschiedene Proteine, die sich in räumlicher Nähe befinden (12 Å Spacer-Armlänge), über eine primäre Aminogruppe vernetzt werden. Obwohl mit dieser Technik durch eine ungerichtete Vernetzung an beiden Enden des Quervernetzers kein spezifischer Nachweis für eine PPI erbracht werden kann, lassen sich dennoch bei der Verwendung von zwei aufgereinigten potentiellen Interaktionspartnern Aussagen über deren Komplexbildung *in vitro* machen, indem die Bildung von Aggregaten im Vergleich zu einer nicht vernetzen Kontrolle beobachtet werden kann. In Abbildung 4.3 ist sowohl die Struktur des Quervernetzers, als auch ein Schema der durchgeführten Reaktion dargestellt.

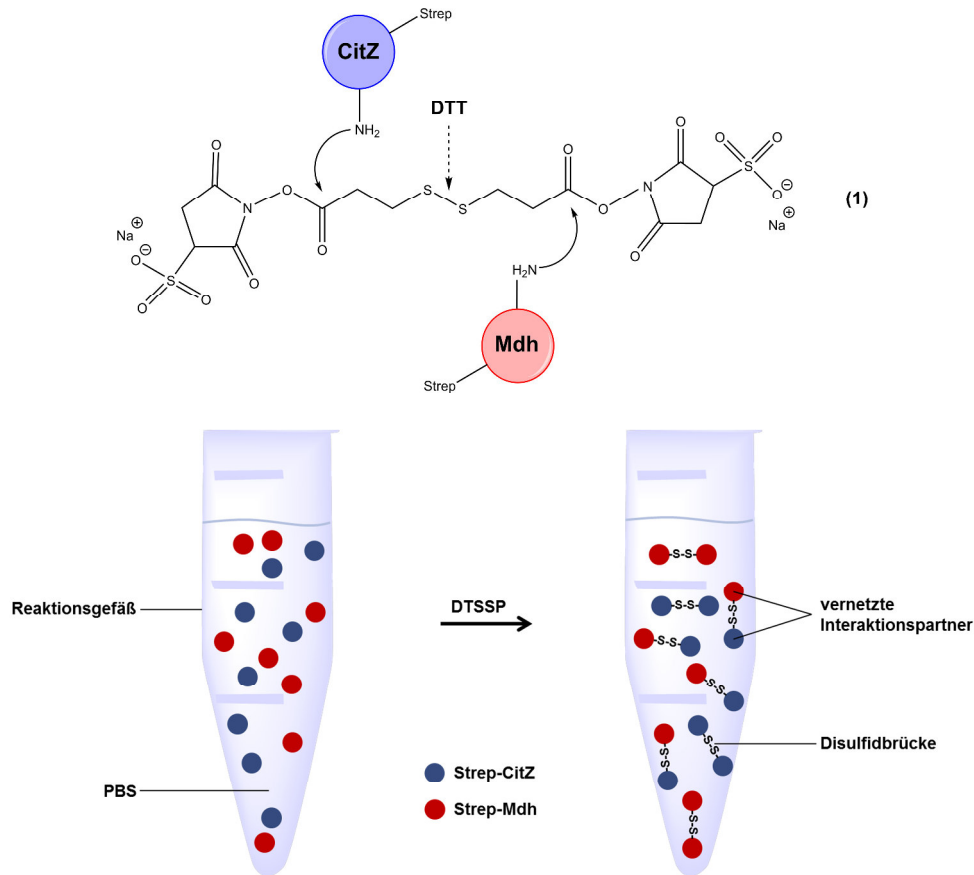


Abbildung 4.3: Schema zur Vernetzung von CitZ und Mdh mittels DTSSP (1). Eine solche Vernetzung ist bei Proteinen, die sich in räumlicher Nähe befinden, wahrscheinlicher. DTSSP ist ein wasserlöslicher, homobifunktionaler Quervernetzer (MW 404,42) mit einer Spacer-Länge von 12 Å. Der Quervernetzer wurde zur einer äquimolaren Mischung von CitZ und Mdh in PBS-Puffer zur Vernetzung der Proteinkomplexe gegeben.

CitZ und Mdh dienten bei der Analyse als Modellproteine und wurden jeweils einzeln und zusammen mit dem Quervernetzer inkubiert. Als Negativkontrolle wurde Myoglobin ebenso mit DTSSP inkubiert, das keine Multimerisierung zeigt. Durch die Disulfidbrücke im Zentrum des Quervernetzers lassen sich die Proteinkomplexe durch Verwendung eines Reduktionsmittels (Dithiothreitol, DTT) wieder auflösen. Nachfolgend dargestellt ist ein SDS-PA-Gel zur Analyse der mit DTSSP vernetzten Proteinmischungen (Abb. 4.4 auf Seite 50).

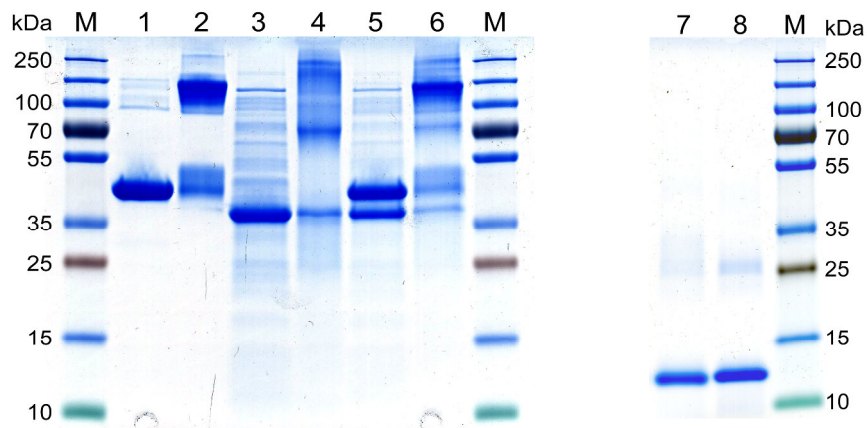


Abbildung 4.4: Analyse der durch DTSSP vernetzten Proteine mittels SDS-PAGE. 1, CitZ +DTT; 2, CitZ -DTT; 3, Mdh +DTT; 4, Mdh -DTT; 5, CitZ und Mdh +DTT; 6, CitZ und Mdh -DTT; 7, Myoglobin +DTT; 8, Myoglobin -DTT; M, Molekulargewichtsmarker. Pro Reaktionsansatz wurden 6 µg Gesamtprotein aufgetragen.

Im Coomassie-gefärbten Gel sind bei den vernetzten Fraktionen („-DTT“, also mit intakter Disulfidbrücke zwischen den beiden Proteinen) Komplexe im Größenbereich von über 100 kDa sichtbar. Damit erfolgte ein deutlicher Shift in den hochmolekularen Bereich im Vergleich zur gleichen Probe unter reduzierenden Bedingungen („+DTT“). Aussagen zur Stöchiometrie eines Komplexes sowie zum Anteil an komplexiertem Protein sind durch die geringe Auflösung und damit unzureichende Differenzierung von unterschiedlichen Molekulargewichten im Bereich > 100 kDa im verwendeten Gradientengel aber nicht möglich. Neben einer potentiellen PPI zwischen CitZ und Mdh ist bei den einzeln vernetzten Enzymen auch die Bildung von Homopolymeren nachweisbar. CitZ bildet ein Dimer (Jin & Sonenshein, 1994a), Mdh ein Tetramer (Smith *et al.*, 1982). Das Kontrollprotein Myoglobin (Spuren 7 und 8) bildet keine Polymere und zeigt wie erwartet nach Inkubation mit DTSSP nur eine Bande auf Höhe des monomeren Proteins.

4.1.3 CitZ, Icd und Mdh interagieren *in vitro* in zellfreiem Extrakt

Die Interaktion von Proteinen kann permanent oder transient sein, wobei transiente PPI häufig schwach sind (Perkins *et al.*, 2010). Für eine hohe Affinität der Interaktionspartner zueinander müssen oft bestimmte Bedingungen herrschen, die eine Komplexbildung erst ermöglichen. Dies kann die Phosphorylierung eines Interaktionspartners sein, das Vorhandensein einer bestimmten Proteinkonformation oder die Anwesenheit von Substraten oder Cofaktoren. Um diesen intrazellulären Bedingungen möglichst nahe zu kommen, kann man die Proteinkomplexbildung in bakteriellem Zellsat stattfinden lassen und daraus die Interaktionspartner aufreinigen. Ein Nachteil homobifunktionaler Quervernetzer, wie der im letzten Abschnitt verwendete DTSSP, liegt darin, dass bei Verwendung in komplexer Mischung, wie einem Zellsat, durch die enorme Anzahl unterschiedlicher Proteinkomplexe ebenso viele Substrate für die Proteinvernetzung zur Verfügung stehen. Dadurch ist eine gezielte Kopplung der untersuchten Proteine nicht möglich. Dies kann aber mit einem heterobifunktionalen Quervernetzer, wie das in diesem Abschnitt beschriebene Sulfo-SDAD, erreicht werden.

Mit dem im folgenden Experiment verwendeten photoreaktiven, heterobifunktionalen Quervernetzer Sulfo-SDAD (Sulfosuccinimidyl 2-((4,4'-azipentanamido)ethyl)-1,3'-dithiopropionat, (2) Abb. 4.5 auf Seite 52) konnte die Kopplung von Proteinen sowohl räumlich, als auch zeitlich gesteuert werden. Dadurch wurde zunächst das reine Köderprotein an den einen Teil des Quervernetzers (reaktiver NHS-Ester, siehe DTSSP) gebunden (**A**, Abb. 4.5 S. 52). Das mit dem Quervernetzer gekoppelte Protein wurde zu einer komplexen Probe (spätexponentielles, konzentriertes *B. subtilis*-Zellsat) hinzugegeben, woraufhin Proteine, die eine Affinität zum Köder haben, daran binden. Durch Exposition der Probe mit UV-Licht wurden nur die Komplexe, an denen das Köderprotein beteiligt war, über den noch freien Teil des Quervernetzers (Diazirin-Ring) kovalent fixiert und somit für weitere Reinigungsschritte untrennbar gemacht (**B**, Abb. 4.5 S. 52). Damit wurde eine gezielte Vernetzung der untersuchten Protein-Protein-Interaktionspartner erreicht, wodurch eine unspezifische Vernetzung im Vergleich zur Verwendung homobifunktionaler Quervernetzer deutlich reduziert werden konnte. Der vernetzte Proteinkomplex wurde im letzten Schritt durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie aus dem Zellsat isoliert (**C**, Abb. 4.5 S. 52) und mittels Western Blot analysiert.

Abbildung 4.5 zeigt die Struktur des verwendeten Quervernetzers sowie das dreiteilige Reaktionsschema zur Vernetzung und Isolierung der Proteinkomplexe.

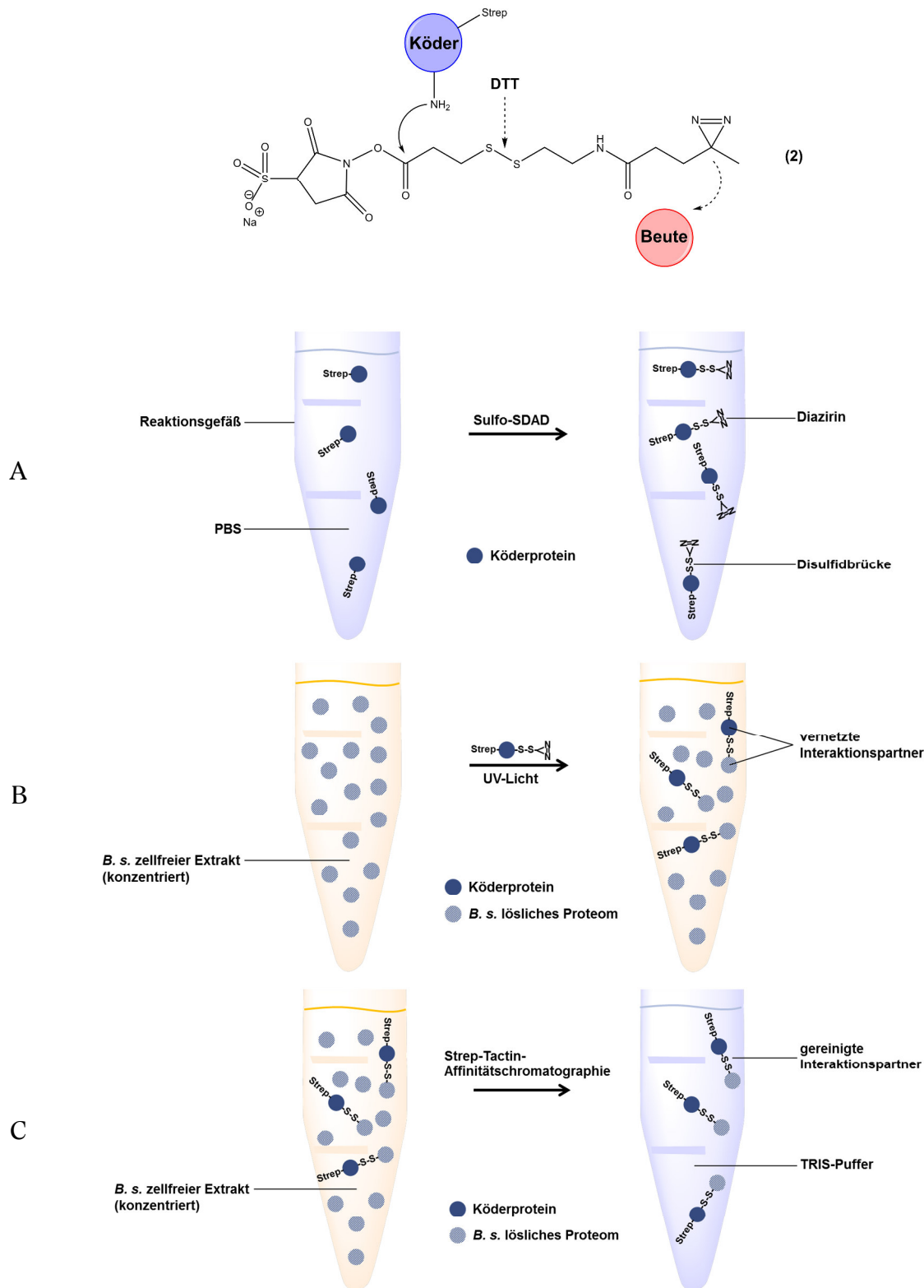












Abbildung 4.5: Schema zur Isolierung von Interaktionspartnern eines Köderproteins mittels Sulfo-SDAD (2). Sulfo-SDAD ist ein wasserlöslicher, heterobifunktionaler Quervernetzer (MW 490,51) mit einer Spacer-Länge von 13,6 Å. Damit ist eine spezifische Vernetzung von Interaktionspartnern in Komplexer Mischung möglich, im Gegensatz zu dem in Abb. 4.3 dargestellten Verfahren zur unspezifischen Vernetzung von Proteinen. Der hier verwendete Quervernetzer wurde zur Detektion der Protein-Protein-Interaktionen von CitZ, Icd und Mdh verwendet. Die Schemata A-C zeigen das Vorgehen zur Vernetzung und Aufreinigung der Interaktionspartner aus *B. subtilis* (*B. s.*).

Mit dem beschriebenen Verfahren konnte die Interaktion von CitZ, Icd und Mdh *in vitro* gezeigt werden. Dabei wurden alle möglichen Kombinationen analysiert; jedes Enzym interagiert mit den jeweils anderen beiden. Da die Molekulargewichte der Enzyme in einem ähnlichen Bereich liegen (CitZ = 41,7 kDa, Icd = 46,4 kDa, Mdh = 33,6 kDa), war eine Unterscheidung im SDS-PA-Gel nicht möglich. Aus diesem Grund erfolgte der Nachweis mit spezifischen Antikörpern (bzw. gereinigten polyklonalen Antisera) gegen die jeweiligen Proteine im Western Blot. Tabelle 4.1 zeigt die isolierten Banden der Western Blot-Analyse nach Spaltung der Proteinkomplexe mit DTT. Die nicht mit DTT behandelten Proben zeigten hochmolekulare Komplexe (teilweise > 250 kDa), was auf einen nativen Proteinkomplex in der Bakterienzelle aller drei Enzyme als Multimere hindeutet. Als Positivkontrolle wurden die gereinigten Enzyme eingesetzt. Die Negativkontrolle erfolgte ohne Köderprotein. Hier sind keine Banden nachweisbar, wodurch die spezifische Bindung von CitZ, Icd und Mdh an die jeweiligen Interaktionspartner bewiesen ist.

Tabelle 4.1: Immunologischer Nachweis der PPI von CitZ, Icd und Mdh in zellfreiem Extrakt mit Hilfe von Sulfo-SDAD. Die Strep-getaggten Köderproteine, die zu dem zellfreien Extrakt gegeben wurden, sind in der linken Spalte aufgelistet. Rechts davon sind die isolierten Banden der entsprechenden Western-Blot-Analyse zum Nachweis des zugehörigen Interaktionspartners dargestellt. Die Detektion durch anti(α)-CitZ, -Icd und -Mdh erfolgte kolorimetrisch (n. a. = nicht analysiert).

Köderprotein	α -CitZ	α -Icd	α -Mdh
Strep-CitZ	n. a.		
Strep-Icd		n. a.	
Strep-Mdh			n. a.
Positivkontrolle (gereinigtes Enzym)			
Negativkontrolle (kein Köderprotein)			

4.1.4 Die Interaktion von CitZ und Mdh ist transient

Zur Verifizierung der mit den Quervernetzern erhaltenen Ergebnisse wurden weitere Methoden zur Bestimmung der genannten PPI verwendet. Zunächst wurde mittels nativer und denaturierender (6 M Guanidiniumchlorid) Größenausschlusschromatographie (SEC) untersucht, ob eine Coelution der Enzyme und damit eine Interaktion nachweisbar ist. Abbildung 4.6 zeigt drei Chromatogramme einer nativen SEC-Analyse. Die Peaks

der einzelnen Enzyme eluieren fast zur gleichen Zeit (19,17 min. bzw. 19,01 min. für CitZ bzw. Mdh). Eine Mischung der beiden Enzyme resultiert in einem Peak, der der Mischung der Einzelenzyme entspricht (19,09 min.), ohne dass diese als Komplex vorliegen. Ein Komplex würde durch das größere Molekulargewicht früher von der Säule eluieren.

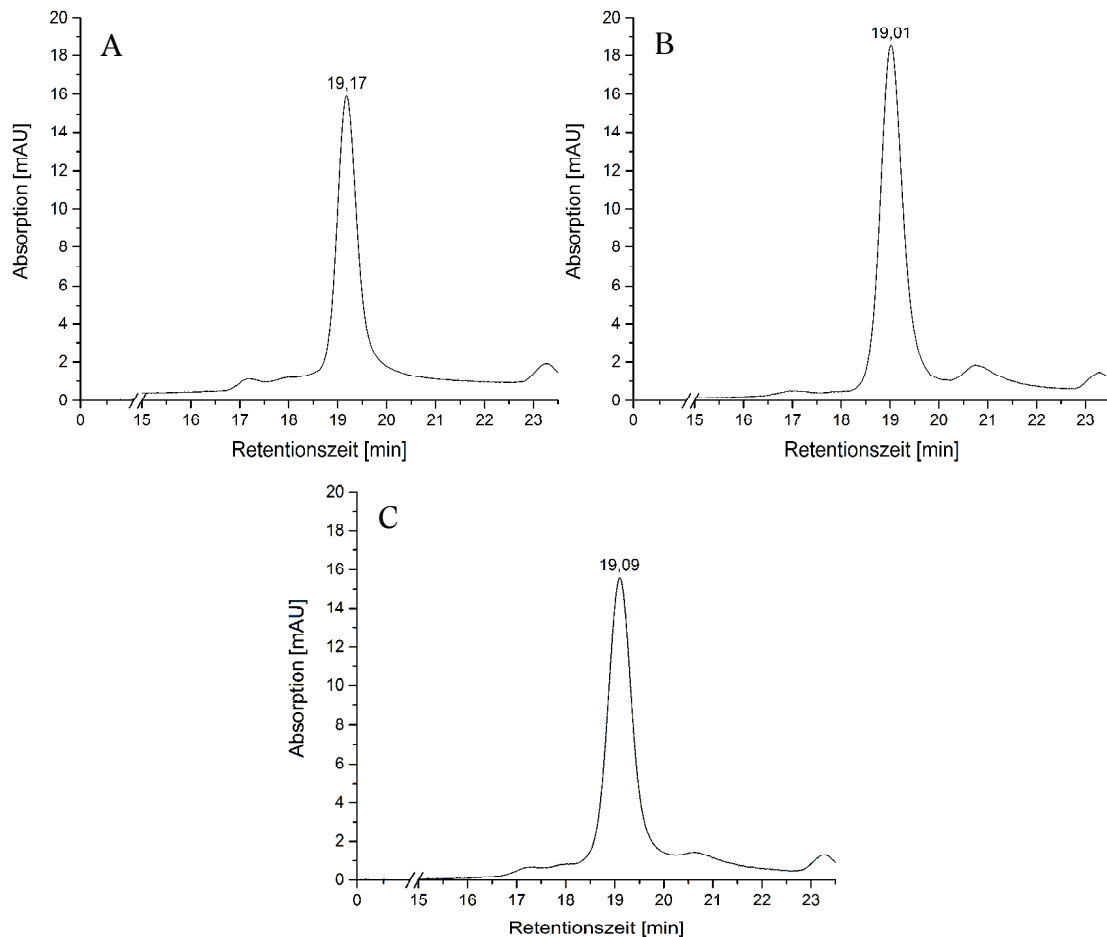


Abbildung 4.6: CitZ und Mdh eluieren nicht als Komplex von einer SEC-Säule. Je 20 μ L einer Probe (1 mg/mL) CitZ (A), Mdh (B) sowie einer Mischung aus CitZ und Mdh (C) wurden mittels Autosampler injiziert und durch die Säule „BioSep SEC-S3000“ von Phenomenex bei einer Flussrate von 0,5 mL/min separiert. Dargestellt sind die Elutionspeaks der jeweiligen Enzyme durch bei Detektion 280 nm. Es findet keine Retentionszeitverschiebung des Peaks in Chromatogramm C (CitZ/Mdh-Mischung) im Vergleich zu den Peaks der einzelnen Enzyme (A und B) und damit keine Coelution eines möglichen Komplexes aus CitZ und Mdh statt. Die Proteine in Probe C wurden vor Injektion 20 h inkubiert, um eine mögliche Interaktion vor Auftrennung zu ermöglichen.

