

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>6</b>
1.	Bakterienstämme und Plasmide	6
2.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Nährmedien	11
2.3	Kultivierung der Bakterien	12
2.4	Fermentation von <i>C. glutamicum</i> zur Aminosäurebildung mit der „SIXFORS-Vario“-Anlage	13
2.5	Stammhaltung	14
2.6	Bestimmung des Bakterienwachstums	15
3.	Molekulargenetische Methoden	15
3.1	Isolierung von DNA	15
3.2	Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA	15
3.3	Transformation von <i>E. coli</i> und <i>C. glutamicum</i>	16
3.4	Polymerasekettenreaktion	18
3.4.1	<i>In vitro</i> -Amplifizierung von DNA	18
3.4.2	Generierung von DNA-Abschnitten mit zufälligen Fehlern	19
3.5	Ortsgerichtete Mutagenese	19
3.6	Konstruktion von Deletions- und Integrationsmutanten von <i>C. glutamicum</i>	21
3.7	DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse	22
4.	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	22
5.	Biochemische Methoden	24
5.1	Herstellung von zellfreien Rohextrakten von <i>C. glutamicum</i>	24
5.2	Überexpression heterologer Proteine in <i>E. coli</i> und native Affinitätsaufreinigung	24
5.2.1	Genexpression und Proteinaufreinigung mit dem Strep-Tag II <sup>®</sup> -System	25
5.2.2	Genexpression und Proteinaufreinigung mit dem pET-System	26
5.3	Abspaltung des N-terminalen His-Tags	28
5.4	Proteinanalyse	29
5.5	Proteinbestimmung	29
5.6	Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS Analyse	30
5.7	Bestimmung der Substratspezifität und Aktivität der Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i>	30
5.8	Enzymtest zur Bestimmung von Cystein-Desulfurase-Aktivitäten	32
5.9	Bestimmung spezifischer Aktivitäten	32

<b>6. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen</b>	<b>33</b>
6.1 Proteinkristallisation	33
6.2 Sammlung von Röntgenbeugungsmustern und Datenverarbeitung	35
6.3 Erstellen von Proteinstrukturmodellen	36
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>37</b>
<b>1. Identifizierung und Charakterisierung von Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i></b>	<b>37</b>
1.1 Charakterisierung der Transaminase <i>IlvE</i> für die Synthese verzweigt-kettiger Aminosäuren	37
1.2 Identifizierung der Alanin-Valin-Transaminase <i>AvtA</i>	43
1.3 Identifizierung der Transaminase <i>AroT</i> für die Synthese aromatischer Aminosäuren	47
1.4 Identifizierung der L-Alanin-Transaminase <i>AlaT</i> mit breitem Substratspektrum	49
1.5 Identifizierung der L-Histidinol-Phosphat-Transaminase <i>HisC</i>	52
1.6 Charakterisierung weiterer Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i>	55
1.6.1 Identifizierung der L-Asparaginsäure-Transaminase <i>AspC</i>	55
1.6.2 Charakterisierung an der L-Lysin-Synthese beteiligter Transaminasen	56
1.7 Cystein-Desulfurasen	57
1.8 Potentielle Transaminasen mit ungeklärter Aktivität	59
<b>2. Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der L-Histidinol-phosphat-Transaminase <i>HisC</i></b>	<b>60</b>
2.1 Heterologe Genexpression und Proteinpräparation für die Kristallisationsexperimente	60
2.2 Proteinkristallisation von <i>AroT</i> und <i>HisC</i>	64
2.3 Röntgenbeugung, Datenauswertung und Modellierung der Strukturmodelle	66
2.4 Strukturmodell für das <i>HisC</i> -Monomer und Dimer	71
2.5 Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Enzymaktivität	77
<b>3. Gerichtete Evolution von <i>AroT</i> zu erhöhter Aktivität für die Bildung von L-Leucin</b>	<b>83</b>
3.1 Entwicklung eines Selektionssystems für eine gerichtete Enzymevolution von <i>AroT</i> und <i>HisC</i>	83
3.2 Charakterisierung einer <i>AroT</i> -Variante mit erhöhter L-Leucinaktivität	87
<b>4. Verbesserung der mikrobiellen L-Valinproduktion mit <i>C. glutamicum</i></b>	<b>93</b>
4.1 Deletion von <i>avtA</i> und <i>alaT</i> in <i>VAL1</i> und Experimente zur Produktbildung	94
4.2 Kultivierung der <i>VAL1</i> -Stämme unter <i>batch</i> -Bedingungen	97

---

<b>IV. DISKUSSION</b>	<b>101</b>
1. Identifizierung und Charakterisierung der Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i>	101
2. Proteinstrukturmodell für die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus <i>Corynebacterium glutamicum</i>	106
3. Gerichtete Enzymevolution von AroT	108
4. Verbesserung der L-Valinbildung mit <i>C. glutamicum</i> durch Deletion der Gene für die Alanin-Transaminase ( <i>alaT</i> ) und die Transaminase C ( <i>avtA</i> )	110
<b>V. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>112</b>
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>113</b>
<b>VII. ANHANG</b>	<b>125</b>
1. Oligonukleotidsequenzen	125
2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	130