
INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODEN	6
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 [®] -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

6. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen	33
6.1 Proteinkristallisation	33
6.2 Sammlung von Röntgenbeugungsmustern und Datenverarbeitung	35
6.3 Erstellen von Proteinstrukturmodellen	36
III. ERGEBNISSE	37
1. Identifizierung und Charakterisierung von Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i>	37
1.1 Charakterisierung der Transaminase <i>IlvE</i> für die Synthese verzweigtkettiger 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
2. Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der L-Histidinol-phosphat-Transaminase <i>HisC</i>	60
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
3. Gerichtete Evolution von <i>AroT</i> zu erhöhter Aktivität für die Bildung von L-Leucin	83
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
4. Verbesserung der mikrobiellen L-Valinproduktion mit <i>C. glutamicum</i>	93
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

IV. DISKUSSION	101
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
V. ZUSAMMENFASSUNG	112
VI. LITERATURVERZEICHNIS	113
VII. ANHANG	125
1. Oligonukleotidsequenzen	125
2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide	130