Somit findet in den verwendeten Puffersystemen (100 mM TRIS 150 mM Natriumchlorid 1 mM EDTA als Lösungsmittel sowie 50 mM Natriumdihydrogenphosphat 300 mM Natriumchlorid als SEC-Laufmittel) keine Interaktion der Proteine statt. Mit einem weiteren Versuch zur Bestimmung der PPI, der wesentlich sensitiverer Methode der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC), konnte ebenso keine Interaktion nachgewiesen

werden (Ergebnisse siehe Abbildung 4.7). In keiner Messung konnte bei Injektion ein detektierbares Signal, das eine Bindung von CitZ und Mdh bedeutet, erhalten werden. Als Unterschied zum Vernetzungs-Versuch mit Sulfo-SDAD kommen beim ITC- als auch beim SEC-Experiment technisch bedingte Puffersysteme als Lösungsmittel und Umgebung für die potentiellen Interaktionspartner zum Einsatz. Die Verwendung von gereinigten Enzymen in einem Puffersystem spiegelt nicht die nativen Bedingungen innerhalb der Bakterienzelle (z. B. hohe Konzentration an verschiedenen Makromolekülen, Anwesenheit von Substraten, Produkten und Cofaktoren) wieder. Da im Interaktionsversuch mit Sulfo-SDAD, wo die eigentliche PPI in komplexer, natürlicher Matrix (dem *B. subtilis* Zelllysate) stattfindet, die Interaktion gezeigt werden konnte, kann von einer transienten Interaktion von CitZ, Icd und Mdh ausgegangen werden. Das Zelllysate enthält neben den Interaktionspartnern in nativer Umgebung sämtliche intrazelluläre Komponenten, die die Komplexierung der Enzyme begünstigen oder erst ermöglichen.

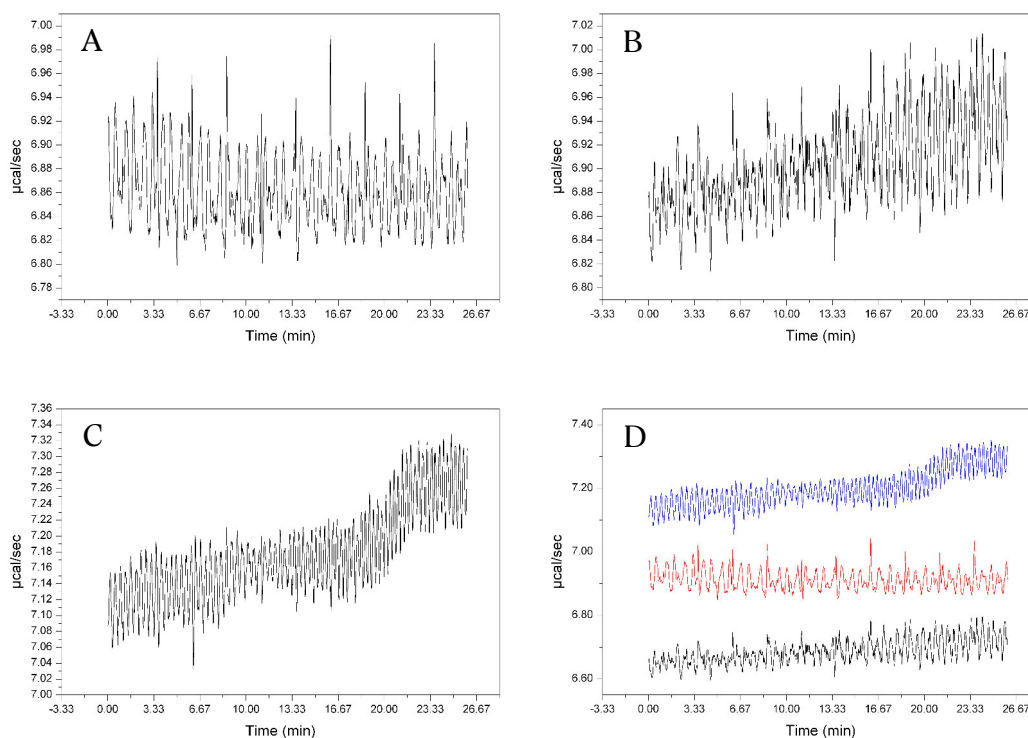


Abbildung 4.7: ITC-Analyse zur Bestimmung der PPI zwischen CitZ und Mdh in PBS. Die dargestellten Diagramme A-C entsprechen jeweils einem ITC-Experiment. Bei keiner Kombination entsteht bei Injektion ein charakteristischer „Spike“, der durch die Wärmeänderung im System einen Hinweis auf eine Interaktion von Ligand- und Probenmolekül gibt. Folgende Kombinationen wurden getestet (Ligand/Probe): A, 340 μM Mdh/Puffer (Blank); B, 340 μM Mdh/34 μM CitZ; C, 340 μM Mdh/340 μM CitZ, D, Vergleich der Diagramme A, B und C (rot, schwarz und blau). Bei Austausch von Ligand- und Probenmolekül ergab sich ein ähnliches Bild (Daten nicht gezeigt).

4.2 Untersuchungen zur Aktivität der sequentiellen MDH/CS-Reaktion im Enzymkomplex

Wie im Kapitel zuvor gezeigt, bilden die Enzyme CS, ICD und MDH, die in *B. subtilis* in einem Operon (*citZ-icd-mdh*) codiert sind, einen Enzymkomplex. Die Untersuchung der Citratsynthase/Malat-Dehydrogenase-Interaktion ist von besonderem Interesse, da diese beiden Enzyme aufeinanderfolgende Reaktionen des Citratzyklus katalysieren. Dadurch ist eine Aktivitätssteigerung im Komplex durch eine effizientere Weitergabe des Intermediats Oxalacetat zwischen den beiden aktiven Zentren denkbar.

4.2.1 MDH ist bei der sequentiellen Reaktion limitierend

Die Umsetzung von Malat zu Citrat bei der sequentiellen Reaktion erfolgt durch zwei Katalyseschritte. Im ersten Schritt erfolgt die Oxidation von Malat zu Oxalacetat (MDH-Katalyse). Oxalacetat wird im zweiten Schritt, einer Aldol-Kondensation, mit dem Acetyl-Rest von Acetyl-CoA zunächst in das Zwischenprodukt Citryl-CoA und schließlich in Citrat umgewandelt (CS-Katalyse). Die Aktivität dieser sequentiellen MDH/CS-Reaktion wurde photometrisch mittels Enzymassays untersucht. Mit Hilfe von DTNB (Ellmanns Reagenz) kann die bei der Hydrolyse des Citryl-CoAs entstehende freie Thiolgruppe quantifiziert werden, welche als Messgröße der sequentiellen MDH/CS-Reaktion dient.

Bei Messung der Gesamtaktivität der sequentiellen Reaktion mit unterschiedlichen Mischungsverhältnissen an MDH und CS zeigte sich wie erwartet, dass die Malat-Dehydrogenase bei dieser Reaktion das limitierende Enzym darstellt. Wenn bei gleichbleibender CS-Konzentration die Menge an MDH erhöht wird, erhöht sich ebenso die Gesamtaktivität (siehe Abb. 4.8 A auf Seite 57). Bei ca. einem 20-fachen molaren Überschuss an MDH zu CS ist eine Sättigung erreicht und eine weitere Konzentrationserhöhung an MDH bewirkt keine signifikante Erhöhung der Gesamtaktivität. Bei konstant bleibender MDH-Konzentration dagegen ergibt sich keine Steigerung der Gesamtaktivität durch Erhöhung der CS-Konzentration (siehe Abb. 4.8 B auf Seite 57).

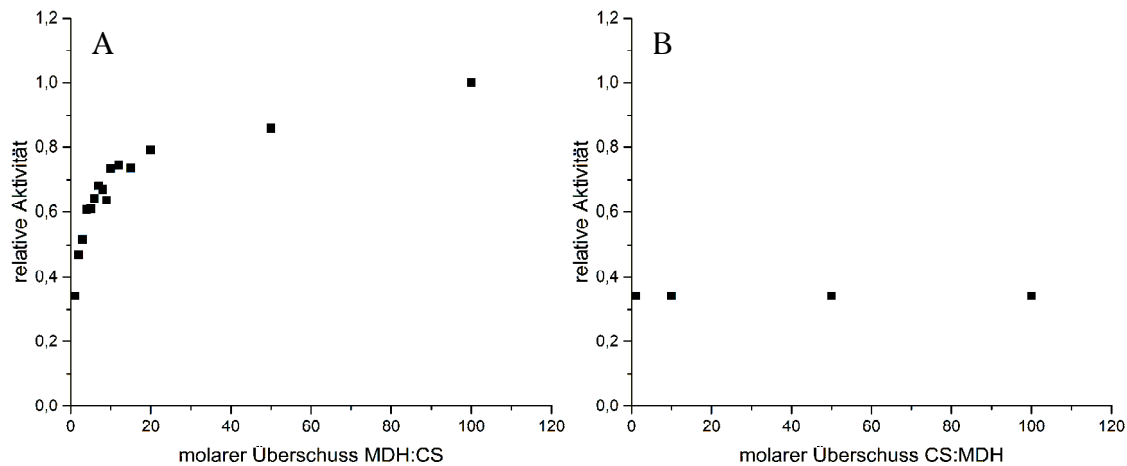


Abbildung 4.8: Die Malat-Dehydrogenase stellt bei der sequentiellen MDH/CS-Reaktion das geschwindigkeitsbestimmende Enzym dar. Im Enzymassay wurden verschiedene Mischungsverhältnisse von MDH und CS eingestellt. Bei steigender MDH-Menge steigt ebenso die Gesamtaktivität (A). Die CS-Menge dagegen hat dagegen keinen Einfluss auf die Gesamtaktivität (B). Im Küvettenassay (1 mL Reaktionsansatz) wurden 40 nM Enzym als einfache Menge eingesetzt.

Dieser Zusammenhang ist dadurch erklärbar, dass die MDH-Reaktion ein positives ΔG° von 29,7 kJ/mol (Voet *et al.*, 2010) aufweist, die CS-Reaktion dagegen stark exergonisch ist ($\Delta G^{\circ} = -1,5$ kJ/mol) und somit die Konzentration des MDH-Produkts Oxalacetat im Gleichgewicht sehr niedrig ist. Je mehr MDH verfügbar ist, desto mehr Oxalacetat steht der CS zur Verfügung, was in einer erhöhten Gesamtaktivität resultiert.

4.2.2 Die Aktivität des MDH/CS-Komplexes ist abhängig von der Konzentration der umgebenden Makromoleküle

Die Geschwindigkeit der zweistufigen Umsetzung von Malat zu Citrat durch MDH und CS ist im Wesentlichen von der Aktivität der MDH und damit von der Verfügbarkeit des MDH-Produkts Oxalacetat (OAA) abhängig (siehe 4.2.1). Somit wäre eine direkte Weitergabe dieses Intermediats zwischen den aktiven Zentren beider Enzyme ohne Möglichkeit zur Diffusion in andere Bereiche in der Zelle von Vorteil (*substrate channeling*). Die bisherigen Versuche erfolgten in wässrigem Puffer mit hochverdünnten Konzentrationen der beteiligten Enzyme. In dieser Umgebung ist die Bildung der transienten PPI zwischen CS und MDH unwahrscheinlich (siehe 4.1.4). Im Folgenden wurde untersucht, ob durch Erhöhung der Viskosität und Moleküldichte der Pufferlösung die Bildung eines CS-MDH-Komplexes gefördert und damit die Gesamtaktivität der Enzyme beeinflusst werden kann. Um diese Bedingungen zu erreichen, wurden sog. *crowding agents* eingesetzt, die die Viskosität sowie die hohen Konzentrationen an Makromolekülen innerhalb einer Bakterienzelle simulieren, ohne selbst die untersuchten Enzymaktivitäten zu beein-

flussen. In Abbildung 4.9 ist der erwartete mögliche Einfluss von *crowding agents* auf die Komplexbildung, und damit auf die MDH/CS-Enzymaktivität, schematisch dargestellt.

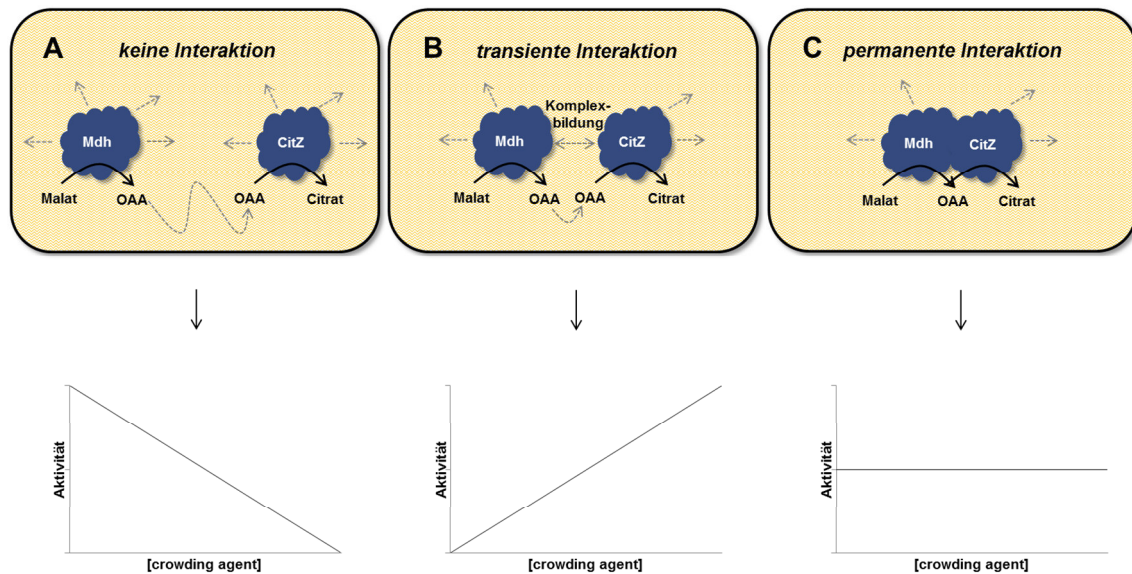


Abbildung 4.9: Schematische Darstellung des Einflusses von *crowding agents* auf die MDH/CS-Aktivität im Enzymassay. Unter der Annahme, dass CitZ und Mdh in der Gegenwart von *crowding agents* einen transienten Enzymkomplex bilden, welcher eine gesteigerte Aktivität besitzt, sollte die Gesamtaktivität mit steigender Konzentration an *crowding agent* zunehmen (B). Bei einer permanenten Interaktion sollte kein Effekt messbar sein, da hier die geringe Diffusionsstrecke zwischen den aktiven Zentren eine untergeordnete Rolle spielt (C). Wenn die Enzyme in diesem Versuch nicht interagieren sollten, müsste die Aktivität in Gegenwart von *crowding agents* durch die erschwerte Diffusion (gestrichelte Pfeile) der Proteine abnehmen (A).

Um die intrazellulären Bedingungen hinsichtlich der hohen Konzentration am Makromolekülen zu simulieren, wurden als *crowding agents* Rinderserumalbumin (BSA) und Ficoll 70 eingesetzt. BSA ist ein globuläres Protein und ein Hauptbestandteil des Rinderserums. Es kann Reaktionsansätzen in hohen Konzentrationen zugegeben werden, um native, intrazelluläre Proteinkonzentrationen (bis zu 340 mg/mL; Zimmerman & Minton, 1993) zu erreichen. BSA hat einen aktivitätssteigernden Effekt auf die MDH/CS-Aktivität (Abb. 4.10 auf Seite 59). Dieser ist vermutlich unspezifisch, da BSA üblicherweise zur Stabilisierung von Enzymlösungen verwendet wird und solche Effekte auch bei anderen Enzymen, wie z. B. Polymerasen, beschrieben sind (Nagai *et al.*, 1998).

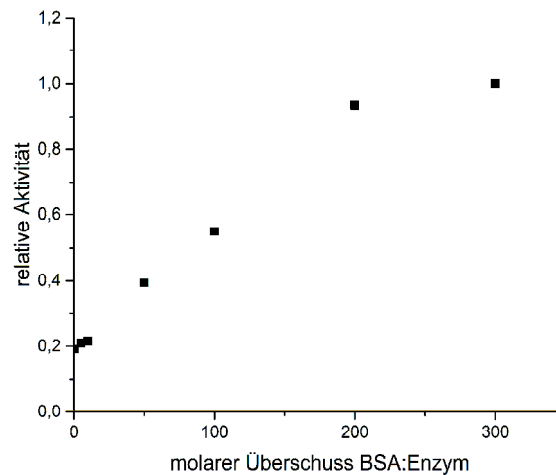


Abbildung 4.10: BSA erhöht die MDH/CS-Enzymaktivität. BSA bewirkt bei steigender Zugabe zu einer MDH/CS-Lösung eine proportionale Steigerung der Enzymaktivität. Dieser Effekt scheint bei einem Überschuss von 200-300 pro Enzym eine Sättigung erreicht zu haben. Die Aktivität wurde photometrisch bestimmt; die einfache Enzymmenge betrug 400 nM, d.h. ein 100-facher Überschuss an BSA entspricht einer finalen Proteinkonzentration von 40 μ M.

Ficoll 70 ist ein hochverzweigtes Copolymer aus Saccharose- und Epichlorhydrin-Einheiten mit hohem Molekulargewicht (~ 70.000 g/mol). Es wird häufig in der Dichtegradientenzentrifugation eingesetzt und ist in der Literatur als typisches *crowding agent* beschrieben (Samiotakis *et al.*, 2009). Die Substanz erhöht die Viskosität in wässrigen Lösungen und kann intrazelluläre Bedingungen hinsichtlich der hohen Konzentration an Makromolekülen (und damit den *excluded volume effect*) simulieren, ohne selbst Enzymaktivitäten zu beeinflussen. Dies ist von Vorteil bei der photometrischen Bestimmung von Enzymaktivitäten, die in einer definierten Umgebung mit geringer Eigenabsorption durchgeführt werden müssen. Um den Effekt von Ficoll 70 auf die sequentielle MDH/CS-Reaktion zu untersuchen, wurde das in Abb. 4.8 A (S. 57) gezeigte Titrationsexperiment im MTP-Maßstab wiederholt, jeweils mit und ohne Zugabe von 50 g/L Ficoll 70 (Abb. 4.11 auf Seite 60). Mit Ficoll 70 ist der aktivitätssteigernde Effekt bei Zugabe von MDH größer als ohne Ficoll 70. Somit ist beim Einsatz beider *crowding agents* ein aktivitätssteigernder Effekt zu beobachten. Da die beiden Reagenzien von ihrer Molekülart sehr unterschiedlich sind, ist wahrscheinlich allein die hohe Viskosität der Enzymlösung und das *macromolecular crowding* (Ellis, 2001a), also der Zustand einer hohen Konzentration an Makromolekülen in einem begrenzten Flüssigkeitsvolumen, wie er in der Bakterienzelle herrscht, für die Steigerung der Aktivität im Vergleich zu einer verdünnten, wässrigen Lösung, verantwortlich. Wie in Kapitel 4.1 gezeigt, ist auch die PPI der drei Citratzyklus-Enzyme nur in hochkonzentrierter Lösung (Zellysät) nachweisbar. Die Interaktion von MDH und CS könnte somit der Grund für die gesteigerte Aktivität in Gegenwart der *crowding agents* sein, da in einem CS-MDH-Enzymkomplex das limitie-

rende Substrat Oxalacetat einen minimalen Diffusionsweg zwischen den für die Katalyse zuständigen aktiven Zentren für die CS-Katalyse hat.

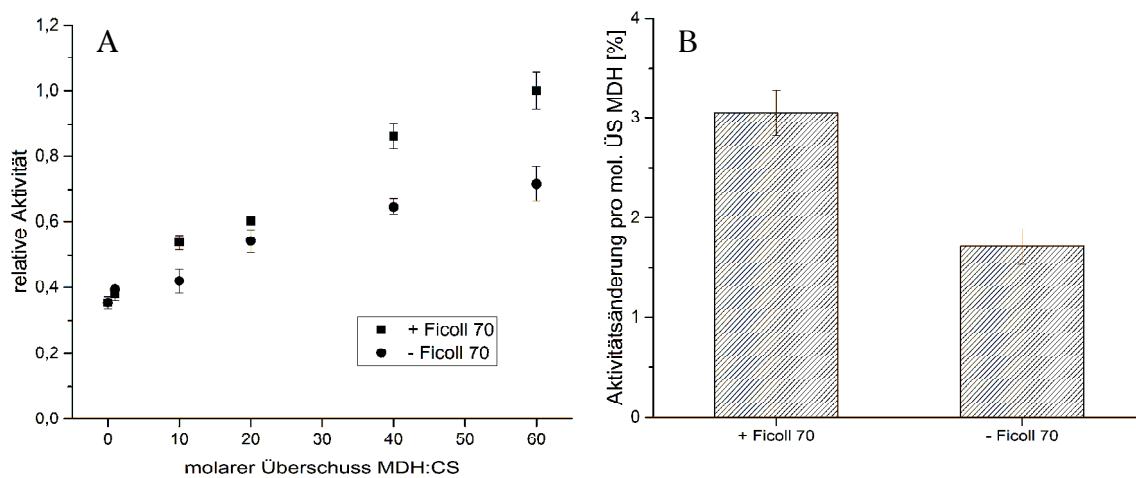


Abbildung 4.11: Analyse der MDH/CS-Aktivität in An- und Abwesenheit von Ficoll 70. A, Einfluss von Ficoll 70 auf das MDH-Titrationsexperiment (siehe Abb. 4.8 A), B, Auswirkung von Ficoll 70 auf die Gesamtaktivität (Steigungen der Regressionsgeraden Diagramm A)

4.2.3 Ein CS-MDH-Fusionsenzym zeigt keine gesteigerte Aktivität im Vergleich zu den Einzelenzymen

Um der Frage nachzugehen, ob die höhere Gesamtaktivität im vorherigen Versuch eine Folge der Komplexbildung der Interaktionspartner CS und MDH sein kann, wurde ein Fusionsprotein aus den beiden *B. subtilis*-Enzymen generiert. Bei diesem Fusionsenzym liegen die beiden Interaktionspartner CitZ und Mdh kovalent gebunden aneinander vor. Damit wird eine Dissoziation der beiden Interaktionspartner, auch in wässriger Lösung, verhindert. Dazu wurde CitZ C-terminal mit dem N-Terminus von Mdh gekoppelt; verbunden wurden beide Enzyme durch einen Alanin-Glycin-Linker (siehe Abb. 4.12 auf Seite 61 für den Aufbau des Proteins). Die Gene *citZ* und *mdh* wurden mit entsprechenden Überhängen für Restriktionsschnittstellen sowie Linker-DNA einzeln mittels PCR amplifiziert und nach Restriktionshydrolyse mit dem Strep-Tag-Expressionsvektor pGP172 ligiert. Nach Transformation von *E. coli* BL21(DE3) konnte aus einer Expressionskultur des rekombinanten Stammes aktives Fusionsprotein gewonnen werden.



