

Diss. ETH No. 24158

**BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL ANALYSIS OF THE  
PYRUVATE DEHYDROGENASE COMPLEX  
FROM *THERMUS THERMOPHILUS***

A thesis submitted to attain the degree of  
DOCTOR of SCIENCES of ETH ZURICH  
(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

**LENA MARIA BOLTEN**

M.Sc. Chemical Biology, TU Dortmund

born on 21.11.1985

citizen of

Germany

accepted on the recommendation of  
Prof. Dr. Rudi Glockshuber, examiner  
Prof. Dr. Nenad Ban, co-examiner  
Prof. Dr. Julia Vorholt, co-examiner

2017

# Abstract

Multi-enzyme-complexes are playing a crucial role in the energy metabolism of cells, catalyzing important key points of metabolic pathways. One protein superfamily of these multi-enzyme-complexes are the 2-oxoacid dehydrogenase complexes. A prominent member of this superfamily is the pyruvate dehydrogenase (PDH) complex, which is catalyzing the irreversible oxidative decarboxylation of pyruvate to acetyl-coenzyme A. This reaction is carried out by the three different enzymes within the PDH the complex: pyruvate dehydrogenase (E1), dihydrolipoyl acetyltransferase (E2) and dihydrolipoyl dehydrogenase (E3). The PDH complex is composed of multiple copies of these three enzymes consisting of a central E2 core. This core is either composed of 24 E2 subunits forming a cubic architecture with octahedral symmetry, or 60 E2 subunits forming a dodecahedral core with icosahedral symmetry, depending on the respective organism. The E1 and E3 subunits assemble around the inner core and form a second shell around it.

In this study, the PDH complex from *Thermus thermophilus*, which has the icosahedral E2 core symmetry, was functionally reconstituted from purified subunits E1-E3 *in vitro*. First, the recombinant production in *Escherichia coli* and purification of the isolated subunits of the PDH complex was established: The E1 homodimer with bound cofactor TPP, the E2 60-mer uniformly modified with the cofactor lipoic acid, and the E3 homodimer with bound cofactor FAD. Then, subunit assembly was analyzed regarding the stoichiometry of subunit binding to the E2 core. For the two subcomplexes E1E2 and E2E3 the stoichiometry was determined to molar ratios of 1:1 and 1:0.6, respectively. The E1:E2 ratio of 1:1 agrees with the reported, maximum number of E1 subunits in related PDH complexes. The E2:E3 ratio of 0.6 was higher than the predicted value of 0.4, which can be explained by a partial occupancy of E1 sites by E3 subunits in the absence of E1.

Next, a comprehensive kinetic analysis of the catalytic properties of the complete, reconstituted and purified PDH complex was performed at 37 °C. The analysis showed that the three substrates pyruvate, NAD<sup>+</sup> and CoA bind non-cooperatively to the

respective active sites under conditions where only one substrate concentration was varied at saturation with the other two substrates. Michaelis-Menten constants ( $K_M$ ) for all substrates were found to be in the micromolar range:  $220 \pm 10 \mu\text{M}$  for pyruvate,  $100 \pm 15 \mu\text{M}$  for  $\text{NAD}^+$  and  $6.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$  for CoA. The turnover number ( $k_{\text{cat}}$ ) of the PDH complex at saturating conditions for all three substrates has a value of  $1390 \pm 20 \text{s}^{-1}$ , demonstrating efficient shuffling of catalytic intermediates between subunits catalyzing the consecutive reaction steps in the catalytic cycle of the PDH complex. Under non-saturating conditions for pyruvate and CoA, pyruvate and  $\text{NAD}^+$  or all three substrates, a steeper dependence of substrate turnover on substrate concentration relative to the simplest Michaelis-Menten model was observed. This indicates that the PDH complex may either adopt different conformations as a function of substrate saturation, or that neighborhood effects between subunits in the supramolecular assembly of the PDH complex contribute to this observation.

In the last part of this thesis, the PDH complex was structurally characterized by electron microscopy (EM). An initial 3D model of the E2 core with a resolution of  $25 \text{\AA}$  was determined with negative stain electron microscopy, confirming its icosahedral architecture. Attempts to obtain stable preparations of the entire PDH complex for high-resolution structural analysis with cryo-EM initially failed because the complex decomposed during plunge freezing. This problem could be solved by chemical crosslinking of the subunits with glutaraldehyde prior to the preparation of cryo-EM grids, so that intact PDH complexes could be recorded and evaluated by single particle analysis. The electron density around the E2 core, formed by the E1 and E3 subunits, was however still too heterogeneous to obtain high-resolution structural data. Nevertheless, the obtained results represent a good foundation for further improvement of sample preparation towards the goal of determining the first three-dimensional structure of a PDH complex at atomic resolution.

# Zusammenfassung

Multi-Enzym-Komplexe spielen eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zellen. Sie katalysieren zentrale Reaktionen im Zellmetabolismus zur Energiegewinnung. Eine bekannte Proteinfamilie sind die Oxocarbonsäure-Dehydrogenasen, zu denen auch der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex gehört.

Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex katalysiert die irreversible oxidative Decarboxylierung von Pyruvat verbunden mit der Synthese von Acetyl-Coenzym A. Diese komplexe Reaktion wird ausgeführt von drei unterschiedlichen, zusammenarbeitenden Enzymen: der Pyruvat-Dehydrogenase (E1), der Dihydrolipoyl-Acetyltransferase (E2) und der Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (E3). Der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex besteht aus mehreren Kopien dieser Enzyme, wobei ein innerer Kern die zentrale Struktur des Enzymkomplexes bildet. Dieser Kern besteht aus E2 Untereinheiten, die in Gram-negativen Bakterien einen hohlen Würfel aus 24 Monomeren bilden oder in Gram-positiven Bakterien einen hohlen Dodekaeder aus 60 E2 Untereinheiten. Die Untereinheiten E1 und E3 interagieren mit dem Kern und bilden eine zweite Hülle um den Kernkomplex herum.

In dieser Arbeit wurde der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex vom Organismus *Thermus thermophilus* analysiert, welcher einen Kernkomplex aus 60 E2 Untereinheiten mit ikosaedrischer Symmetrie besitzt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die unterschiedlichen Untereinheiten des Enzymkomplexes in *Escherichia coli* synthetisiert und Reinigungsprotokolle für die einzelnen Untereinheiten etabliert: Der E1 Homodimer mit gebundenem Co-Faktor TPP, der E2 60-mer vollständig post-translational modifiziert mit Liponsäure und der E3 Homodimer mit gebundenem Co-Faktor FAD.

Anschließend wurde der Komplex *in vitro* assembliert und analysiert in Bezug auf die Komplexstöchiometrie. Für die Subkomplexe E1E2 und E2E3 wurden die Komplexstöchiometrien mit einem molaren Verhältnis von 1:1 bzw. 1:0.6 bestimmt. Die E1:E2 Stöchiometrie stimmt überein mit der beschriebenen maximalen Besetzung für den PDH Komplex. Das molare Verhältnis von E2:E3 war mit 1:0.6 höher als erwartet und Grund für dieses Verhältnis kann durch die Abwesenheit von E1 Untereinheiten

erklärt werden. Die E3 Untereinheit kann einige Bindungsstellen der E1 Untereinheit besetzt haben. Desweiteren wurde der Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex umfassend auf seine katalytischen Eigenschaften hin untersucht. Diese Analyse zeigte, dass alle drei Substrate Pyruvat,  $\text{NAD}^+$  und Coenzym A des Enzymkomplexes unabhängig an ihre aktiven Zentren binden. Die Michaelis-Menten Konstanten lagen für alle drei Substrate im mikromolaren Bereich mit  $220 \pm 10 \mu\text{M}$  für Pyruvat,  $100 \pm 15 \mu\text{M}$  für  $\text{NAD}^+$  und  $6.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$  für Coenzym A. Die Wechselzahl ( $k_{\text{cat}}$ ) des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes von *T. thermophilus* beträgt unter sättigenden Bedingungen für alle drei Substrate  $1390 \pm 20 \text{s}^{-1}$ . Dies demonstriert die effiziente Übergabe der katalytischen Intermediate zwischen den aktiven Zentren der einzelnen Untereinheiten im Multi-Enzym-Komplex. Unter nicht-saturierten Bedingungen wurde für die Substrate Pyruvat und Coenzym A, Pyruvat und  $\text{NAD}^+$  oder für alle drei Substrate eine höhere Abhängigkeit des Substratumsatzes bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen relativ zum einfachsten Michaelis-Menten Model beobachtet.

Dies könnte entweder auf verschiedene Konformationszustände bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen hindeuten oder Nachbarschaftseffekte zwischen den einzelnen Untereinheiten im supramolekularen Komplex könnten zu dieser Beobachtung beitragen.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde der *in vitro* assemblierte Enzymkomplex strukturell mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Zuerst wurde der Kernkomplex aus E2 Untereinheiten mittels Negativkontrastierung analysiert und eine 3D Rekonstruktion bei einer Auflösung von  $25 \text{Å}$  berechnet, welche die ikosahedrische Symmetrie des E2 Kernkomplexes zeigt. Erste Versuche eine stabile Komplexpreparation des vollständigen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes für die Analyse mittels *single particle* Kryoelektronenmikroskopie herzustellen schlugen fehl. Der Multi-Enzym-Komplex zerfiel beim schnellen Einfrieren (*plunge freezing*). Dieses Problem wurde mittels chemischer Quervernetzung durch Glutaraldehyd der einzelnen Untereinheiten behoben. Einzelne Partikel des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes konnten aufgenommen und analysiert werden. Die Elektronendichte um den E2 Kernkomplex, die durch die E1 und E3 Untereinheiten geformt wird, war jedoch zu heterogen um eine hoch aufgelöste Komplexstruktur zu berechnen. Dennoch legt diese Arbeit eine wichtige Grundlage für weitere Optimierungen in Bezug auf eine stabile Komplexpreparation mit dem Ziel die erste hochauflösende dreidimensionale Struktur des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes zu lösen.