Abbildung 4.12: Aufbau des CitZ-Mdh-Fusionsproteins. Ein 4-Aminosäure-Linker aus Alanin und Glycin diente als Linker zur Verbindung der beiden Enzyme.

Abbildung 4.13 B, Spur 1 zeigt das angereicherte Fusionsprotein nach Strep-Tactin-Affinitätschromatographie. Neben der dominanten Bande im SDS-PAGE-Gel bei ~75 kDa, die dem CitZ-Mdh-Fusionsproteins entspricht, ist eine kleinere Bande zu erkennen, die laut MALDI-TOF/TOF-Analyse (Shevchenko *et al.*, 2006) ein Spaltprodukt der (instabilen) Fusion ist. Dies wurde durch Größenausschlusschromatographie bestätigt, indem zunächst Fusion von Spaltprodukt soweit wie möglich separiert wurde (Abb. 4.13 A). Das gereinigte Fusionsprotein zeigt nach einiger Inkubationszeit wieder das gleiche Muster (Spur 1, B), was auf eine erneute Degradation schließen lässt. Das Eluat wurde dennoch weiter verwendet, da der Abbau nur bis zu einem bestimmten Grad verläuft und ein Großteil des Proteins dennoch in Form der Fusion vorliegt.

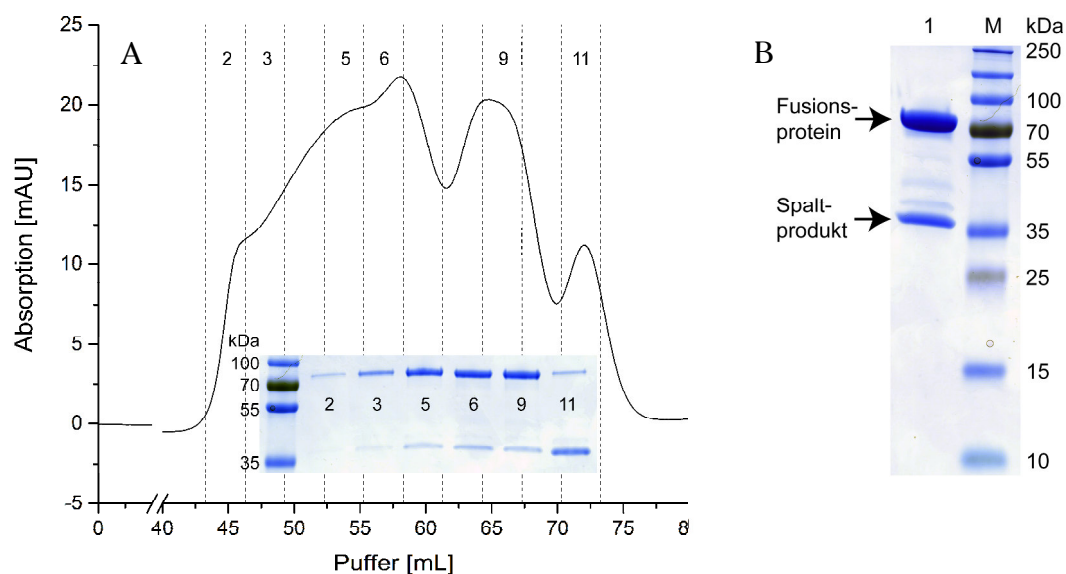


Abbildung 4.13: Präparative Größenausschlusschromatographie (Säule: GE HiLoad 16/600 Superdex 200 pg XK16) zur Isolierung des Fusionsproteins (A); die bezifferten Fraktionen sind zusätzlich mittels SDS-PAGE-Analyse gezeigt; B, SDS-PAGE-Analyse des gereinigten Fusionsprotein-Eluats (5 µg) vor SEC.

Mittels Enzymassays wurde die Aktivität des Fusionsproteins mit der der einzelnen Enzyme verglichen. Dabei ist sowohl die einzelne Aktivität für MDH und CS, als auch die Aktivität der gekoppelten Reaktion der Fusion vergleichbar mit der der einzelnen Enzyme, wenn diese in gleicher Molarität im Enzymassay eingesetzt werden (siehe Abb. 4.14).

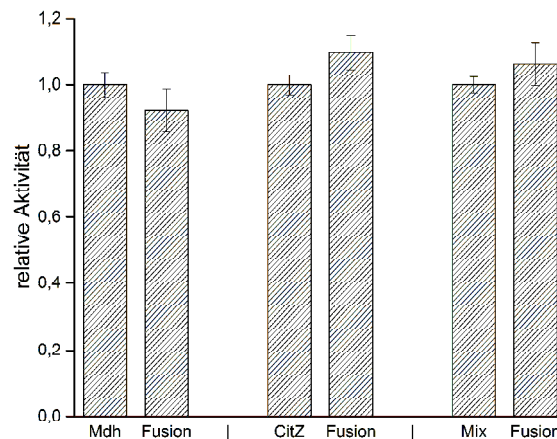


Abbildung 4.14: Die Fusion aus CitZ und Mdh besitzt die gleiche Aktivität wie die einzelnen Enzyme. Verglichen wurden jeweils gleiche molare Mengen an Einzelenzym und Fusion hinsichtlich MDH- (links), CS- (mitte) und MDH/CS-Aktivität (rechts). Der Versuch wurde in Triplikaten durchgeführt; es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der jeweiligen Vergleichsgruppen.

Da das Fusionsenzym die gleiche Aktivität wie die Einzelenzyme besitzt, stört die Koppelung der beiden monomeren Enzyme über den *C*-(CitZ) bzw. *N*-Terminus (Mdh) grundsätzlich den jeweiligen Katalysemechanismus nicht. Dennoch ist es sehr wahrscheinlich, dass die natürliche Interaktion der beiden Proteine in einer anderen Konformation (die Enzyme liegen nativ als Multimere vor) und an anderer Stelle der Proteinoberfläche erfolgt. Durch die kovalente Verknüpfung der beiden Polypeptidketten ist eine Umstrukturierung des Komplexes in die native Konformation aber nicht möglich. Deshalb ist mit den erhaltenen Daten (Abb. 4.14) keine Aussage darüber möglich, ob der (native) Proteinkomplex die sequentielle Reaktion effizienter katalysiert als die Einzelenzyme.

4.3 Eine inaktive MDH fördert die Aktivität des CitZ-Icd-Mdh-Metabolons

Da die Ergebnisse im vorherigen Kapitel keine Aussage darüber zulassen, ob durch Interaktion der beiden Enzyme eine gesteigerte Aktivität erzielt wird, wurde ein weiterer Ansatz zur Untersuchung dieser Fragestellung gewählt. Ein generelles Problem ist dabei, dass der Parameter der Interaktion nicht „ein- und ausgeschaltet“ werden kann, um den Effekt auf die Gesamtaktivität zu messen. Um dennoch einen Einfluss auf die Komplexierung von CitZ und Mdh zu haben, wurden inaktive Mutanten der *B. subtilis* Citratsynthase sowie Malat-Dehydrogenase generiert. Bei Zuhilfenahme dieser inaktiven Mutanten ist zwar immer noch eine Komplexierung der aktiven Enzyme möglich, aber je nach Menge an zugegebener Mutante im Assay können auch Komplexe aus inaktiven und aktiven Enzymen entstehen. Damit ist eine indirekte Steuermöglichkeit gegeben, um zwei interagierende Enzyme zu trennen, indem durch Titration mit dem inaktiven Enzym das aktive Pendant aus dem MDH-CS-Komplex verdrängt wird. Dadurch kann die Auswirkung der Komplexierung im Fall von CitZ und Mdh auf die Gesamtaktivität bestimmt werden.

Die Konstruktion der inaktiven Enzyme erfolgte mittels ortsspezifischer Mutagenese. Dabei erfolgte die Substitution einer Aminosäure, die jeweils im aktiven Zentrum einen für die Reaktion essentiellen Schritt katalysiert (Darstellung der Katalysemeechanismen auf Seite 64, Abb. 4.15). Zur Mutagenese von CitZ wurde Aspartat an der Position 308 (Abbildung 4.15 A Asp375) in Asparagin umgewandelt. Aufgrund der dadurch fehlenden γ -Carboxygruppe ist die Abstraktion eines Protons zur Enolisierung von Acetyl-CoA unterbunden und die Katalyse kommt zum Erliegen (Remington, 1992). Bei der Mdh-Mutante wurde Histidin an der Position 180 (Abbildung 4.15 B His195) durch Glutamat ersetzt. Dadurch ist die Säure/Base-Katalyse nicht mehr möglich und eine Oxidation von Malat zu Oxalacetat kann nicht stattfinden (Goward & Nicholls, 1994). Da die beschriebenen Mutationen bisher nicht für die jeweiligen *B. subtilis*-Enzyme beschrieben sind, wurde die tatsächliche Inaktivität dieser Mutanten mittels Enzymassays verifiziert. Selbst bei sehr hohen Konzentrationen an inaktivem Enzym (getestet wurde bis 100 μ M finale Konzentration) war nur eine zu vernachlässigende Aktivität messbar; die aktiven Enzyme sind im Vergleich durchschnittlich 10.000 mal aktiver als die inaktiven Varianten.

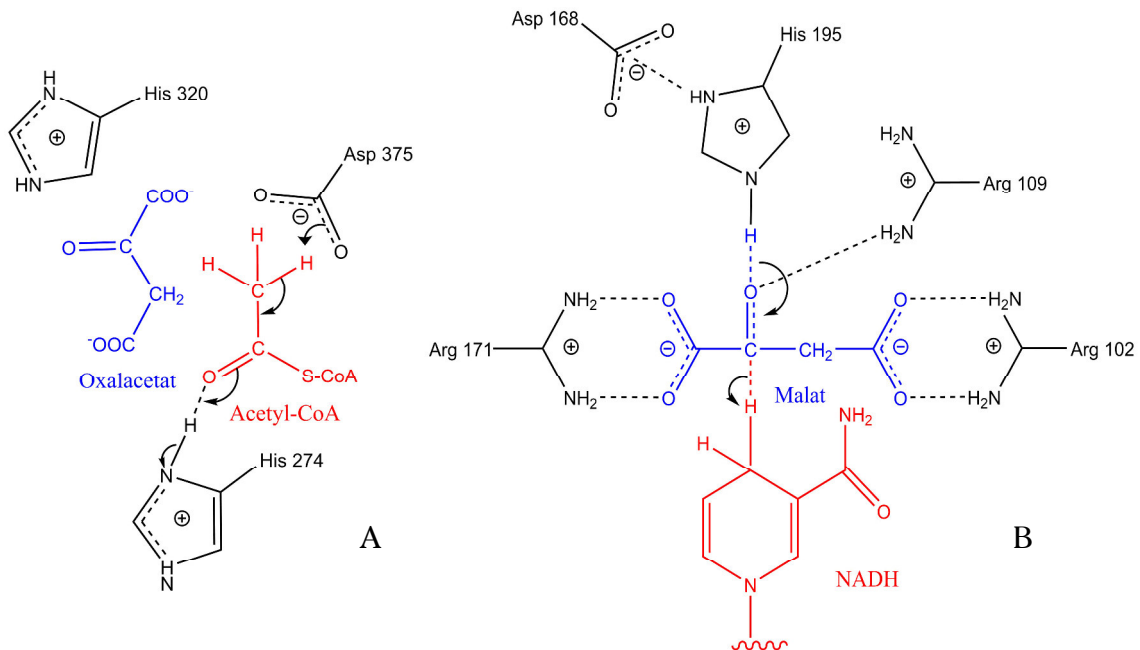










Abbildung 4.15: Katalysemechanismen der CS (A)- bzw. MDH-Reaktion (B). Dargestellt sind jeweils die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren im aktiven Zentrum des Enzyms. Die hier gezeigte Nummerierung der Aminosäuren entsprechen homologen Proteinen aus anderen Organismen (Remington, 1992; Eventoff *et al.*, 1977).

Aufgrund der Tatsache, dass sich diese inaktiven Varianten von den Wildtyp-Enzymen nur durch Austausch einer Aminosäure unterscheiden, kann man davon ausgehen, dass die Möglichkeit der Mutanten, spezifisch mit anderen Enzymen an der Proteinoberfläche zu interagieren, unverändert bleibt. Da dies Voraussetzung für das Experiment ist, wurde eine Analyse der PPI unter Zuhilfenahme von Sulfo-SDAD mit den inaktiven Enzymen als Köderproteine durchgeführt (siehe Versuchsdurchführung zur Detektion der PPI von CitZ, Icd und Mdh in 4.1.3). Wie erwartet, konnte eine Komplexbildung der inaktiven Enzyme mit den jeweiligen nativen Interaktionspartnern verifiziert werden (Tabelle 4.2 auf Seite 65).

Tabelle 4.2: Nachweis der PPI von CitZ_Asp308Asn sowie Mdh_His180Gln mit den jeweiligen Interaktionspartnern in zellfreiem Extrakt mit Hilfe von Sulfo-SDAD durch Western Blot. Die Strep-getaggtten Köderproteine sind in der linken Spalte aufgelistet, die Interaktionspartner in der jeweils zugehörigen Spalte rechts davon. Der Detektion durch anti (α)-CitZ, -Icd und -Mdh erfolgte kolorimetrisch (n. a. = nicht analysiert).

Köderprotein	α -CitZ	α -Icd	α -Mdh
Strep-CitZ (Asp308Asn)	n. a.		
Strep-Mdh (His180Gln)			n. a.
Positivkontrolle (gereinigtes Enzym)			
Negativkontrolle (kein Köderprotein)			

In Abbildung 4.16 ist der durchgeführte Versuch schematisch dargestellt. Zu einer Mischung aus den aktiven Enzymen CitZ und Mdh, die sich in Puffer mit den *crowding agents* BSA und Ficoll 70 befinden und damit als Komplex vorliegen sollten (siehe 4.2.2), wird ein weiteres Enzym bzw. Protein in steigender Konzentration hinzugegeben und die Änderung der Aktivität von CitZ und Mdh photometrisch verfolgt.

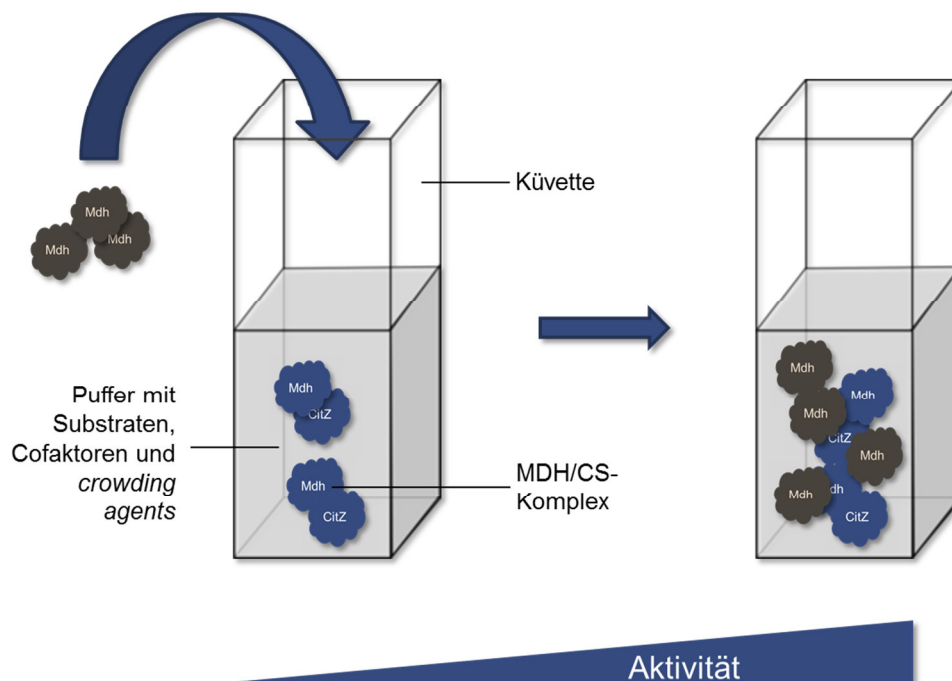


Abbildung 4.16: Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung am Beispiel der Zugabe von Mdh zur CitZ/Mdh-Mischung. Neben CitZ und Mdh enthält die Reaktionsmischung sämtliche notwendigen Substrate und Cofaktoren, sowie die *crowding agents* BSA und Ficoll 70. Für jede Zugabe eines Testproteins in bestimmter Konzentration wurde dabei eine Kinetik bestimmt und in eine Enzymaktivität umgerechnet. Der Einfluss der Menge an zugegebenem Protein auf die Gesamtaktivität wurde anschließend graphisch dargestellt (Abb. 4.17 A-H).

Insgesamt wurde der Versuch mit 8 verschiedenen Testproteinen, die dem Ansatz hinzugefügt wurden, durchgeführt; dies entspricht den Graphen **A-H** der Abbildung 4.17 auf Seite 67 (Abbildungslegende siehe unten).

Es zeigte sich sowohl bei der Zugabe aktiver Mdh (**A**), als auch inaktiver Mdh (**B**) eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Gesamtaktivität. Der Zusammenhang, durch mehr Mdh eine höhere MDH/CS-Aktivität zu erzielen, wurde schon in Kapitel 4.2.1 gezeigt und erläutert. Neu ist jedoch, dass auch die inaktive Variante eine deutliche Steigerung der Gesamtaktivität hervorruft. Da die Mutante die eigentliche Katalyse, d.h. die Bereitstellung von Oxalacetat, nicht bewerkstelligen kann, scheint allein die Anwesenheit und Interaktion des (inaktiven) Enzyms mit der Citratsynthase CitZ die Reaktion zu beschleunigen. Ebenso verhielt es sich mit der aktiven CS (**C**), als auch der aktiven Isocitrat-Dehydrogenase Icd (**D**). Icd ist selbst nicht an der MDH/CS-Katalyse beteiligt, aber scheint als Teil des CitZ-Icd-Mdh-Metabolons den Umsatz von Malat zu Citrat im Komplex durch Mdh und CitZ zu begünstigen.

Die Zugabe inaktiver CS (**E**) bewirkte keine Erhöhung der Gesamtaktivität, ebenso wie die folgenden Negativkontrollen: α -Amylase aus *B. subtilis* (**F**), BSA (**G**) als zusätzlicher Überschuss neben dem schon im Reaktionsansatz vorhandenen BSA und schließlich die Kontrolle ohne Citratsynthase (**H**).

Abbildung 4.17: Einfluss verschiedener Proteine auf die MDH/CS-Aktivität (Abbildung auf folgender Seite). Zu einer äquimolaren Mischung von *B. subtilis* CitZ und Mdh (1 μ M final) in PBS mit Ficoll 70 (50 mg/mL final) und BSA (150 μ M final) wurden die zu testenden Proteine in steigender Konzentration hinzugegeben und die Aktivität jeweils photometrisch bei 410 nm im Mikrotiterplattenformat bestimmt. Ein Datenpunkt entspricht dabei einer Kinetik, mit der die Aktivität bestimmt wurde. Die jeweilige Messung ohne Zugabe eines Testproteins dient dabei zur Normierung als 100%-Marke.

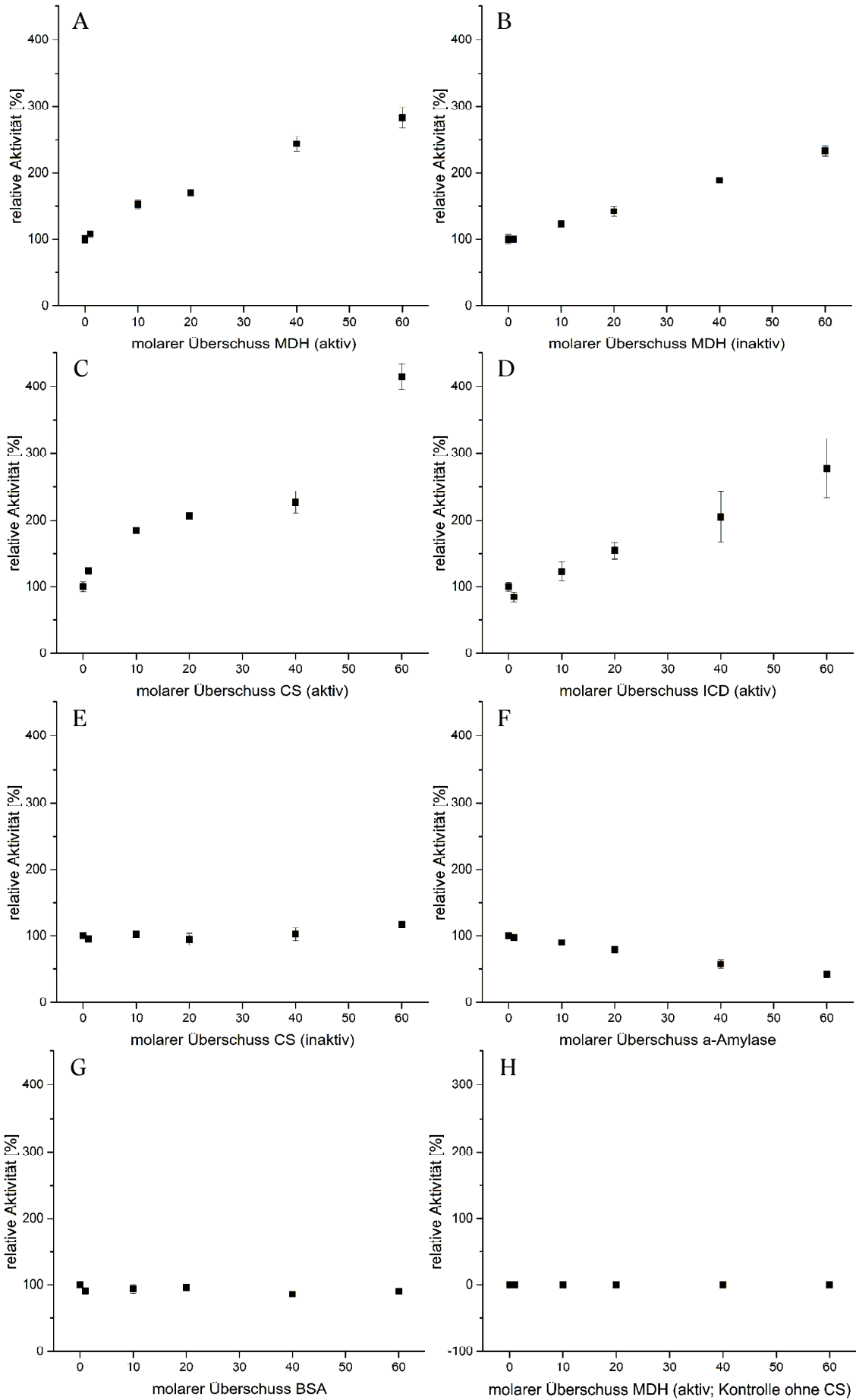


Abb. 4.18 zeigt nochmals zusammenfassend die Ergebnisse des zuvor beschriebenen Experimentes. Die Höhe einer dargestellten Säule entspricht der jeweiligen Steigung der konzentrationsabhängigen Aktivitätsänderung und damit dem Maß, wie stark das zugegebene Protein die MDH/CS-Reaktion beeinflusst. Die aktive CS zeigt dabei den größten positiven Einfluss auf die Aktivität; die drei Enzyme aktive ICD, inaktive und aktive MDH liegen leicht darunter auf einem ähnlichen Maß. Die inaktive CS sowie die Kontrollen BSA und α -Amylase haben nur einen gering positiven bzw. leicht negativen Einfluss auf die Gesamtaktivität.

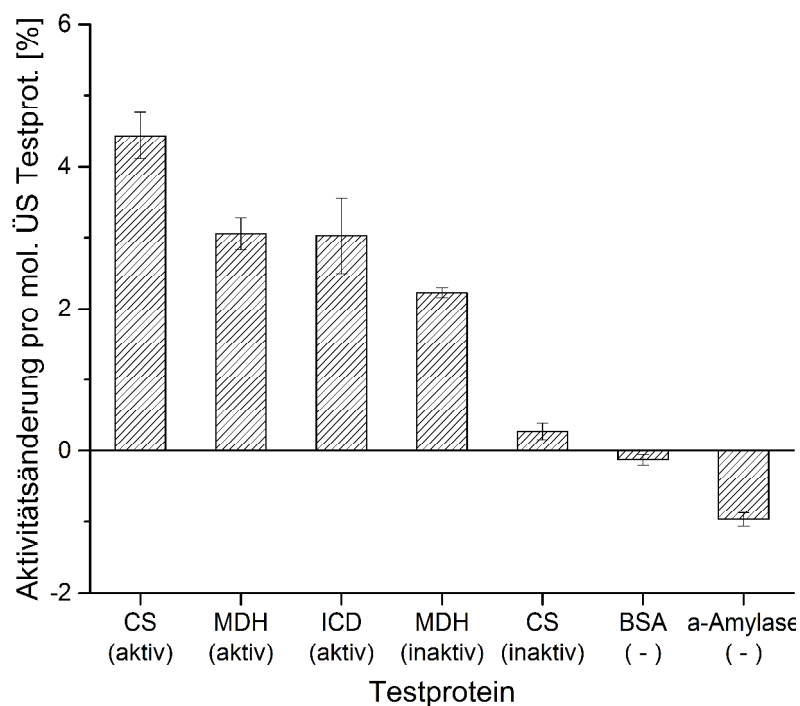


Abbildung 4.18: Die Anwesenheit inaktiver MDH sowie aktiver CS, ICD und MDH steigern die Aktivität des CitZ-Icd-Mdh-Metabolons. Dargestellt ist die Zusammenfassung der Ergebnisse zum Einfluss verschiedener Proteine auf die MDH/CS-Aktivität. Die Säulen sind ein Maß für die Fähigkeit eines Proteins zur Beeinflussung der MDH/CS-Aktivität. Die Daten sind geordnet von großem positivem Effekt (links) zu geringem bzw. negativem Effekt (rechts).

Im Zuge dieses Versuchs wurde zusätzlich das in Kapitel 4.2 beschriebene Fusionsprotein aus CitZ und Mdh getestet, indem es anstelle der Einzelenzyme MDH und CS in der Mischung mit den *crowding agents* in gleicher Molarität eingesetzt wurde. Zugegeben wurde hier aktive MDH. Es ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den Einzelenzymen (Abbildung 4.19 A); der Vergleich der Steigung offenbarte erwartungsgemäß keinen signifikanten Unterschied der beiden Ansätze (Abb. 4.19 B). Dies war zu erwarten, da

sich das Fusionsenzym in den vorherigen Versuchen ähnlich wie die Einzelenzyme hinsichtlich der Katalyse der sequentiellen MDH/CS-Reaktion verhielt.

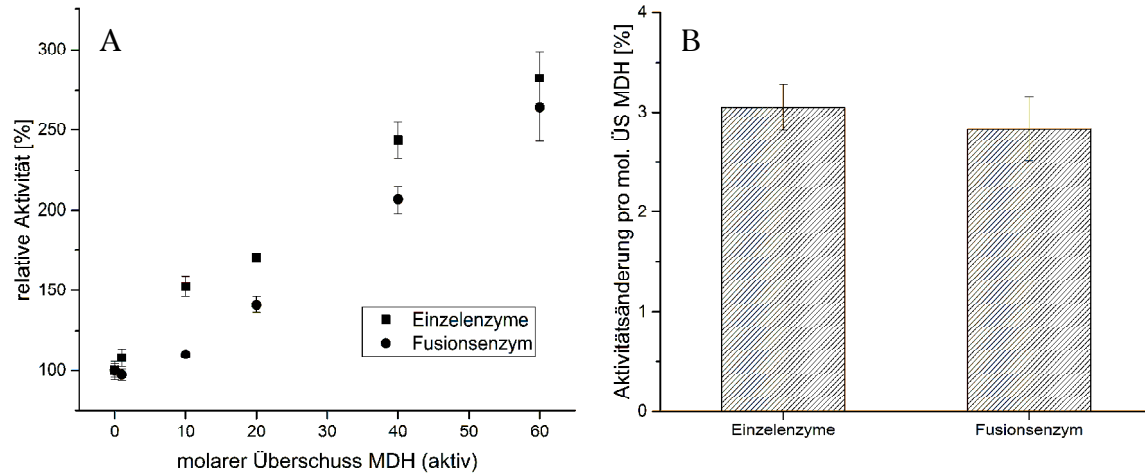


Abbildung 4.19: Das Fusionsenzym zeigt den gleichen aktivitätssteigernden Effekt bei Zugabe der aktiven Mdh wie die Einzelenzyme. Zu einer äquimolaren Mischung von CitZ und Mdh bzw. dem Fusionsenzym aus CitZ und Mdh wurde zusätzlich aktive Mdh zugegeben (A). Im Vergleich der Steigung beider Regressionsgeraden zeigte sich kein signifikanter Unterschied (B).

Die Ergebnisse in diesem Kapitel deuten darauf hin, dass die Enzyme im CitZ-Icd-Mdh-Metabolons neben der katalytischen Funktion auch eine strukturelle Funktion haben, die die Aktivität des Metabolons maßgeblich beeinflusst.

4.4 Auswirkung der Genorganisation auf die PPI von CitZ, Icd und Mdh

In den vorherigen Versuchen wurde gezeigt, dass *B. subtilis* CitZ, Icd und Mdh in der Zelle interagieren (Bildung eines Metabolons, siehe 4.2) und allein die Anwesenheit der Interaktionspartner eine Steigerung der Citratsynthase-Aktivität bewirkt (Kapitel 4.3). In *B. subtilis* sind die entsprechenden Gene im *citZ-icd-mdh*-Operon organisiert. Nach polycistronischer Transkription und anschließender Translation am Ribosom sind die Genprodukte damit bereits bei Synthese der Enzyme in räumlicher Nähe zueinander. Im Folgenden wurde untersucht, ob die Art der Organisierung bzw. Lokalisierung von Genen interagierender Enzyme in einer solchen Transkriptionseinheit Einfluss auf die Assemblierung des Metabolons hat, d.h. ob es einen funktionellen Zusammenhang zwischen Operon und Komplexbildung gibt (siehe Abb. 4.20).

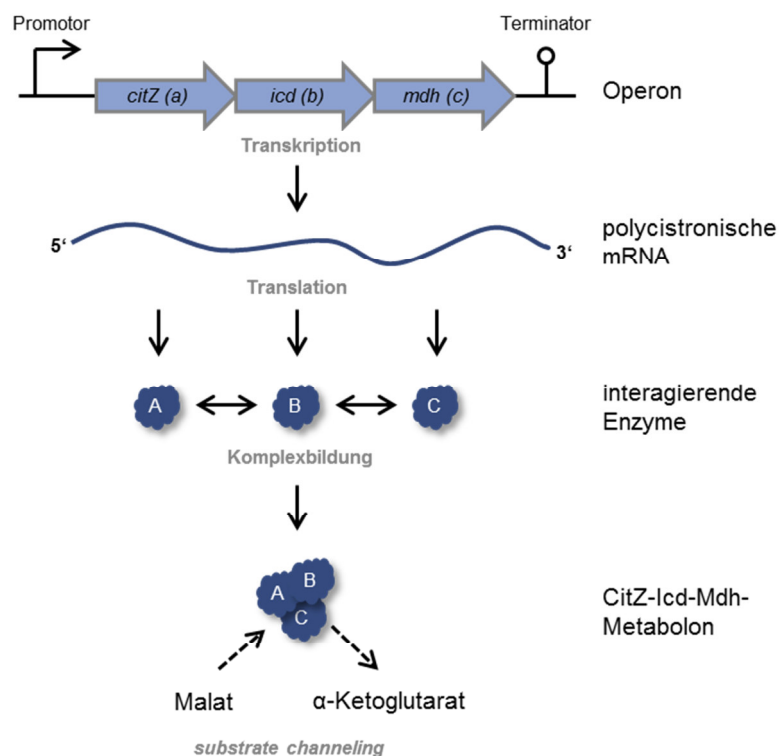


Abbildung 4.20: Synthese von CitZ (A), Icd (B) und Mdh (C). Das Schema zeigt einen möglichen Zusammenhang zwischen Genorganisation und Förderung der Komplexbildung der Genprodukte durch unmittelbare räumliche Nähe am Beispiel des *citZ-icd-mdh*-Operons.

Es wurden *B. subtilis*-Stämme generiert, die eine Unterscheidung zwischen interagierenden Enzymen, die in einem Operon codiert sind und Enzymen, deren Gene in entfernten Teilen des Bakterienchromosoms liegen, ermöglichen. Dazu wurde zum einen eine Strep-getaggte Variante des Citratsynthase-Gens *citZ* mittels pDG268-Integrationsvektor über homologe Bereiche in den *amyE*-Locus von *B. subtilis* integriert. In einen zweiten Stamm wurde das gesamte *citZ-icd-mdh*-Operon (ebenfalls mit Strep-getaggttem *citZ*) an gleicher Stelle integriert. (Strep-)CitZ dient damit bei diesem Versuch als Fängerprotein für Icd und Mdh. Die einzelnen integrierten Gene liegen bei der zweiten Mutante (wie auch beim Wildtyp) direkt in einer Transkriptionseinheit; bei der ersten Mutante beträgt der „Abstand“ vom integrierten *citZ* im *amyE*-Lokus zu *icd* und *mdh* (natürlicher Lokus) 2,6 Mbp. Eine schematische Darstellung der generierten Mutanten ist in Abbildung 4.21 gezeigt. Die Integration wurde phänotypisch bestätigt, da die Mutanten die Fähigkeit des Stärkeabbaus durch Insertion in das Amylase-Gen *amyE* verloren haben. Dies konnte durch Wachstum der Mutanten auf stärkehaltigem Nährboden und anschließender Anfärbung der Stärke durch Lugol'sche Lösung (Iod-Kaliumiodid-Lösung) gezeigt werden. Die korrekte Integration als *double crossover*-Ereignis wurde mittels PCR bestätigt. Die Expression erfolgte unter nativem Promotor mit jeweils einer Genkopie pro Zelle und damit unter natürlichen Bedingungen; mit dem Unterschied der Lokalisation der einzelnen Gene.

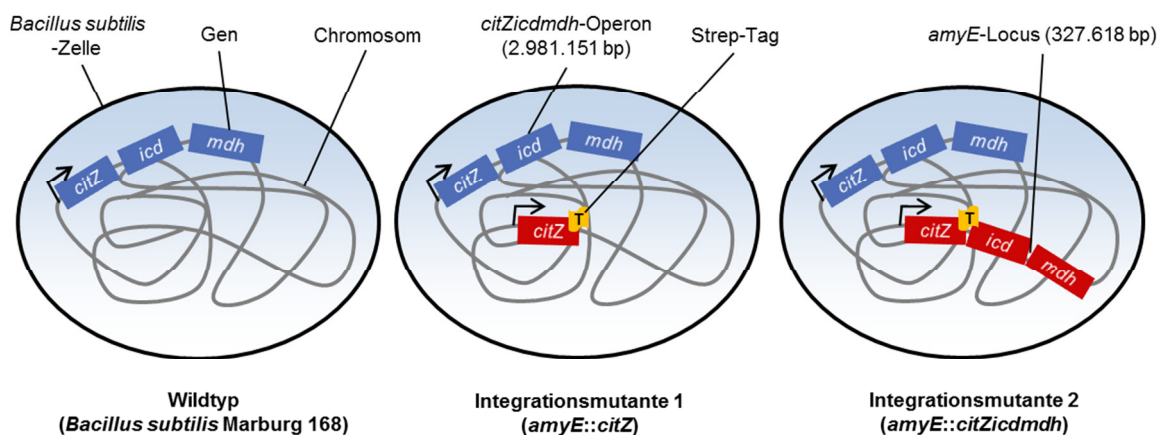


Abbildung 4.21: Schematische Darstellung des Genotyps der *B. subtilis*-Integrationsmutanten. Dargestellt sind der Wildtyp sowie die beiden beschriebenen Mutanten. Die integrierten Gene sind rot dargestellt (T = Tag), die natürlich vorhandenen blau. Es erfolgte keine Deletion der ursprünglichen Gene, da nur die integrierten Gene mit Tag versehen sind. Im SPINE-Versuch kann nur Strep-CitZ aufgereinigt bzw. detektiert werden.

Das *strep-protein interaction experiment* (SPINE) wurde zum Nachweis der PPI genutzt, da es Hinweise darauf gab, dass die Interaktion der untersuchten Citratzyklus-Enzyme transient und relativ schwach ist. Der Vorteil von SPINE liegt in der Inkubation der Zellen mit Formaldehyd (FA), wodurch PPI im Cytoplasma sekundenschnell kovalent fixiert werden, ähnlich wie mit dem bifunktionellen Quervernetzer DTSSP (Kapitel 4.1.2). Sämtliche Aufarbeitungsschritte, die zur Reinigung der Proteinkomplexe notwendig sind, können auch schwache Interaktionspartner nicht mehr trennen. Die bewachsenen Kulturen wurde vor Inkubation mit Formaldehyd geteilt und nur ein Teil damit behandelt. Der zweite Teil blieb als Kontrolle unbehandelt.

Neben den beiden *B. subtilis*-Integrationsmutanten *amyE::citZ* (Mutante 1) und *amyE::citZicdmh* (Mutante 2) wurde der Wildtyp als Kontrolle herangezogen. Das Experiment wurde insgesamt dreimal durchgeführt, wobei die Kultivierung der drei Stämme einmal in LB-Medium und zweimal in einem Minimalmedium mit Malat (die für *B. subtilis* neben Glucose präferierte C-Quelle, fördert außerdem Expression des Aconitase-Gens *citB*, (Kleijn *et al.*, 2010)) als Kohlenstoffquelle durchgeführt wurde. Beim zweiten Versuch mit Minimalmedium wurde zusätzlich Avidin zur Absättigung von freiem Biotin und Reduktion des Hintergrunds vor dem Zellaufschluss hinzugegeben. Da die drei Versuche die gleichen Ergebnisse hinsichtlich der Detektion der PPI zeigten, ist im Folgenden nur der letztgenannte Versuch gezeigt. Abbildung 4.22 (S. 73) zeigt eine Analyse des SPINE-Experiments mittels SDS-PAGE und Western Blot.

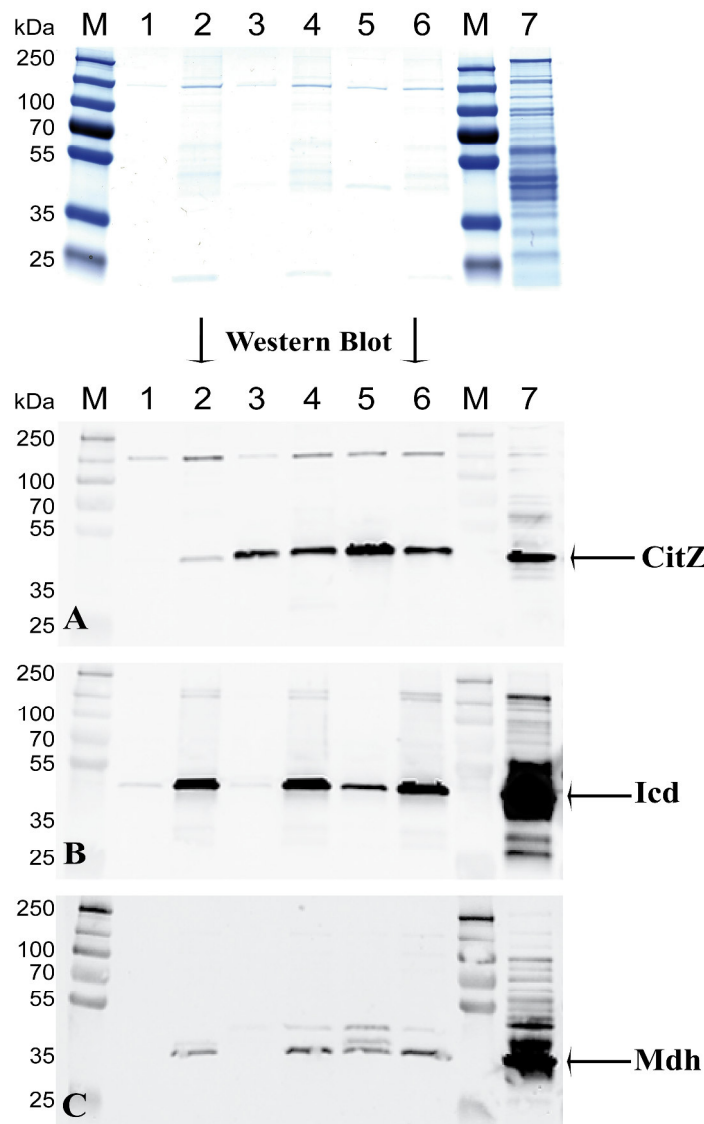














Abbildung 4.22: SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der mit SPINE in *B. subtilis* generierten Proben. Die durch Strep-Tactin-Affinitätschromatographie generierten Eluate wurden nach Aufkonzentrierung auf ein SDS-PA-Gel aufgetragen sowie dreimal auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und mit den spezifischen Antikörpern gegen CitZ (Blot A), Icd (Blot B) und Mdh (Blot C) behandelt (Nachweis mittels Chemilumineszenz). 1, Wildtyp -Formaldehyd (FA); 2, Wildtyp +FA; 3, *amyE::citZ* -FA; 4, *amyE::citZ* +FA; 5, *amyE::citZicdmh* -FA; 6, *amyE::citZicdmh* +FA; 7, CitZ/Icd/Mdh-Positivkontrolle; M, Molekulargewichtsmarkermischung

Blot A dient als Expressionskontrolle sowie Normierung der Menge des Köderproteins CitZ bei den rekombinanten Stämmen (Mutante 1 und 2). Die Interaktionspartner von CitZ, Icd und Mdh, sind in den Blots B und C dargestellt. Hier ist eine Unterscheidung der beiden Mutanten nur durch Betrachtung der nicht mit Formaldehyd behandelten Proben möglich (Spuren 3 und 5 für *citZ* bzw. *citZicdmh*): Bei der zweiten Mutante (*amyE::citZicdmh*, Spuren 5) ist jeweils eine Bande für Icd bzw. Mdh erkennbar; bei der Mutante, bei der die Gene getrennt vorliegen (*amyE::citZ*, Spuren 3), ist die Interaktion nicht nachweisbar.

Bei den mit Formaldehyd behandelten Proben (Spuren 4 und 6 für *citZ* bzw. *citZicdmhd*) kann für beide Stämme die gleiche Menge an Interaktionspartner nachgewiesen werden; allerdings erscheinen bei der Wildtyp-Kontrolle ebenfalls Banden auf Höhe der nachzuweisenden Proteine. Aus diesem Grund werden die Proben mit Formaldehyd für die weiteren Betrachtungen nicht miteinbezogen.

Nachfolgend nochmals eine Darstellung der isolierten Banden (ohne FA) zum direkten Vergleich der verschiedenen Stämme (Abb. 4.22) und Zusammenfassung des *B. subtilis* SPINE-Versuchs zum Test der Integrationsmutanten auf die PPI von CitZ, Icd und Mdh (Tabelle 4.3).

Tabelle 4.3: Die Organisation von *citZ*, *icd* und *mdh* in einer Transkriptionseinheit fördert die PPI der Genprodukte dieses Operons. Beim Wildtyp (Negativkontrolle) sind keine Banden zu erkennen, da im SPINE-Versuch nur die an das rekombinante Köderprotein CitZ gebundenen Proteine mit aufgereinigt werden.

Probe/Stamm	α -CitZ	α -Icd	α -Mdh
Mutante 1 (getrennte Transkriptionseinheiten)			
Mutante 2 (eine Transkriptionseinheit)			
Positivkontrolle (angereicherte Enzyme, je 300 ng)			
Negativkontrolle (Eluat Wildtyp)			

Damit scheint die Komplexbildung von Enzymen, deren Biosynthese in räumlicher Nähe stattfindet (Mutante 2), bevorzugt zu sein gegenüber Enzymen, deren Gene an entfernten Abschnitten des Bakterienchromosoms (Mutante 1) liegen. Ob dies auch auf andere Organismen und Enzyme angewendet werden kann, wurde im folgenden Kapitel untersucht.

4.5 Artifizielles *gltA-icd-mdh*-Operon in *Escherichia coli*

Die SPINE-Versuche mit dem grampositiven Modellorganismus *B. subtilis* lassen darauf schließen, dass bei einer Trennung der Gene des *citZ-icd-mdh*-Operons auch die Interaktion der Genprodukte nicht mehr stattfinden oder zumindest abgeschwächt werden kann. Im gramnegativen Modellorganismus *E. coli* sind die Gene dieser drei Citratzyklus-Enzyme (*gltA* codiert für die *E. coli*-CS) nicht in einer Transkriptionseinheit organisiert, sondern liegen in voneinander entfernten Bereichen des Bakterienchromosoms (bis zu 2,6 Mbp „Abstand“ zueinander). Damit eignet sich *E. coli* für ein Kontrollexperiment, bei dem (im umgekehrten Fall zum *B. subtilis*-Experiment in Kapitel 4.4) die entsprechenden Gene in einem artifiziellem Operon (siehe Abbildung 4.23) zusammengebracht werden und die Auswirkungen auf die PPI untersucht werden.

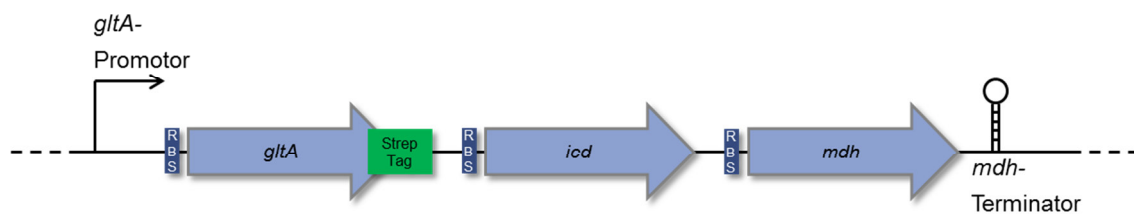


Abbildung 4.23: Schematische Darstellung des artifiziiellen *gltA-icd-mdh*-Operons als Teil des *E. coli*-Chromosoms. Das *B. subtilis*-Operon *citZ-icd-mdh* diente als Vorbild zur Konstruktion einer entsprechenden Transkriptionseinheit in *E. coli*. Die Assemblierung der Gene erfolgte *in silico*, die Synthese des konstruierten DNA-Fragments wurde von GENEART durchgeführt. Die Sequenz des Operons befindet sich im Anhang.

Das Design des Experiments ähnelt dem vorher beschriebenen Versuch mit *B. subtilis*: eine Strep-getaggte Variante des *E. coli*-Citratsynthase-Gens *gltA* wurde in das Genom integriert: bei der ersten Mutante einzeln, bei der zweiten Mutante mit *icd* und *mdh* als artifiziellem Operon (siehe Abbildung 4.24 auf Seite 76). Mit dem Wildtyp als Kontrollstamm erfolgte wieder eine Analyse der drei Stämme hinsichtlich der PPI mittels SPINE.

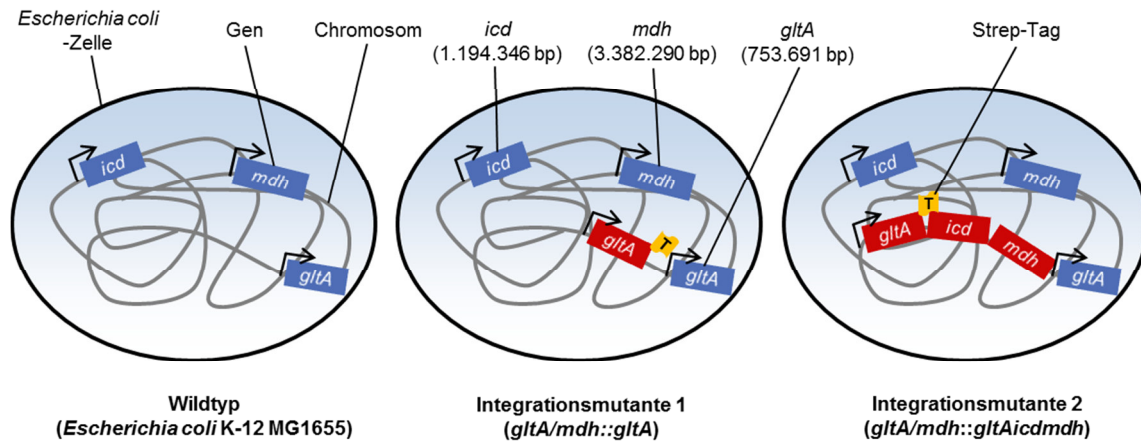


Abbildung 4.24: Schematische Darstellung des Genotyps der *E. coli*-Integrationsmutanten. Dargestellt sind der Wildtyp sowie die beiden Mutanten. Die integrierten Gene sind rot dargestellt (T = Tag), die natürlich vorhandenen blau. Es erfolgte keine Deletion der ursprünglichen Gene, da nur die integrierten Gene mit Tag versehen sind. Im SPINE-Versuch kann nur Strep-GltA aufgereinigt bzw. detektiert werden. Mittels PCR konnte nachgewiesen werden, dass die Integration von *gltA* bzw. des *gltA-icd-mdh*-Operons über die homologen Gene *gltA* oder *mdh* erfolgte.

Eine Voraussetzung für den beschriebenen Versuch ist eine Interaktion der *E. coli* Enzyme GltA, Icd und Mdh; analog zu *B. subtilis*. Mittels Gelfiltration sowie Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation konnten aus *E. coli*-Zelllysate bereits Komplexe der beschriebenen Enzyme isoliert werden (Barnes & Weitzman, 1986). Um diese PPI zu verifizieren, wurden die Gene in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert und die rekombinanten Genprodukte (C-terminale Strep-Tag-Fusion) aufgereinigt. Die angereicherten Proteinfraktionen (siehe Abb. 4.25 A) wurden zur Analyse der PPI mittels Sulfo-SDAD (siehe 4.1.3) eingesetzt. Abbildung 4.25 B auf Seite 77 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse der vernetzten Proteinfraktionen.

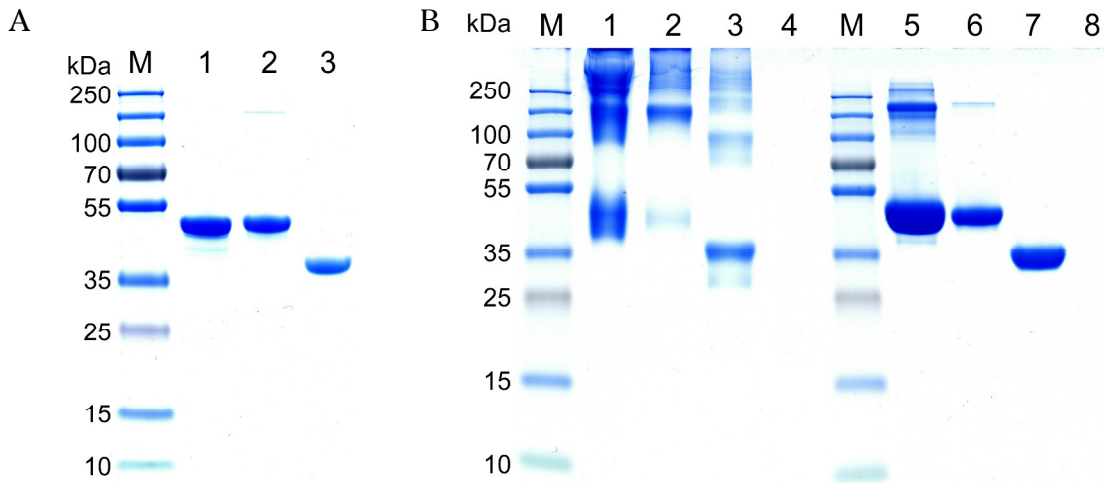


Abbildung 4.25: SDS-PAGE-Analyse zur Bestätigung der PPI der *E. coli*-Citratzyklus-Enzyme. A, Eluate (je 2 µg) der gereinigten *E. coli* Strep-Fusionsproteine GltA (1; 48,0 kDa), Icd (2; 45,8 kDa) und Mdh (3; 32,3 kDa) zum Einsatz im PPI-Experiment mittels Sulfo-SDAD. B, Analyse der PPI mittels Sulfo-SDAD (nachfolgend genannt werden die eingesetzten Köderproteine): 1, GltA -DTT; 2, Icd -DTT; 3, Mdh -DTT; 4, Kontrolle (kein Köderprotein) -DTT; 5, GltA +DTT; 6, Icd +DTT; 7, Mdh +DTT; 8, Kontrolle (kein Köderprotein) +DTT

Aufgrund der geringen Nachweisgrenze für Proteine im SDS-PA-Gel ist eine Identifizierung der Interaktionspartner zwar nicht möglich, dennoch ist die Bildung von Proteinkomplexen, sichtbar in den Proben ohne DTT zur Spaltung der eluierten Aggregate, deutlich erkennbar.

4.5.1 Auswirkungen des artifiziellen Operons auf die PPI von GltA, Icd und Mdh

Die Integration zur Generierung der Integrationsmutanten (Abb. 4.24, S. 76) erfolgte mit Hilfe des pLOI2225-Integrationsvektors, der über ein *single-crossover*-Ereignis ins Bakterienchromosom integriert. Die Interaktion der prokaryotischen Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-Ts ist in der Literatur als starke PPI beschrieben (Kawashima *et al.*, 1996) und diente bei diesem Versuch als Positivkontrolle. Dazu wurde das *tsf*-Gen, das für EF-Ts codiert, zusammen mit *rpsB* (codiert für einen Teil der ribosomalen 30S-Untereinheit) als *rpsB-tsf*-Operon kloniert und der rekombinante Vektor ins Chromosom integriert. Nach Kultivierung der Integrationsmutante in LB-Medium erfolgten Zugabe von Formaldehyd zur Vernetzung der PPI sowie die Aufreinigung der Strep-Tag-Proteinkomplexe. Abbildung 4.26 auf Seite 78 zeigt eine SDS-PAGE-Analyse des Rohextrakts und der angereicherten Proteinfractionen, jeweils mit und ohne Formaldehyd vernetzt. Spuren 2 und 4 zeigen sowohl den Köder (EF-Ts), als auch seinen Interaktionspartner EF-Tu. Die Interaktion ist hier so stark, dass zur Aufreinigung des Interaktionspartners kein Formaldehyd notwendig ist.

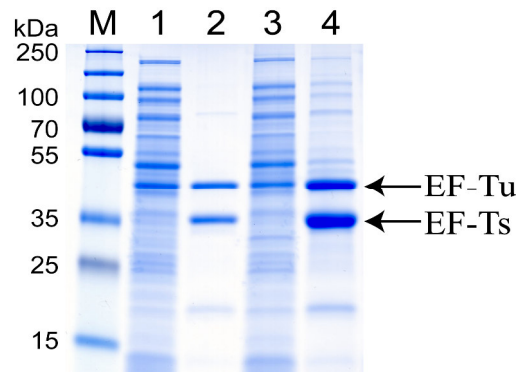


Abbildung 4.26: Interaktion von EF-Ts/EF-Tu als SPINE-Positivkontrolle. Gezeigt ist eine SDS-PAGE-Analyse der Rohextrakte sowie Eluate nach Strep-Tactin-Affinitätschromatographie der *tsf*-Integrationsmutante. Bei den Rohextrakten wurden jeweils 10 µg an Gesamtprotein aufgetragen; die Eluate wurden nach Konzentration vollständig aufgetragen 1, Rohextrakt -FA; 2, Eluat -FA; 3, Rohextrakt +FA; 4, Eluat +FA; M, Molekulargewichtsmarker

Die Generierung der in Abb. 4.24 (S. 76) beschriebenen Integrationsmutanten erfolgte durch Integration von pLOI2225_ *gltA* bzw. pLOI2225_ *gltAicmdh* über den homologen Bereich des chromosomalen *gltA*-Gens; dies wurde mittels PCR verifiziert. Der Test der *gltA*- bzw. *gltAicmdh*-Integrationsmutanten wurde wie bei der EF-Ts/EF-Tu-Positivkontrolle beschrieben durchgeführt. Abbildung 4.27 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der angereicherten und aufkonzentrierten Proteinfractionen des Wildtyps (1+2), der *gltA*-Mutante (3+4) und der *gltAicmdh*-Mutante (5+6). Die erste Probe eines Stammes entspricht jeweils der Behandlung ohne Formaldehyd, die zweite Probe mit Formaldehyd.

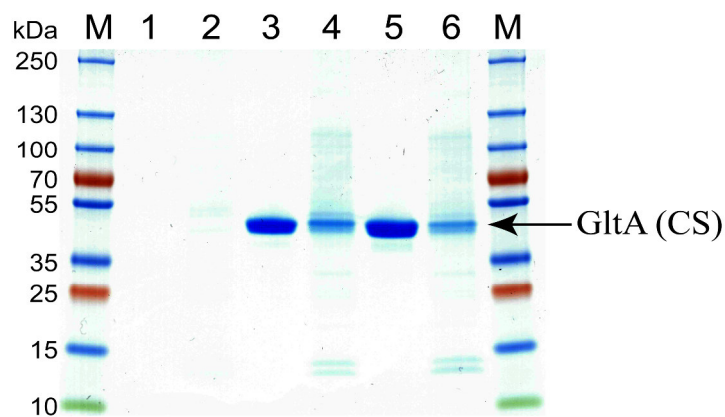


Abbildung 4.27: SDS-PAGE-Analyse der mit SPINE in *E. coli* generierten Proben zum Test der *gltA*- bzw. *gltAicmdh*-Integrationsmutanten. Es wurde bis zu 9 µg Gesamtprotein aufgetragen. 1, Wildtyp -FA; 2, Wildtyp +FA; 3, *gltA*-Integrationsmutante -FA; 4, *gltA*-Integrationsmutante +FA; 5, *gltAicmdh*-Integrationsmutante -FA; 6, *gltAicmdh*-Integrationsmutante +FA; M, Molekulargewichtsmarker

In der Wildtyp-Negativkontrolle wurde erwartungsgemäß kein Protein aufgereinigt, im Gegensatz zu den beiden Mutanten. Hier sind jeweils Banden zu sehen, die der Größe der *E. coli* Citratsynthase GltA (Köderprotein) entsprechen. Im SDS-PA-Gel sind die Interaktionspartner aufgrund der schon zuvor erwähnten geringen Sensitivität und Spezifität der Nachweismethode nicht nachweisbar. Da keine Antikörper gegen die *E. coli*-Enzyme verfügbar waren, wurde versucht, mittels Aktivitätsassays die Anwesenheit der Interaktionspartner nachzuweisen. Aufgrund der geringen Proteinmengen war dies, mit Ausnahme für die angereicherte Citratsynthase, nicht möglich.

Um dennoch eine Aussage zum Einfluss des artifiziellen Operons auf die Komplexbildung von GltA, Icd und Mdh zu erhalten, wurde ein zweiter Versuchsansatz gewählt. Durch Nutzung des pET24a-Expressionsvektors sollte im Vergleich zur chromosomalen Expression sowohl Genkopiezahl- als auch Promotorstärke (T7) erhöht werden, was zu einer erheblich höheren Ausbeute an Fängerprotein (und damit auch an gebundenem Interaktionspartner) im *E. coli*-Expressionsstamm BL21 (DE3) führt. Die Detektion und Quantifizierung der entsprechenden Interaktionspartner in den SPINE-Eluaten erfolgte mittels Enzymassays.

Neben einem *gltA*- und einem *gltAicdmdh*-Expressionsvektor, analog zum vorherigen Versuch in *B. subtilis*, wurden weitere Plasmide generiert, mit denen auch Icd und Mdh als Fängerproteine eingesetzt werden konnten. Als Kontrolle wurde *malE*, das Gen des Maltose-Bindeproteins Mbp, anstelle von *gltA* einzeln bzw. im Operon mit *icd* und *mdh* kloniert. Hiermit sollte gezeigt werden, dass die kovalente Vernetzung von Proteinen in räumlicher Nähe spezifisch für interagierende Proteine (GltA mit Icd und Mdh) stattfindet (Mbp dagegen sollte Icd und Mdh nicht binden).

Da im Eluat des *malE*-Expressionsstammes (artifizielles *malE-icd-mdh*-Operon) MDH-Aktivität detektiert wurde, ist das gewählte Experiment für eine Aussage zur spezifischen Interaktion von GltA, Icd und Mdh nicht geeignet. Durch die T7-basierte Expression besteht ein Großteil der Zellproteine aus dem rekombinanten Köderprotein. Dadurch ist eine Unterscheidung der transienten, schwachen Interaktion der untersuchten Proteine von den unspezifisch gebildeten Proteinaggregaten durch Vernetzung mit Formaldehyd nicht möglich. Durch die Detektion und Quantifizierung der entsprechenden Interaktionspartner in den SPINE-Eluaten mittels Enzymassays konnte dennoch die Funktionalität des artifiziellen Operons verifiziert werden, was Voraussetzung für den im nächsten Abschnitt dargestellten Versuch war.

4.5.2 Einfluss eines Metabolons auf das Wachstumsverhalten

In dieser Arbeit wurde der Einfluss der genetischen Organisationsstruktur auf die Interaktion metabolisch aktiver Enzyme sowie deren erhöhte Aktivität in komplexierter Form (Metabolon) am Beispiel von Enzymen des Citratzyklus untersucht. Unklar ist bislang, ob die Zusammenbringung von Enzymen einen Vorteil für den Organismus darstellen könnte. Da der Citratzyklus bei atmenden Organismen einen zentralen Drehpunkt des Stoffwechsels darstellt, könnte eine Effizienzsteigerung der Stoffwechselprozesse in einem Phänotyp resultieren, z. B. in Form eines schnelleren Wachstums unter aeroben Bedingungen. Um dies näher zu untersuchen, wurde das Wachstum der *E. coli*-Integrationsmutanten (siehe Abb. 4.24 auf Seite 76) und des Wildtyps miteinander verglichen. Die generierten *B. subtilis*-Stämme (siehe Abb. 4.21 auf Seite 71) eignen sich nicht für eine derartige Analyse, da die beiden Integrationsmutanten zusätzlich eine Kopie des ursprünglichen *citZ-icd-mdh*-Operons tragen, welche das Ergebnis verfälschen würden.

Die Kultivierung erfolgte zunächst in M9-Minimalmedium mit 0,4 % Glucose ohne weitere Zusätze. Der Vergleich der Wachstumsverläufe der drei Stämme *gltA/mdh::gltA*, *gltA/mdh::gltAicdmdh* und dem Wildtyp (jeweils in Duplikaten, siehe Abb. 4.30 A auf Seite 82) anhand der optischen Dichte zeigte hierbei keinen Unterschied.

Um einen gewissen Selektionsdruck auszuüben, wurden in einem zweiten Wachstumsversuch spezifische Citratzyklus-Inhibitoren dem Kulturmedium hinzugefügt. Damit sollte eine Mutante, die über einen potentiell „aktiveren“ Citratzyklus verfügt, einen Wachstumsvorteil gegenüber dem Wildtyp aufweisen. In der Literatur beschrieben sind die drei Inhibitoren Fluoracetat, Arsenit und Malonat (Mager *et al.*, 1955; Lenartowicz, 1990; Potter & Dubois, 1943), die über unterschiedliche Mechanismen jeweils ein bestimmtes Enzym des Citratzyklus hemmen (siehe Abbildung 4.28 auf Seite 81). Im Experiment eingesetzt wurden die beiden zuletzt genannten Substanzen. Des Weiteren erfolgte das Wachstum mit Acetat anstatt Glucose als Kohlenstoffquelle. Acetat wird über Acetyl-CoA direkt in den Citratzyklus eingeschleust, wodurch der Stofffluss durch den Zyklus forciert wird. Zudem stellt die *E. coli* Citratsynthase GltA (Teil des artifiziellen Operons *gltA-icd-mdh*) bei Wachstum auf Acetat das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Citratzyklus dar (Walsh & Koshland, 1985; Walsh *et al.*, 1987). Dies sollte einen zusätzlichen Fokus auf den Einfluss der Aktivität von GltA, Icd und Mdh legen.

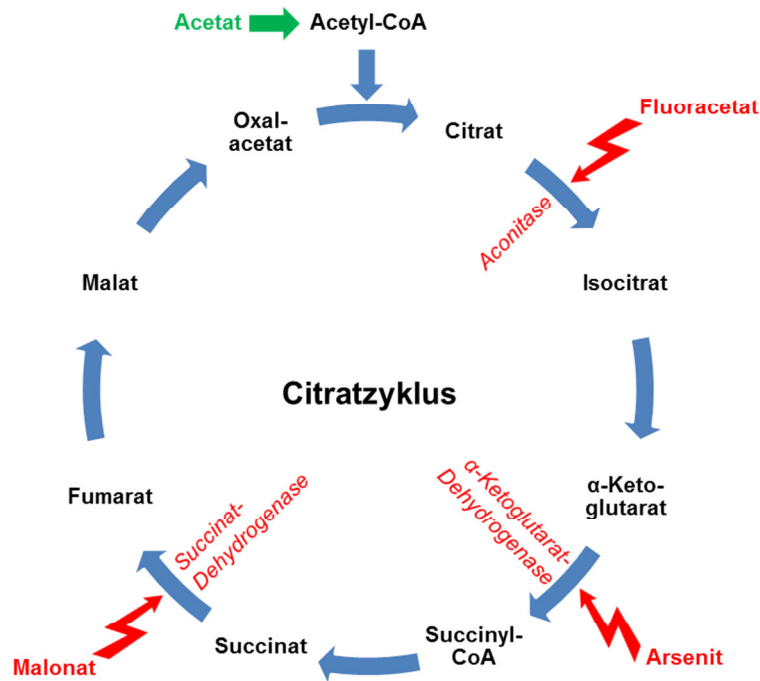


Abbildung 4.28: Angriffsorte bekannter Citratzyklus-Inhibitoren. Fluoracetat wird zu Fluorcitrat umgewandelt, welches die Aconitase irreversibel blockiert (Mager *et al.*, 1955). Arsenit inhibiert die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Lenartowicz, 1990). Malonat hemmt die Succinat-Dehydrogenase durch kompetitive Hemmung, indem es in hoher Dosierung Succinat aus dem aktiven Zentrum verdrängt (Potter & Dubois, 1943). Acetat kann als Kohlenstoffquelle über Acetyl-CoA direkt in den Citratzyklus eingeschleust werden.

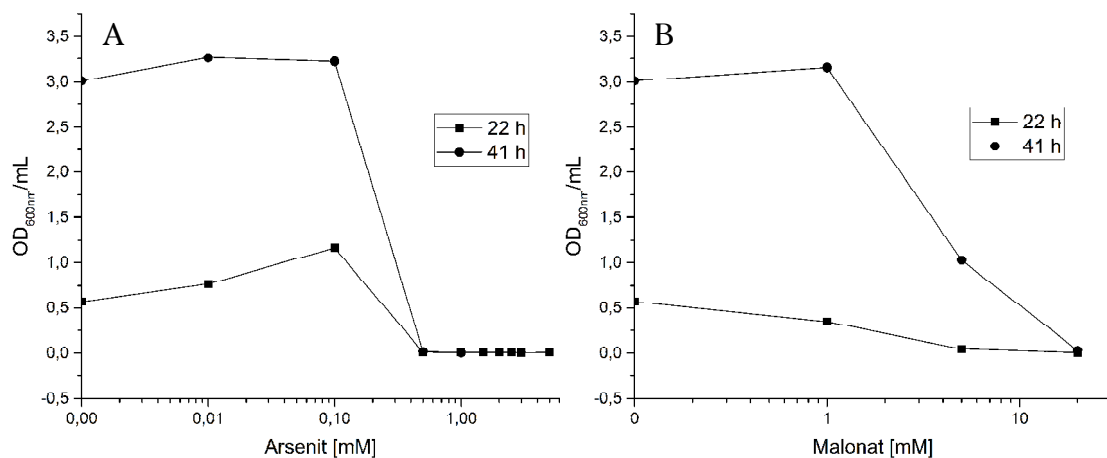


Abbildung 4.29: Vorversuch zur Dosisfindung von Arsenit (A) und Malonat (B) im MOPS-Acetat-MM. Der Einfluss der entsprechenden Substanzen auf das Wachstum von *E. coli* nach 22 bzw. 41 Stunden Inkubation mit der Testsubstanz wurde untersucht. Nach dem Test der Einzelsubstanzen (Graphen A und B) wurde auch der Effekt einer Kombination beider Inhibitoren in verschiedenen Mischungsverhältnissen auf das Wachstum untersucht.

Da die Inhibitoren ab einer gewissen Konzentration toxisch wirken, wurden in einem Vorversuch die größtmöglichen Konzentrationen ermittelt, bei der noch kein oder nur ein gering negativer Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Bakterien festzustellen ist. Dies entspricht einer Konzentration von 0,2 mM für Arsenit und einer Konzentration von 1 mM für Malonat im verwendeten Medium. Der Vorversuch zur Dosisfindung ist in Abb. 4.29 (S. 81) dargestellt. Zur Kultivierung wurde anstelle des M9-Mediums ein MOPS-Minimalmedium verwendet, da sich hiermit in einem Vorversuch mit 100 mM Acetat als Kohlenstoffquelle ein besseres Wachstum zeigte.

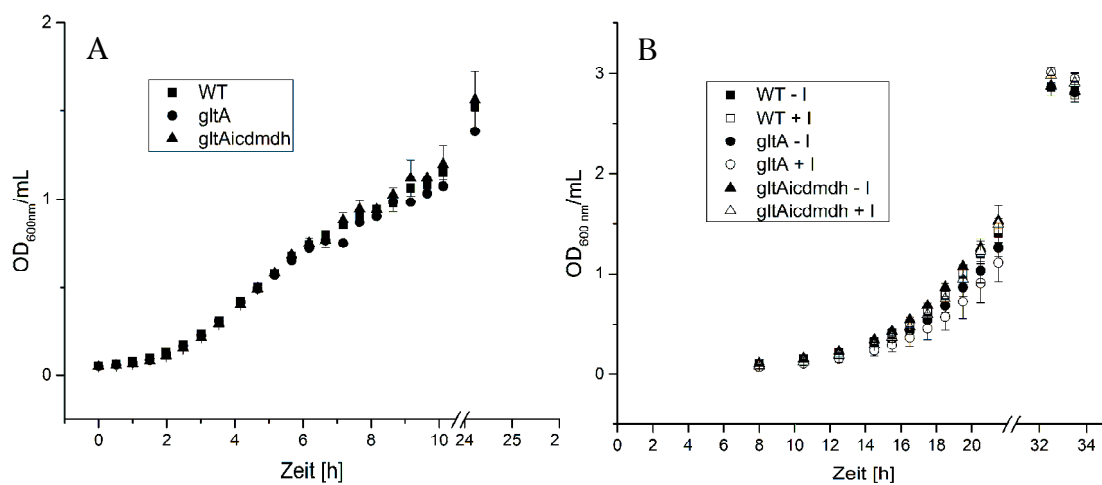


Abbildung 4.30: Die *E. coli*-Integrationsmutanten mit dem artifiziellen *gltA-icd-mdh*-Operon zeigen kein schnelleres Wachstum als die Kontrollstämme. Dargestellt ist ein Vergleich des Wachstumsverhaltens des *E. coli*-Wildtyps MG1655 (WT) sowie der Integrationsmutanten 1 und 2 (*gltA/gltAicdmdh*; siehe Abb. 4.24 auf Seite 76). A, Kultivierung in M9-Glucose-Minimalmedium; B, Kultivierung in MOPS-Acetat-Minimalmedium in An- und Abwesenheit der Citratzyklus-Inhibitoren (I) Arsenit und Malonat.

Abbildung 4.30 B zeigt einen Vergleich der Wachstumsverläufe der drei untersuchten Stämme (jeweils mit und ohne Zugabe der Inhibitoren Arsenit und Malonat) in 5-fach Bestimmung. Bei Vergleich der maximalen Wachstumsraten im exponentiellen Bereich und statistischer Auswertung des Versuchs mittels *t*-Test ergab sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum der verschiedenen Stämme. Damit hat die Mutante mit dem artifiziellen *gltA-icd-mdh*-Operon unter den gewählten Versuchsbedingungen keinen Wachstumsvorteil durch einen möglicherweise effizienteren Citratzyklus.

5 Diskussion

5.1 Der Einfluss eines Operons auf die Interaktion der Genprodukte

Die Organisation von Genen in Transkriptionseinheiten ist ein wichtiges strukturelles Merkmal prokaryotischer Genome (Bratlie *et al.*, 2010). Dadurch ist nur ein Steuerungsmechanismus zur Expressionskontrolle nötig und die gleichzeitige Transkription mehrerer Gene ist sichergestellt. Im Gegensatz zu eukaryotischen Genomen befinden sich durchschnittlich 50 % aller prokaryotischen Gene eines Genoms in einem Operon (Price *et al.*, 2006). Die Transkription einer solchen DNA-Funktionseinheit resultiert in einer polycistronischen mRNA, die die Sequenzinformation aller im Operon codierten Enzyme enthält. Dadurch findet die Synthese der jeweiligen Genprodukte des Operons bei der nachfolgenden Translation des mRNA-Strangs durch die Ribosomen in unmittelbarer räumlicher Nähe zueinander statt. Diese Nähe könnte ein Vorteil bei der Interaktion dieser Enzyme sein, da nur sehr kurze Diffusionsstrecken zurückgelegt werden müssen und damit ein Zusammentreffen der Interaktionspartner in kürzester Zeit sehr wahrscheinlich ist. Im Hinblick auf die hohen Konzentrationen an Makromolekülen innerhalb einer Bakterienzelle (Ellis, 2001a) und der damit verbundenen Vielzahl an Diffusionsbarrieren sowie möglichen anderen Interaktionspartnern sollte die Fähigkeit verschiedener Proteine, miteinander zu interagieren, durch Synthese in unmittelbarer Nachbarschaft zwar nicht grundsätzlich ermöglicht, aber prinzipiell begünstigt werden.

Dieser Vorteil von Transkriptionseinheiten konnte durch einen Versuch mit den drei Citratzyklus-Enzymen CS, ICD und MDH aus *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) bestätigt werden. In diesem Versuch diente eine Strep-getaggte Version der Citratsynthase als Köderprotein, um ICD und MDH durch Interaktion *in vivo* mit dem Köder einzufangen. Dies war nur in dem rekombinanten *B. subtilis*-Stamm möglich, in dem die entsprechenden Gene eine Transkriptionseinheit bilden. In einem anderen *B. subtilis*-Integrationsstamm, in dem die Gene für Köder- und Beuteproteine nicht in einer gemeinsamen Transkriptionseinheit liegen, konnte keine Interaktion festgestellt werden (siehe 4.4).

Dass die Assemblierung von Proteinkomplexen dagegen nicht durch zufällige Kollisionen der Interaktionspartner im Cytosol, sondern gezielt schon während des Translationsvorganges stattfinden kann, konnte in einem Experiment mit den beiden Untereinheiten einer bakteriellen Luciferase (LuxA und LuxB, kodiert im *luxCDABE*-Operon) gezeigt werden (Shieh *et al.*, 2015). Die Affinität der wachsenden Polypeptidketten LuxA

und LuxB zueinander ist dagegen reduziert, wenn die Gene *luxA* und *luxB* nicht eine Transkriptionseinheit bilden und damit von verschiedenen mRNAs translatiert werden (Shieh *et al.*, 2015). Dies bestätigt die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnisse für die Interaktion in räumlicher Nähe synthetisierter CS, ICD und MDH und liefert eine mögliche Erklärung dafür, warum eine Interaktion nur dann möglich ist, wenn die Synthese der Interaktionspartner durch Kotranslation von einem mRNA-Strang am gleichen Ort im bakteriellen Cytoplasma stattfindet (Kapitel 4.4). Eine Interaktion noch vor Abschluss des Translationsvorganges ist prinzipiell auch für den CitZ-Icd-Mdh-Komplex denkbar. Im Falle von getrennten Transkriptionseinheiten wäre nur eine Interaktion der bereits vollständig synthetisierten und nativ gefalteten Proteine möglich, ohne dass es bereits während der Synthese zum Kontakt mit den Interaktionspartnern käme. CitZ, Icd und Mdh interagieren auch *in vitro* (also nach abgeschlossener Synthese und Proteinfaltung), nachdem man die Enzyme in bakteriellem Zelllysate zusammengebracht hat. Dies wurde durch den Versuch zur Vernetzung der Interaktionspartner mit Sulfo-SDAD und Reinigung des Komplexes aus Zelllysate in Kapitel 4.1.3 gezeigt. Damit kann eine mögliche Interaktion der Citratzyklus-Enzyme noch während der Translation zumindest nicht der ausschlaggebende Grund für eine erfolgreiche Komplexbildung sein, wenn auch allgemein durch Kotranslation die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens der gebildeten Proteine, und damit zur Interaktion, höher ist.

In dem in Kapitel 4.4 beschriebenen Versuch (siehe oben) konnte eine *in vivo* Interaktion von CitZ, Icd und Mdh in dem Stamm, in dem die entsprechenden Gene in getrennten Transkriptionseinheiten liegen, nicht nachgewiesen werden. Neben der zuvor erwähnten räumlich separierten Translation könnte ein weiterer Grund für eine nicht nachweisbare Interaktion die Tatsache sein, dass die Synthese an unterschiedlichen Orten im Cytosol des Bakteriums (je nach Lokalisation der entsprechenden Gene) stattfindet und damit ein Kontakt der Interaktionspartner erst nach dem Zurücklegen einer gewissen Diffusionsstrecke erfolgen kann. Die hohen Konzentrationen an verschiedenen Proteinen und Nukleinsäuren (*macromolecular crowding*; Ellis, 2001a), die selbst durch Präsentation einer Vielzahl an hydrophilen, hydrophoben, positiven und negativen Oberflächen Anziehungskräfte auf sämtliche Biomoleküle ausüben, bewirken eine Reduzierung der Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine (Dix & Verkman, 2008). Neben einer zusätzlich erhöhten Viskosität im Vergleich zu wässrigen, verdünnten Lösungen wird zudem die Diffusionsstrecke erheblich durch Proteincluster verlängert, die zahlreiche Hindernisse für die diffundierenden Proteine darstellen (Spitzer & Poolman, 2013). Am Beispiel des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) wurde gezeigt, dass sich der Diffusionskoeffizient im *E. coli*-Cytoplasma um den Faktor 11, im Vergleich zu Wasser, reduziert

(Elowitz *et al.*, 1999). Diese erschwerte Diffusion fällt bei extrem kurzen Distanzen zwischen den Interaktionspartnern CitZ, Icd und Mdh, wie sie nach Translation des polycistronischen mRNA-Strangs am Ribosom vorhanden sind, kaum ins Gewicht und würde die Ergebnisse aus Kapitel 4.4 erklären (siehe Abbildung 5.1). Spitzer und Poolman beschreiben das Cytoplasma eines Bakteriums als Zwei-Phasen-System, bestehend aus einem Bereich mit einer sehr hohen Makromolekülkonzentration (*cytogel*) und einem Bereich mit geringerer Makromolekülkonzentration (*cytosol*). Danach existiert auch in Bakterien ein gewisser Organisationsgrad zellulärer Strukturen. Die (Ko-)Lokalisierung von Proteinen in diesem System durch ein Operon trägt damit zu dieser Organisation bei.

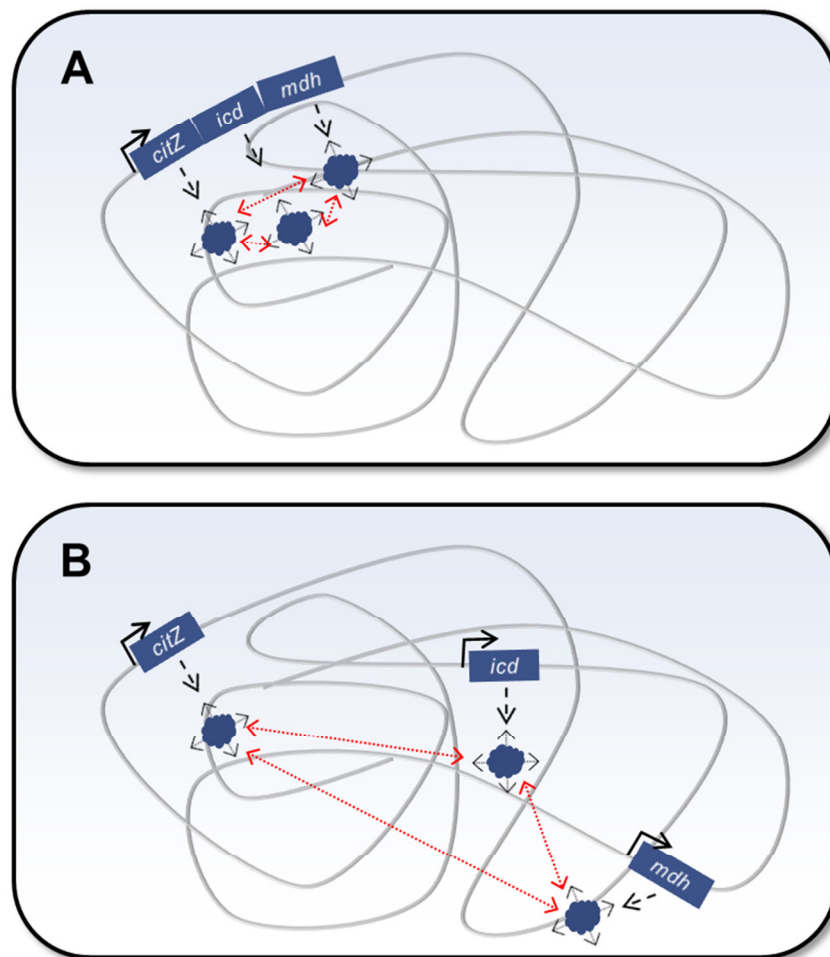


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung von möglichen Organisationsformen zweier Bakterienarten mit *citZ*, *icd* und *mdh* in einer (A) und verschiedenen (B) Transkriptionseinheiten. Die wesentlich kürzeren Diffusionswege zwischen den Interaktionspartnern im Fall (A) führen zu einer ungehinderten Komplexbildung der Proteine, während bei (B) das *macromolecular crowding* ein Hindernis für die Komplexbildung darstellt. Die roten Pfeile stellen die jeweils kürzesten Diffusionswege zur Bildung des Metabolons dar.

Aus zuvor aufgeführten Gründen ist bei Translation verschiedener mRNA-Stränge zumindest eine Verzögerung in der Komplexierung der gebildeten Interaktionspartner zu erwarten, die je nach Anzahl der beteiligten Interaktionspartner mehr oder weniger ausgeprägt ist. Unter der Annahme, dass alle Citratzyklus-Enzyme einen Komplex (Metabolon) bilden, fallen die beim Operon vorliegenden kurzen Diffusionswege umso mehr ins Gewicht und würden den Vorteil einer schnelleren Assemblierung des Metabolons bieten. In der Literatur gibt es bereits Vorschläge für die Existenz eines Superkomplexes aller Citratzyklus-Enzyme in den Mitochondrien von Schweine- bzw. Rinderherzen (Lyubarev & Kurganov, 1989). Die Existenz eines solchen Superkomplexes müsste für *B. subtilis* noch untersucht werden; bisher ist nur die Interaktion von CitZ, Icd und Mdh bekannt (siehe Ergebnisse in dieser Arbeit sowie Meyer *et al.*, 2011), die aber als Gerüst für die anderen Enzyme des Citratzyklus dienen könnten.

Eine für eine Katalyse notwendige PPI von Enzymen könnte ein Grund für die „Konservierung“ einer Operon-Struktur sein. Eine systematische Untersuchung neun verschiedener Bakterien- und Archaeen-Genome zeigte, dass die Genorganisation (bzw. -reihenfolge, und damit die Operon-Struktur) zwar insgesamt nur zu einem geringen Teil konserviert ist, die konservierten Genpaare aber zu 75 % eine Interaktion der Genprodukte aufweisen (Dandekar *et al.*, 1998). Zum Beispiel liegen die zwei Untereinheiten der Tryptophan-Synthase, TrpA und TrpB, in allen untersuchten Organismen als Genpaar vor und katalysieren als Proteinkomplex eine einzige Reaktion (Dandekar *et al.*, 1998). Im Falle der untersuchten Enzyme des Citratzyklus ist die Reihenfolge der Gene für CS, ICD und MDH in der Gattung *Bacillus* konserviert (Meyer *et al.*, 2011). In *E. coli* dagegen liegen die Gene, im Gegensatz zu *B. subtilis*, nicht in einem Operon (siehe Abb. 4.24 auf Seite 76). Eine koordinierte Expression durch ein Operon bringt den Vorteil, dass nur ein Steuerungsmechanismus für die Biosynthese vorhanden sein muss. Nach Bindung der Polymerase entstehen immer gleichzeitig ähnliche Mengen an CS, ICD und MDH, die auch immer zusammen vorhanden sein müssen, da sonst ein Ungleichgewicht der katalytischen Enzyme herrscht und der Citratzyklus nicht vollständig ablaufen kann.

Insgesamt ist festzuhalten, dass die Existenz eines Operons in Bakterien nicht unbedingt eine Interaktion der darin codierten Enzyme bedeutet, aber bei konservierter Operon-Architektur wahrscheinlicher als bei getrennten Genen ist (Dandekar *et al.*, 1998). Statistisch tendieren Proteine, deren Gene meistens Teil eines Operons sind, zu wenigen Interaktionspartnern (Bratlie *et al.*, 2010). Für Proteine, deren Gene in verschiedenen Organismen sowohl einzeln, als auch im Operon vorliegen (siehe vorliegendes Beispiel des Citratzyklus), sind statistisch mehrere Interaktionspartner vorhanden, die Protein-

komplexe sind dynamischer und weisen eine langsamere Evolutionsrate auf (Bratlie *et al.*, 2010). Diese Aussage gilt allerdings nicht für ribosomale Proteine, die essentielle Proteinkomplexe bilden und deren Gene eine starke Tendenz zur Partizipation in Transkriptionseinheiten aufweisen sowie stark konserviert sind. Ob ein Zusammenhang zwischen genetischer Organisation und Protein-Protein-Interaktion der Genprodukte besteht, kann demnach nicht generalisiert beantwortet und muss im Einzelfall untersucht werden.

5.2 Ein Citratzyklus-Metabolon ist aktiver als frei diffundierende Enzyme

Neben der Frage, ob eine Operon-Architektur prinzipiell PPI begünstigt, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine Katalyse im Komplex hinsichtlich der Umsatzrate effizienter abläuft als durch räumlich getrennte bzw. nicht interagierende Einzelenzyme. Der Vorteil eines Metabolons liegt im direkten Transfer der Stoffwechselintermediate zwischen den aktiven Zentren der beteiligten Enzyme (*substrate channeling* oder *metabolite channeling*), ohne dass es zu einer Diffusion in andere Bereiche des Cytosols und damit einer Gleichverteilung des Metaboliten im umgebenden Medium kommt (Zhang, 2011). Während die Diffusion niedermolekularer Metabolite nur unwesentlich durch die Viskosität des makromolekular hochkonzentrierten Cytosols beeinträchtigt wird, gilt dies nicht für die hochmolekularen Enzyme (siehe vorheriger Abschnitt). Zudem sind in den zentralen Stoffwechselwegen die intrazellulären Enzymkonzentrationen häufig wesentlich höher als die der zugehörigen Stoffwechselintermediate. So liegt zum Beispiel die Konzentration des Glykolyse-Intermediats Glycerinaldehyd-3-phosphat im *E. coli*-Cytoplasma bei 80 μM , während die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit 1,4 mM eine wesentlich höhere Konzentration aufweist (Srivastava & Bernhard, 1986). In diesem Beispiel sind 17,5-mal mehr Enzym- als Substratmoleküle in der Zelle. Somit liegt die Mehrheit der Metabolite nicht frei im Cytoplasma, sondern gebunden an Enzymen vor (Zhang, 2011), was einen Vorteil eines Enzymkomplexes im Gegensatz zu diffus verteilten Enzymen für einen effizienten Substratumsatz durch *metabolite channeling*, und damit direkter Weitergabe der gebundenen Substratmoleküle, darstellt.

Eine experimentelle Analyse dieser Proteinkomplexe ist extrem schwierig, weil gerade transiente Komplexe nur unter bestimmten Voraussetzungen gebildet werden, die in der Zelle gegeben sind. Die in Kapitel 4.1 dargestellten Versuche zum Nachweis der Interaktion von CitZ, Icd und Mdh bestätigten dies, da die Bildung des Komplexes nur in konzentriertem Zellysate nachgewiesen werden konnte (in einer definierten, niedrig kon-

zentrierten Pufferlösung dagegen nicht, siehe 4.1.3 und 4.1.4). Eine Erklärung hierfür könnte der *excluded volume effect* bieten, durch den einem Protein(komplex) in einer Umgebung mit hoher Makromolekülkonzentration, wie in der Bakterienzelle, nur ein geringes Volumen zur Verfügung steht. Die Faltung und Assemblierung mehrerer Protein(untereinheiten) führt zu einer Konformation, die weniger Volumen in Anspruch nimmt und die Kontaktfläche mit dem wässrigen Milieu minimiert, was einen thermodynamischen Vorteil bietet (siehe dazu Abbildung 5.2).

So hängt auch das *substrate channeling* als Folge der Bildung eines Metabolons von der (intrazellulären) Proteinkonzentration ab, die ~70 % des Makromolekülgewichts einer Zelle ausmacht (Zimmerman & Trach, 1991). Um dieses *macromolecular crowding* dennoch *in vitro* nachahmen zu können, werden *crowding agents* verwendet. Am Beispiel des Hämoglobins wurde gezeigt, dass der Aktivitätskoeffizient (Verhältnis von thermodynamisch wirksamer Konzentration zu tatsächlicher Konzentration) bei 340 g/L Hämoglobin 27-mal höher ist als bei 100 g/L (Ellis, 2001a). In diesem Fall sind *crowding agent* und interagierendes Molekül identisch.

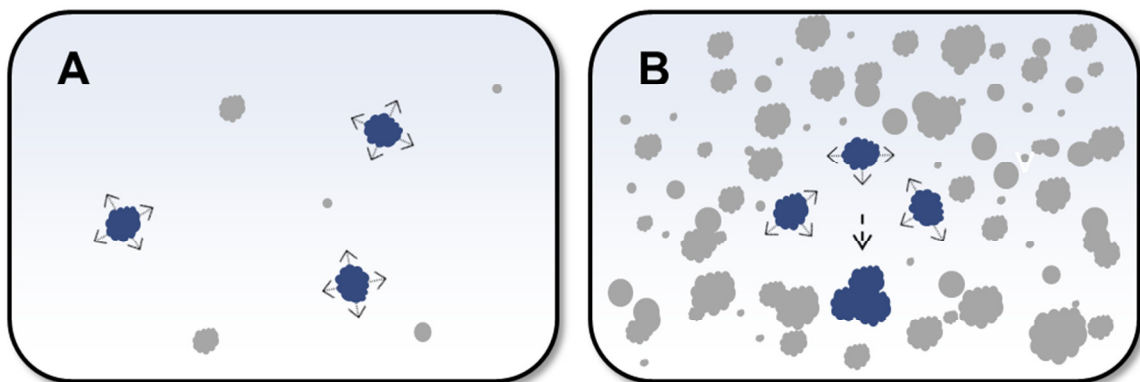


Abbildung 5.2: Die Auswirkungen des *excluded volume effects* auf die Bildung eines Metabolons in einer intrazellulären Umgebung mit niedriger (A) und sehr hoher (B) Makromolekülkonzentration. Die nicht an der Komplexbildung beteiligten Proteine (grau) führen auf Grund der hohen Konzentration und der Abstoßung untereinander zu einer Verringerung des löslichen Cytoplasmavolumens und begünstigen damit die Proteinaggregation (blau dargestellte Proteine).

In dieser Arbeit wurden sowohl synthetische (Ficoll 70), als auch natürliche (BSA) *crowding agents* eingesetzt. Diese Substanzen sind in der Literatur als gängige *crowding agents* beschrieben (Ellis, 2001a). In deren Umgebung, sowie in Gegenwart sämtlicher für die Katalyse benötigten Substrate und Cofaktoren, sollte die Bildung eines Metabolons, wie in der Bakterienzelle, möglich sein. So wurde wie erwartet eine höhere Enzymaktivität für die sequentielle MDH/CS-Reaktion in Anwesenheit dieser *crowding agents* gemessen, was wahrscheinlich auf die Bildung eines MDH-CS-Enzymkomplexes mit

den einhergehenden Vorteilen des *substrate channeling*, wie der Beschleunigung von Reaktionsraten, zurückzuführen ist. Der in Kapitel 4.3 dargestellte Versuch zeigte, dass die Aktivität der sequentiellen MDH/CS-Reaktion nur durch die An- und Abwesenheit von Proteinen beeinflusst werden kann. So wurde bei Zugabe eines 40-fachen Überschusses an inaktiver MDH eine Steigerung der zusammengesetzten MDH/CS-Aktivität um 100 % beobachtet. Dies war nicht zu erwarten, da in einem Vorversuch bestätigt wurde, dass die durch Substitution einer Aminosäure im aktiven Zentrum generierte Mutante nicht zur Umsetzung des Substrats (Malat zu Oxalacetat) befähigt ist. Zudem kann ein unspezifischer „*crowding*“-Effekt, wie durch BSA und Ficoll 70 hervorgerufen, ausgeschlossen werden, da bei Zugabe von Kontrollproteinen in gleicher Konzentration keine Aktivitätssteigerung beobachtet wurde. Bei Zugabe dieser Mutante kommt es zu einer Verdrängung des aktiven Enzyms aus dem MDH-CS-Komplex (die Mutation stört nicht die Fähigkeit zur Interaktion, siehe Tabelle 4.2 auf Seite 65), sodass ein Metabolon entsteht, das aus inaktiver MDH, aktiver MDH (diese ist in der Mischung ja noch vorhanden) und aktiver CS besteht. Aufgrund dieser Tatsache muss die Malat-Dehydrogenase im MDH-CS-Enzymkomplex von *B. subtilis* beim Umsatz von Malat zu Oxalacetat und weiter zu Citrat nicht nur katalytische, sondern auch eine strukturelle Funktion besitzen. Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt, stellt die MDH bei dieser Reaktion das limitierende Enzym dar und die Menge des Produkts Oxalacetat bestimmt letztlich, wieviel Citrat am Ende entstehen kann. Es ist somit denkbar, dass die effiziente Weitergabe des Intermediats Oxalacetat beim Umsatz eine entscheidende Rolle spielt, die auch durch die inaktive MDH möglich wäre, weil diese strukturell mit der aktiven Variante nahezu identisch ist. Dies könnte durch eine Art Tunnel oder ein Gerüst, das von der MDH gebildet wird, ermöglicht werden. Ein Beispiel für einen solchen Mechanismus zeigt die Tryptophan-Synthase, die Indol über eine Tunnel von der α -Untereinheit zur β -Untereinheit befördert (Huang *et al.*, 2001). Da die MDH aus *B. subtilis* in nativer Konformation einen hohen Multimerisierungsgrad besitzt (das Enzym liegt als Homotetramer vor), ist es denkbar, dass im diskutierten Versuch auch eine Aggregation mehrerer Tetramere stattfindet. Dieser Zusammenhang müsste weiter strukturellbiologisch untersucht werden, z. B. durch Kristallisation des Enzyms bzw. des Enzymkomplexes, was bisher noch nicht erfolgt ist (Bartholomae *et al.*, 2014).

Ein weiterer Grund für den aktivitätssteigernden Effekt der inaktiven MDH könnte eine kontinuierliche Versorgung der aktiven Enzyme mit dem Ausgangssubstrat Malat sein. Die Katalyse von Malat zu Oxalacetat besitzt als einzige Reaktion im Citratzyklus ein positives $\Delta G^{0'}$ und ist somit endergon, wodurch nahezu kein freies Malat im Cytoplasma zur Verfügung steht. Zudem liegt ein Großteil der Primärmetabolite in der Zelle gebunden an Enzyme und nicht als freie Substrate vor (Zhang, 2011; siehe zuvor erwähntes

Beispiel der GAPDH). Die inaktive MDH könnte Malat binden, dem aktiven Pendant im Komplex zur Verfügung stellen und somit das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des Produkts Oxalacetat verschieben. Die Citratsynthase übernimmt den nächsten Katalyseschritt zur Kondensation von Oxalacetat und Acetyl-Coa zu Citryl-CoA, das schließlich zu Citrat und Coenzym A hydrolysiert. Während die MDH auch eine strukturgebende Funktion in der Assemblierung des Metabolons zu haben scheint, scheint sich die Funktion der Citratsynthase auf die reine Katalyse zu beschränken, da bei zusätzlicher Zugabe einer inaktiven CS keine Aktivitätssteigerung festgestellt wurde. Unklar ist bislang, ob die zweite Citratsynthase aus *B. subtilis*, CitA (siehe Kapitel 1.5.1) beim genannten Komplex eine Rolle spielt. Das Hauptenzym CitZ ist für die Katalyse zuständig, somit wäre eine strukturgebende Funktion von CitA, ähnlich der der MDH, prinzipiell denkbar. Dass die MDH eine besondere Stellung als strukturgebendes Protein im Citratzyklus von *B. subtilis* besitzt, bestätigt die Arbeit von Bartholomae *et al.*, da hier auch eine Steigerung von Enzymaktivitäten durch die Anwesenheit der MDH gezeigt werden konnte; in diesem Fall eine Steigerung der ICD-Aktivität. So wurde eine Verdopplung der ICD-Aktivität bei 43 nM Enzymmenge und Zugabe von 300 nM MDH beobachtet (Bartholomae *et al.*, 2014).

Interessanterweise bewirkt die Anwesenheit der Isocitrat-Dehydrogenase (ICD), wie die der inaktiven MDH, ebenso eine Steigerung der MDH/CS-Aktivität, obwohl dieses Enzym an der Katalyse dieser sequentiellen Reaktion nicht beteiligt ist (siehe Abbildung 4.18 auf Seite 68). Die ICD katalysiert im Citratzyklus den von der CS aus gesehen übernächsten Schritt der oxidativen Decarboxylierung von Isocitrat zu α -Ketoglutarat. Wie in Kapitel 4.1.3 gezeigt, ist das Enzym dennoch ein Interaktionspartner für CS und MDH, worin wahrscheinlich der aktivitätssteigernde Effekt begründet liegt, indem das Enzym möglicherweise zur Bildung und Stabilisierung des CitZ-Icd-Mdh-Metabolons beiträgt. Dies müsste unter Nutzung einer inaktiven Variante näher untersucht werden.

Das beschriebene Experiment deutet somit darauf hin, dass am Beispiel des Citratzyklus in *B. subtilis* ein Enzymkomplex einen Vorteil durch schnellere Umsetzung der Substrate im Vergleich zu nicht interagierenden Enzymen darstellt. Um diese Aussage zu verifizieren, sind weitere Studien notwendig. Dazu müsste ein Verfahren etabliert werden, dass eine klare Unterscheidung zwischen der Umsetzung von Malat zu Citrat durch einen Enzymkomplex einerseits und einer Umsetzung durch (räumlich) getrennte Einzelenzyme andererseits zulässt, wobei hier ein ungehinderter Austausch der Intermediate Voraussetzung ist. Durch Analyse des Enzymkomplexes mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden könnte eine Kollokalisierung der Citratzyklus-Enzyme *in vivo* bewiesen werden, während die genaue Stöchiometrie sowie Art der Zusammensetzung des Meta-

bolons nur mit strukturebiologischen Methoden aufzuklären ist. Dies ist bei transienten Proteinkomplexen jedoch schwierig, da die dazu verwendeten Methoden eine Isolierung und Aufreinigung der zu untersuchenden Moleküle erfordern. Im Falle transienter Komplexe bedeutet dies häufig eine Auflösung des Komplexes, da die Proteine außerhalb der Zelle die Fähigkeit zur Interaktion verlieren.

6 Literaturverzeichnis

- Antoniewski, C., Savelli, B. & Stragier, P. (1990).** The spoIIJ gene, which regulates early developmental steps in *Bacillus subtilis*, belongs to a class of environmentally responsive genes. *J Bacteriol* **172**, 86–93.
- Aumiller, W. M., Davis, B. W., Hatzakis, E. & Keating, C. D. (2014).** Interactions of macromolecular crowding agents and cosolutes with small-molecule substrates: effect on horseradish peroxidase activity with two different substrates. *J Phys Chem B* **118**, 10624–10632.
- Barnes, S. J. & Weitzman, P. D. (1986).** Organization of citric acid cycle enzymes into a multienzyme cluster. *FEBS Lett* **201**, 267–270.
- Bartholomae, M., Meyer, F. M., Commichau, F. M., Burkovski, A., Hillen, W. & Seidel, G. (2014).** Complex formation between malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase from *Bacillus subtilis* is regulated by tricarboxylic acid cycle metabolites. *FEBS J* **281**, 1132–1143.
- Bergmeyer, H. U. (1986).** *Methods of enzymatic analysis*, 3rd edn. Weinheim: Verl. Chemie.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293–300.
- Bisswanger, H. (2012).** *Practical enzymology*, 1st edn. Weinheim: Wiley-Blackwell.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Bratlie, M. S., Johansen, J. & Drabløs, F. (2010).** Relationship between operon preference and functional properties of persistent genes in bacterial genomes. *BMC Genomics* **11**, 71.
- Braun, P. & Gingras, A.-C. (2012).** History of protein-protein interactions: from egg-white to complex networks. *Proteomics* **12**, 1478–1498.
- Chothia, C. & Janin, J. (1975).** Principles of protein-protein recognition. *Nature* **256**, 705–708.

- Cohen, S. N., Chang, A. C. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110–2114.
- Commichau, F. M., Gunka, K., Landmann, J. J. & Stülke, J. (2008).** Glutamate metabolism in *Bacillus subtilis*: gene expression and enzyme activities evolved to avoid futile cycles and to allow rapid responses to perturbations of the system. *J Bacteriol* **190**, 3557–3564.
- Conrado, R. J., Varner, J. D. & DeLisa, M. P. (2008).** Engineering the spatial organization of metabolic enzymes: mimicking nature's synergy. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 492–499.
- Conrado, R. J., Wu, G. C., Boock, J. T., Xu, H., Chen, S. Y., Lebar, T., Turnšek, J., Tomšič, N. & Avbelj, M. & other authors (2012).** DNA-guided assembly of biosynthetic pathways promotes improved catalytic efficiency. *Nucleic Acids Res* **40**, 1879–1889.
- Cusick, M. E., Klitgord, N., Vidal, M. & Hill, D. E. (2005).** Interactome: gateway into systems biology. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**, R171-81.
- Dandekar, T., Snel, B., Huynen, M. & Bork, P. (1998).** Conservation of gene order: a fingerprint of proteins that physically interact. *Trends Biochem Sci* **23**, 324–328.
- Daruvar, A. de, Collado-Vides, J. & Valencia, A. (2002).** Analysis of the cellular functions of *Escherichia coli* operons and their conservation in *Bacillus subtilis*. *J Mol Evol* **55**, 211–221.
- Debnam, P. M., Shearer, G., Blackwood, L. & Kohl, D. H. (1997).** Evidence for channeling of intermediates in the oxidative pentose phosphate pathway by soybean and pea nodule extracts, yeast extracts, and purified yeast enzymes. *Eur J Biochem* **246**, 283–290.
- Dix, J. A. & Verkman, A. S. (2008).** Crowding effects on diffusion in solutions and cells. *Annu Rev Biophys* **37**, 247–263.
- Dueber, J. E., Wu, G. C., Malmirchegini, G. R., Moon, T. S., Petzold, C. J., Ullal, A. V., Prather, K. L. J. & Keasling, J. D. (2009).** Synthetic protein scaffolds provide modular control over metabolic flux. *Nat Biotechnol* **27**, 753–759.

- Dunn, M. F., Niks, D., Ngo, H., Barends, T. R. M. & Schlichting, I. (2008).** Tryptophan synthase: the workings of a channeling nanomachine. *Trends Biochem Sci* **33**, 254–264.
- Easterby, J. S. (1981).** A generalized theory of the transition time for sequential enzyme reactions. *Biochem J* **199**, 155–161.
- Elcock, A. H., Potter, M. J., Matthews, D. A., Knighton, D. R. & McCammon, J. A. (1996).** Electrostatic channeling in the bifunctional enzyme dihydrofolate reductase-thymidylate synthase. *J Mol Biol* **262**, 370–374.
- Ellis, R. J. (2001a).** Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. *Curr Opin Struct Biol* **11**, 114–119.
- Ellis, R. J. (2001b).** Macromolecular crowding: obvious but underappreciated. *Trends Biochem Sci* **26**, 597–604.
- Elowitz, M. B., Surette, M. G., Wolf, P. E., Stock, J. B. & Leibler, S. (1999).** Protein mobility in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**, 197–203.
- Ermolaeva, M. D., White, O. & Salzberg, S. L. (2001).** Prediction of operons in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **29**, 1216–1221.
- Eventoff, W., Rossmann, M. G., Taylor, S. S., Torff, H. J., Meyer, H., Keil, W. & Kiltz, H. H. (1977).** Structural adaptations of lactate dehydrogenase isozymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 2677–2681.
- Fuchs, G., Schlegel, H. G. & Eitinger, T., eds. (2007).** *Allgemeine Mikrobiologie. 53 Tabellen*, 8th edn. Stuttgart: Thieme.
- Golemis, E. A. & Adams, P. D., eds. (2005).** *Protein-protein interactions. A molecular cloning manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Goward, C. R. & Nicholls, D. J. (1994).** Malate dehydrogenase: a model for structure, evolution, and catalysis. *Protein Sci* **3**, 1883–1888.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Harwood, C. R. & Cutting, S. M. (1990).** *Molecular biological methods for Bacillus*. Chichester, New York: Wiley.

- Herzberg, C., Weidinger, L. A. F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. & Comichau, F. M. (2007).** SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* **7**, 4032–4035.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2002).** Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789–798.
- Huang, X., Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001).** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **70**, 149–180.
- Jacob, F. & Monod, J. (1961).** Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* **3**, 318–356.
- Jiao, M., Li, H.-T., Chen, J., Minton, A. P. & Liang, Y. (2010).** Attractive protein-polymer interactions markedly alter the effect of macromolecular crowding on protein association equilibria. *Biophys J* **99**, 914–923.
- Jin, S., Jesús-Berrios, M. de & Sonenshein, A. L. (1996).** A *Bacillus subtilis* malate dehydrogenase gene. *J Bacteriol* **178**, 560–563.
- Jin, S., Levin, P. A., Matsuno, K., Grossman, A. D. & Sonenshein, A. L. (1997).** Deletion of the *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase gene causes a block at stage I of sporulation. *J Bacteriol* **179**, 4725–4732.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L. (1994a).** Identification of two distinct *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**, 4669–4679.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L. (1994b).** Transcriptional regulation of *Bacillus subtilis* citrate synthase genes. *J Bacteriol* **176**, 4680–4690.
- Jin, S. & Sonenshein, A. L. (1996).** Characterization of the major citrate synthase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**, 3658–3660.
- Jones, S. & Thornton, J. M. (1995).** Protein-protein interactions. A review of protein dimer structures. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **63**, 31–65.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. (1996).** The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu.EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* **379**, 511–518.

- Kleijn, R. J., Buescher, J. M., Le Chat, L., Jules, M., Aymerich, S. & Sauer, U. (2010).** Metabolic fluxes during strong carbon catabolite repression by malate in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **285**, 1587–1596.
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessières, P. & Bolotin, A. & other authors (1997).** The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**, 249–256.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.
- Las Rivas, J. de & Fontanillo, C. (2010).** Protein-protein interactions essentials: key concepts to building and analyzing interactome networks. *PLoS Comput Biol* **6**, e1000807.
- Lee, H., DeLoache, W. C. & Dueber, J. E. (2012).** Spatial organization of enzymes for metabolic engineering. *Metab Eng* **14**, 242–251.
- Lenartowicz, E. (1990).** A complex effect of arsenite on the formation of alpha-ketoglutarate in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **283**, 388–396.
- Lyubarev, A. E. & Kurganov, B. I. (1989).** Supramolecular organization of tricarboxylic acid cycle enzymes. *BioSystems* **22**, 91–102.
- Mager, J., Goldblum-Sinai, J. & Blank, I. (1955).** Effect of fluoroacetic acid and allied fluoroanalogues on growth of *Escherichia coli*. I. Pattern of inhibition. *J Bacteriol* **70**, 320–325.
- Martinez-Morales, F., Borges, A. C., Martinez, A., Shanmugam, K. T. & Ingram, L. O. (1999).** Chromosomal integration of heterologous DNA in *Escherichia coli* with precise removal of markers and replicons used during construction. *J Bacteriol* **181**, 7143–7148.
- Matsuno, K., Blais, T., Serio, A. W., Conway, T., Henkin, T. M. & Sonenshein, A. L. (1999).** Metabolic imbalance and sporulation in an isocitrate dehydrogenase mutant of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **181**, 3382–3391.
- Merzbacher, M., Detsch, C., Hillen, W. & Stülke, J. (2004).** *Mycoplasma pneumoniae* HPr kinase/phosphorylase. *Eur J Biochem* **271**, 367–374.

- Meyer, F. M., Gerwig, J., Hammer, E., Herzberg, C., Commichau, F. M., Völker, U. & Stülke, J. (2011).** Physical interactions between tricarboxylic acid cycle enzymes in *Bacillus subtilis*: evidence for a metabolon. *Metab Eng* **13**, 18–27.
- Meynial Salles, I., Forchhammer, N., Croux, C., Girbal, L. & Soucaille, P. (2007).** Evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* metabolic pathway in *Escherichia coli*. *Metab Eng* **9**, 152–159.
- Milani, M., Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A. & Ascenzi, P. (2003).** Substrate channeling. Molecular bases. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **31**, 228–233.
- Minárik, P., Tomásková, N., Kollárová, M. & Antalík, M. (2002).** Malate dehydrogenases - structure and function. *Gen Physiol Biophys* **21**, 257–265.
- Mitchell, C. G. (1996).** Identification of a multienzyme complex of the tricarboxylic acid cycle enzymes containing citrate synthase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **313 (Pt 3)**, 769–774.
- Moreno-Hagelsieb, G. & Collado-Vides, J. (2002).** A powerful non-homology method for the prediction of operons in prokaryotes. *Bioinformatics* **18 Suppl 1**, S329-36.
- Morgunov, I. & Srere, P. A. (1998).** Interaction between citrate synthase and malate dehydrogenase. Substrate channeling of oxaloacetate. *J Biol Chem* **273**, 29540–29544.
- Nagai, M., Yoshida, A. & Sato, N. (1998).** Additive effects of bovine serum albumin, dithiothreitol, and glycerol on PCR. *Biochem Mol Biol Int* **44**, 157–163.
- Neidhardt, F. C., Bloch, P. L. & Smith, D. F. (1974).** Culture medium for enterobacteria. *J Bacteriol* **119**, 736–747.
- Nelson, D. L., Cox, M. M., Lehninger, A. L. & Häcker, B. (2009).** *Lehninger Biochemie. Mit 131 Tabellen*, 4th edn. Berlin: Springer.
- Ngo, H., Kimmich, N., Harris, R., Niks, D., Blumenstein, L., Kulik, V., Barends, T. R., Schlichting, I. & Dunn, M. F. (2007).** Allosteric regulation of substrate channeling in tryptophan synthase: modulation of the L-serine reaction in stage I of the beta-reaction by alpha-site ligands. *Biochemistry* **46**, 7740–7753.
- Norris, M. G. S. & Malys, N. (2011).** What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics

- of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem Biophys Res Commun* **405**, 388–392.
- Ovádi, J., Huang, Y. & Spivey, H. O. (1994).** Binding of malate dehydrogenase and NADH channelling to complex I. *J Mol Recognit* **7**, 265–272.
- Pál, C. & Hurst, L. D. (2004).** Evidence against the selfish operon theory. *Trends Genet* **20**, 232–234.
- Perkins, J. R., Diboun, I., Dessailly, B. H., Lees, J. G. & Orengo, C. (2010).** Transient protein-protein interactions: structural, functional, and network properties. *Structure* **18**, 1233–1243.
- Phillip, Y. & Schreiber, G. (2013).** Formation of protein complexes in crowded environments--from in vitro to in vivo. *FEBS Lett* **587**, 1046–1052.
- Phizicky, E. M. & Fields, S. (1995).** Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol Rev* **59**, 94–123.
- Poggi, C. G. & Slade, K. M. (2015).** Macromolecular crowding and the steady-state kinetics of malate dehydrogenase. *Biochemistry* **54**, 260–267.
- Potter, V. R. & Dubois, K. P. (1943).** Studies on the mechanism of hydrogen transport in animal tissues. VI. Inhibitor studies with succinic dehydrogenase. *J Gen Physiol* **26**, 391–404.
- Price, M. N., Arkin, A. P. & Alm, E. J. (2006).** The life-cycle of operons. *PLoS Genet* **2**, e96.
- Price, M. N., Huang, K. H., Arkin, A. P. & Alm, E. J. (2005).** Operon formation is driven by co-regulation and not by horizontal gene transfer. *Genome Res* **15**, 809–819.
- Ratner, D. (1974).** The interaction of bacterial and phage proteins with immobilized *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol* **88**, 373–383.
- Remington, J. S. (1992).** Mechanisms of citrate synthase and related enzymes (triose phosphate isomerase and mandelate racemase). *Curr Opin Struct Biol* **2**, 730–735.
- Robinson, J. B. & Srere, P. A. (1985).** Organization of Krebs tricarboxylic acid cycle enzymes in mitochondria. *J Biol Chem* **260**, 10800–10805.

- Rocha, E. P. C. (2008).** The organization of the bacterial genome. *Annu Rev Genet* **42**, 211–233.
- Rudolph, J. & Stubbe, J. (1995).** Investigation of the mechanism of phosphoribosylamine transfer from glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase to glycinamide ribonucleotide synthetase. *Biochemistry* **34**, 2241–2250.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (2001).** *Molecular cloning*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samiotakis, A., Wittung-Stafshede, P. & Cheung, M. S. (2009).** Folding, stability and shape of proteins in crowded environments: experimental and computational approaches. *Int J Mol Sci* **10**, 572–588.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. & Mann, M. (2006).** In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc* **1**, 2856–2860.
- Shieh, Y.-W., Minguéz, P., Bork, P., Auburger, J. J., Guilbride, D. L., Kramer, G. & Bukau, B. (2015).** Operon structure and cotranslational subunit association direct protein assembly in bacteria. *Science* **350**, 678–680.
- Singh, S. K., Matsuno, K., LaPorte, D. C. & Banaszak, L. J. (2001).** Crystal structure of *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase at 1.55 Å. Insights into the nature of substrate specificity exhibited by *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *J Biol Chem* **276**, 26154–26163.
- Singh, S. K., Miller, S. P., Dean, A., Banaszak, L. J. & LaPorte, D. C. (2002).** *Bacillus subtilis* isocitrate dehydrogenase. A substrate analogue for *Escherichia coli* isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase. *J Biol Chem* **277**, 7567–7573.
- Smith, K., Sundaram, T. K., Kernick, M. & Wilkinson, A. E. (1982).** Purification of bacterial malate dehydrogenases by selective elution from a triazinyl dye affinity column. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **708**, 17–25.
- Spitzer, J. & Poolman, B. (2013).** How crowded is the prokaryotic cytoplasm? *FEBS Lett* **587**, 2094–2098.
- Spivey, H. O. & Ovádi, J. (1999).** Substrate channeling. *Methods* **19**, 306–321.
- Srere, P. A. (1985).** The metabolon. *Trends Biochem Sci* **10**, 109–110.

- Srere, P. A., Brazil, H., Gonen, L. & Takahashi, M. (1963).** The Citrate Condensing Enzyme of Pigeon Breast Muscle and Moth Flight Muscle. *Acta Chem. Scand.* **17** supl, 129–134.
- Srivastava, D. K. & Bernhard, S. A. (1986).** Metabolite transfer via enzyme-enzyme complexes. *Science* **234**, 1081–1086.
- Sutherland, B. W., Toews, J. & Kast, J. (2008).** Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* **43**, 699–715.
- Swain, P. S. (2004).** Efficient attenuation of stochasticity in gene expression through post-transcriptional control. *J Mol Biol* **344**, 965–976.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350–4354.
- Tung, W. L. & Chow, K. C. (1995).** A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**, 128–129.
- Vasilescu, J., Guo, X. & Kast, J. (2004).** Identification of protein-protein interactions using in vivo cross-linking and mass spectrometry. *Proteomics* **4**, 3845–3854.
- Voet, D. J., Voet, J. G., Pratt, C. W., Beck-Sickinger, A. G., Hahn, U. & Häcker, B., eds. (2010).** *Lehrbuch der Biochemie*, 2nd edn. Weinheim: Wiley-VCH-Verl.
- Walsh, K. & Koshland, D. E. (1985).** Characterization of rate-controlling steps in vivo by use of an adjustable expression vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 3577–3581.
- Walsh, K., Schena, M., Flint, A. J. & Koshland, D. E. (1987).** Compensatory regulation in metabolic pathways--responses to increases and decreases in citrate synthase levels. *Biochem Soc Symp* **54**, 183–195.
- Werther, M. & Seitz, H. (2008).** *Protein – Protein Interaction*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Williamson, M. P. & Sutcliffe, M. J. (2010).** Protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* **38**, 875–878.
- Wolf, Y. I., Rogozin, I. B., Kondrashov, A. S. & Koonin, E. V. (2001).** Genome alignment, evolution of prokaryotic genome organization, and prediction of gene function using genomic context. *Genome Res* **11**, 356–372.

-
- Yoshida, A. (1965).** Enzymic properties of malate dehydrogenase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **240**, 1118–1124.
- Zhang, Y.-H. P. (2011).** Substrate channeling and enzyme complexes for biotechnological applications. *Biotechnol Adv* **29**, 715–725.
- Zimmerman, S. B. & Minton, A. P. (1993).** Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**, 27–65.
- Zimmerman, S. B. & Trach, S. O. (1991).** Estimation of macromolecule concentrations and excluded volume effects for the cytoplasm of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **222**, 599–620.

7 Anhang

Nukleotid-Sequenz des artifiziellen *gltA-icd-mdh*-Operons in *E. coli*:

Funktion	Ort [bp]
<i>gltAP1</i> -35 Signal	33..38
<i>gltAP2</i> -10 Signal	57..62
<i>gltAP1</i> 5'-UTR	66..364
<i>gltAP2</i> 5'-UTR	163..364
Spot 42 kleine regulatorische RNA	234..243
<i>gltA</i> Gen	365..1645
Gly-Ala Linker	1646..1651
Strep-Tag II	1652..1675
Gly-Ala Linker	1676..1681
<i>icd</i> 5'-UTR	1694..1713
<i>icd</i> Gen	1714..2964
<i>mdh</i> 5'-UTR	2965..2982
<i>mdh</i> Gen	2983..3921
Rho-unabhängiger Terminator	3941..3970

```

1   GCGCGGCGCG CCCAACAAAG TTGTTACAAA CATTACCAGG AAAAGCATAT AATGCGTAAA
61  AGTTATGAAAG TCGGTATTTT ACCTAAGATT AACTTATGTA ACAGTGTGGA AGTATTGACC
121 AATTCATTCG  GGACAGTTAT TAGTGGTAGA CAAGTTTAAT AATTCGGATT GCTAAGTACT
181 TGATTCGCCA  TTTATTCGTC ATCAATGGAT CCTTTACCTG CAAGCGCCCA GAGCTCTGTA
241 CCCAGGTTTT  CCCCTCTTTC ACAGAGCGGC GAGCCAAATA AAAAACGGGT AAAGCCAGGT
301 TGATGTGCGA  AGGCAAATTT AAGTTCCGGC AGTCTTACGC AATAAGGCGC TAAGGAGACC
361 TTAAatgGCT  GATACAAAAG CAAAACCTCAC CCTCAACGGG GATACAGCTG TTGAACTGGA
421 TGTGCTGAAA  GGCACGCTGG GTCAAGATGT TATTGATATC CGTACTCTCG GTTCAAAGG
481 TGTGTTCAAC  TTTGACCCAG GCTTCACTTC AACC GCATCC TGCGAATCTA AAATTACTTT
541 TATTGATGGT  GATGAAGGTA TTTTGCTGCA CCGCGGTTTC CCGATCGATC AGCTGGCGAC
601 CGATTCTAAC  TACCTGGAAG TTTGTTACAT CCTGCTGAAT GGTGAAAAAC CGACTCAGGA
661 ACAGTATGAC  GAATTTAAAA CTACGGTGAC CCGTCATACC ATGATCCACG AGCAGATTAC
721 CCGTCTGTTC  CATGCTTTCC GTCGCGACTC GCATCCAATG GCAGTCATGT GTGGTATTAC
781 CGGCGCGCTG  GCGGCGTTCT ATCACGACTC GCTGGATGTT AACAATCCTC GTCACCGTGA
841 AATTGCCGCG  TTCCGCCTGC TGTCGAAAAT GCCGACCATG GCCGCGATGT GTTACAAGTA
901 TTCCATTGGT  CAGCCATTTG TTTACCCGCG CAACGATCTC TCCTACGCCG GTAACCTCCT
961 GAATATGATG  TTCTCCACGC CGTGCGAACC GTATGAAGTT AATCCGATTC TGGAACGTGC
1021 TATGGACCGT  ATTCTGATCC TGCACGCTGA CCATGAACAG AACGCCTCTA CCTCCACCGT

```

1081 GCGTACCGCT GGCTCTTCGG GTGCGAACCC GTTTGCCTGT ATCGCAGCAG GTATTGCTTC
 1141 ACTGTGGGGA CCTGCGCACG GCGGTGCTAA CGAAGCGGCG CTGAAAATGC TGGAAGAAAT
 1201 CAGCTCCGTT AAACACATTC CGGAATTTGT TCGTCGTGCG AAAGACAAAA ATGATTCTTT
 1261 CCGCTGATG GGCTTCGGTC ACCGCGTGTA CAAAAATTAC GACCCGCGCG CCACCGTAAT
 1321 GCGTGAAACC TGCCATGAAG TGCTGAAAGA GCTGGGCACG AAGGATGACC TGCTGGAAGT
 1381 GGCTATGGAG CTGGAAAACA TCGCGCTGAA CGACCCGTAC TTTATCGAGA AGAAACTGTA
 1441 CCCGAACGTC GATTTCTACT CTGGTATCAT CCTGAAAGCG ATGGGTATTC CGTCTTCCAT
 1501 GTTACCGTC ATTTTCGCAA TGGCACGTAC CGTTGGCTGG ATCGCCACT GGAGCGAAAT
 1561 GCACAGTGAC GGTATGAAGA TTGCCCGTCC GCGTCAGCTG TATACAGGAT ATGAAAAACG
 1621 CGACTTTAAA AGCGATATCA AGCGTGGCGC **CTGGAGCCAC CCGCAGTTCG AAAAA**GGCGC
 1681 CTAAGAATTC GTAAGCGCTC GAAGGAGAGG TGAatgGAAA GTAAAGTAGT TGTTCCGGCA
 1741 CAAGGCAAGA AGATCACCCCT GCAAAACGGC AAACCAACG TTCTGAAAA TCCGATTATC
 1801 CCTTACATTG AAGGTGATGG AATCGGTGTA GATGTAACCC CAGCCATGCT GAAAGTGGTC
 1861 GACGCTGCAG TCGAGAAAGC CTATAAAGGC GAGCGTAAAA TCTCCTGGAT GGAAATTTAC
 1921 ACCGGTGAAA AATCCACACA GGTTTATGGT CAGGACGTCT GGCTGCCTGC TGAAACTCTT
 1981 GATCTGATTC GTGAATATCG CGTTGCCATT AAAGGTCCGC TGACCACTCC GGTTGGTGGC
 2041 GGTATTCGCT CTCTGAACGT TGCCCTGCGC CAGGAACTGG ATCTCTACAT CTGCCTGCGT
 2101 CCGGTACGTT ACTATCAGGG CACTCCAAGC CCGGTTAAAC ACCCTGAACT GACCGATATG
 2161 GTTATCTTCC GTGAAAACCT GGAAGACATT TATGCGGGTA TCGAATGGAA AGCAGACTCT
 2221 GCCGACGCCG AGAAAAGTGAT TAAATTCCTG CGTGAAGAGA TGGGGGTGAA GAAAATTCGC
 2281 TTCCCGGAAC ATTTGTGGTAT CGGTATTAAG CCGTGTTCGG AAGAAGGCAC CAAACGTCTG
 2341 GTTCGTGCAG CGATCGAATA CGCAATTGCT AACGATCGTG ACTCTGTGAC TCTGGTGCAC
 2401 AAAGGCAACA TCATGAAGTT CACCGAAGGA GCGTTTAAAG ACTGGGGCTA CCAGCTGGCG
 2461 CGTGAAGAGT TTGGCGGTGA ACTGATCGAC GGTGGCCCGT GGCTGAAAGT TAAAAACCCG
 2521 AACACTGGCA AAGAGATCGT CATTAAAGAC GTGATTGCTG ATGCATTCCCT GCAACAGATC
 2581 CTGCTGCGTC CGGCTGAATA TGATGTTATC GCCTGTATGA ACCTGAACGG TGACTACATT
 2641 TCTGACGCC TGGCAGCGCA GGTTGGCGGT ATCGGTATCG CCCCTGGTGC AAACATCGGT
 2701 GACGAATGCG CCCTGTTTGA AGCCACCAC GGTACTGCGC CGAAATATGC CGGTCAGGAC
 2761 AAAGTAAATC CTGGCTCTAT TATTCTCTCC GCTGAGATGA TGCTGCGCCA CATGGGTTGG
 2821 ACCGAAGCGG CTGACTTAAT TGTTAAAGGT ATGGAAGGCG CAATCAACGC GAAAACCGTA
 2881 ACCTATGACT TCGAGCGTCT GATGGATGGC GCTAAACTGC TGAAATGTTT AGAGTTTGGT
 2941 GACGCGATCA TCGAAAACAT GtaaTATAAT AAGGAGTTTA GGatgAAAGT CGCAGTCCTC
 3001 GGCCTGCTG GCGGTATTGG CCAGGCGCTT GCACTACTGT TAAAAACCCA ACTGCCTTCA
 3061 GGTCAGAAC TCTCTCTGTA TGATATCGCT CCAGTACTC CCGGTGTGGC TGTCGATCTG
 3121 AGCCATATCC CTA CTGCTGT GAAAATCAAA GGTTTTTCTG GTGAAGATGC GACTCCGGCG
 3181 CTGGAAGGCG CAGATGTCGT TCTTATCTCT GCAGGCGTAG CGCGTAAACC GGGTATGGAT
 3241 CGTTCCGACC TGTTTAAACGT TAACGCCGGC ATCGTGAAAA ACCTGGTACA GCAAGTTGCG
 3301 AAAACCTGCC CGAAAGCGTG CATTGGTATT ATCACTAACC CGGTTAACAC CACAGTTGCA
 3361 ATTGCTGCTG AAGTGCTGAA AAAAGCCGGT GTTTATGACA AAAACAACT GTTCGGCGTT
 3421 ACCACGCTGG ATATCATTCG TTCCAACACC TTTGTTGCGG AACTGAAAGG CAAACAGCCA
 3481 GGCGAAGTTG AAGTGCCGGT TATTGGCGGT CACTCTGGTG TTACCATTCT GCCGCTGCTG
 3541 TCACAGGTTT CTGGCGTTAG TTTTACCGAG CAGGAAGTGG CTGATCTGAC CAAACGCATC

3601 CAGAACGCGG GTACTGAAGT GGTGAAGCG AAGCCGGTG GCGGGTCTGC AACCTGTCT
3661 ATGGGCCAGG CAGCTGCACG TTTGGTCTG TCTCTGGTTC GTGCACTGCA GGGCGAACAA
3721 GCGTTGTCG AATGTGCCTA CGTTGAAGGC GACGGTCAGT ACGCCCGTTT CTTCTCTCAA
3781 CCGCTGCTGC TGGGTAAAAA CGGCGTGGAA GAGCGTAAAT CTATCGGTAC CCTGAGCGCA
3841 TTTGAACAGA ACGCGCTGGA AGGTATGCTG GATACGCTGA AGAAAGATAT CGCCCTGGGC
3901 GAAGAGTTCG TTAATAAGta aTTGATTAGC GGATAATAAA AAACCGGAGC ACAGACTCCG
3961 GTTTTTTGT TTAGCGCAC GACTTAATTG GTTGCCGGAT ATTCCTGAAT GGTGACCTGC
4021 AGCGTTAACG GCGCGCCCGC C

//

8 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Ermöglichung meiner Promotion und die Betreuung der Doktorarbeit sowie Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Überlassung des Themas, die Betreuung an der Hochschule Mannheim und die Übernahme des Korreferats.

Ich danke außerdem Herrn Prof. Dr. Hans-Lothar Fuchsbauer von der Hochschule Darmstadt für die Möglichkeit, die ITC-Versuche in seinem Labor durchführen zu können.

Ein ganz herzlicher Dank gilt allen Mitarbeitern und Doktoranden der Institute für Technische Mikrobiologie und Biochemie der Hochschule Mannheim für die fachliche Unterstützung und die schöne gemeinsame Zeit.

Ich danke dem BMBF für die finanzielle Förderung im Rahmen des NANOKAT-Promotionskollegs sowie der Albert-und-Anneliese-Konanz-Stiftung für die Gewährung eines Promotionstipendiums.

Meiner Familie und meinen Freunden gilt mein besonderer Dank, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

