

L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse

Kristina Hoffmann

Forschungszentrum Jülich GmbH
Institut für Bio-und Geowissenschaften (IBG)
Biotechnologie (IBG-1)

L-Cystein-Bildung mit *Corynebacterium glutamicum* und optische Sensoren zur zellulären Metabolitanalyse

Kristina Hoffmann

Schriften des Forschungszentrums Jülich
Reihe Gesundheit / Health

Band / Volume 69

ISSN 1866-1785

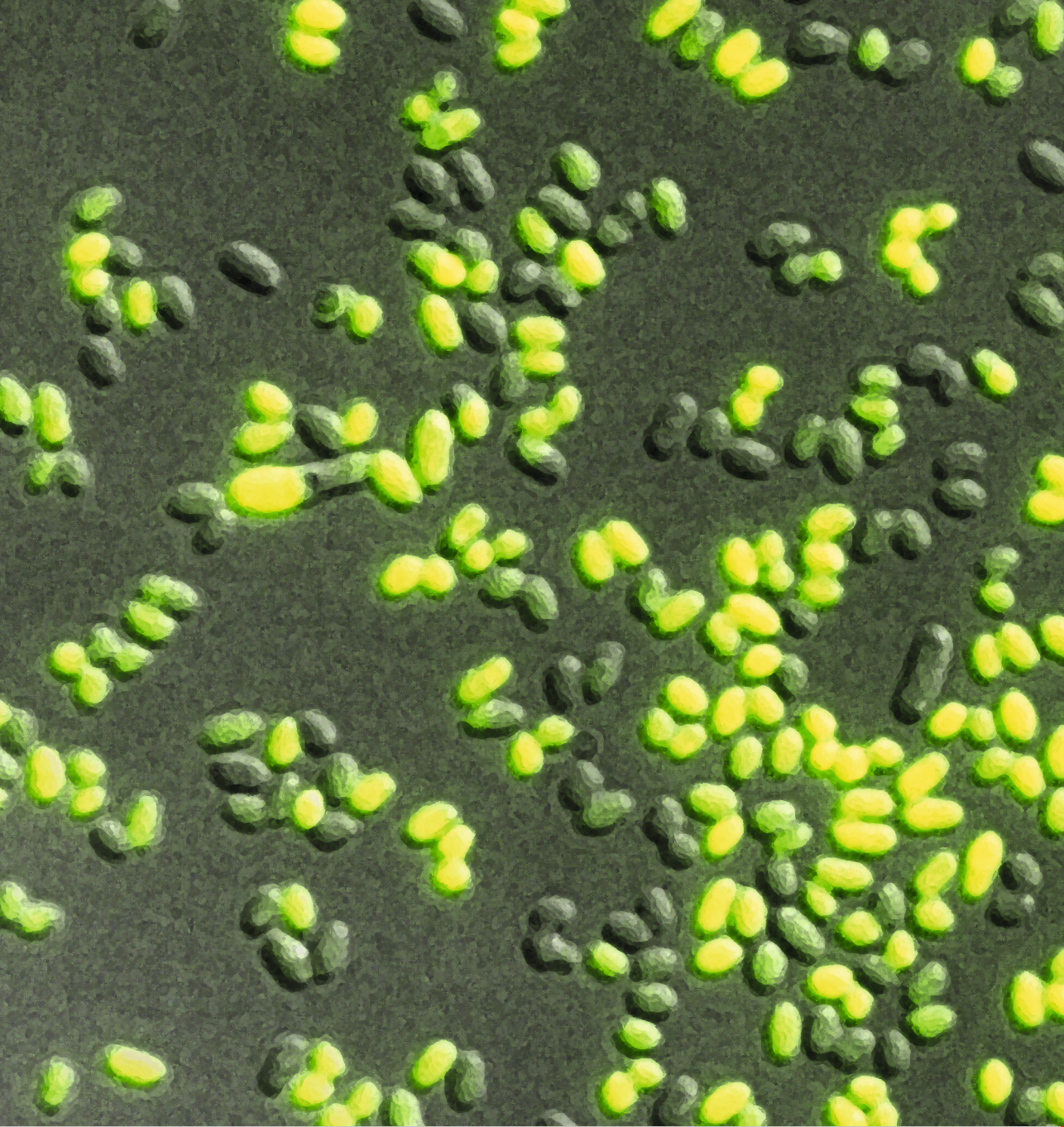
ISBN 978-3-89336-939-3

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	i
Abkürzungsverzeichnis	v
Zusammenfassung.....	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 <i>Corynebacterium glutamicum</i> und seine Bedeutung als Produzent	5
1.2 L-Cystein	6
1.2.1 Biosynthese von L-Cystein in <i>C. glutamicum</i>	6
1.2.2 Assimilatorische Reduktion von Schwefel	8
1.2.3 Transkriptionsregulation des Schwefel-Metabolismus	10
1.2.4 Industrielle Bedeutung und Herstellung von L-Cystein	11
1.3 Metabolitsensoren	12
1.4 Ziele der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.2 Bakterienstämme und Plasmide	15
2.3 Oligonukleotide	17
2.4 Kultivierungsbedingungen und Stammhaltung von Bakterien	21
2.4.1 Nährmedien	21
2.4.2 Kultivierung von <i>E. coli</i> -Stämmen.....	22
2.4.3 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> -Stämmen.....	22
2.4.4 Kultivierung von <i>C. glutamicum</i> im BioLector	22
2.4.5 Stammhaltung von Bakterien.....	23
2.4.6 Bestimmung des Wachstums von Bakterienkulturen	23
2.5 Molekularbiologische Methoden	23
2.5.1 Isolierung von DNA	23
2.5.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	24
2.5.3 Rekombinante DNA-Techniken	24
2.5.4 Transformationstechniken	24
2.5.5 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion	25
2.5.6 Konstruktion von Deletionsmutanten	26
2.5.7 DNA-Sequenzanalyse.....	27

2.6	Quantitative Bestimmung von Aminosäuren	27
2.6.1	Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren mittels HPLC-MS.....	27
2.6.2	Bestimmung intrazellulärer Aminosäurekonzentrationen.....	28
2.7	Biochemische Methoden	29
2.7.1	Zellaufschluss mit Ultraschall	29
2.7.2	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose	29
2.7.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	29
2.7.4	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	30
2.7.5	MALDI-TOF Massenspektrometrie	30
2.8	Spektroskopische Analysen.....	30
2.8.1	Epifluoreszenzmessung	30
2.8.2	Fluoreszenzmessungen	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Konstruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstammes	32
3.1.1	Chromosomale Integration des Gens für die feedbackresistente 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	32
3.1.2	Promotoraustausch der C-terminal verkürzten 3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase im Chromosom durch einen starken konstitutiven Promotor.....	34
3.2	Steigerung der L-Cystein-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	36
3.2.1	Wachstum in Anwesenheit von L-Cystein	36
3.2.2	Expression rekombinanter Serin-Acetyltransferasen	37
3.2.3	Expression von <i>cysE</i> und <i>cysK</i>	39
3.2.4	Deletion von <i>aecD</i>	40
3.2.5	Deletion von <i>metX</i>	41
3.2.6	Schwefel-Verfügbarkeit	43
3.3	Entwicklung eines Biosensors zur intrazellulären Detektion der Metabolite <i>O</i> -Acetyl-L-Serin und <i>O</i> -Acetyl-L-Homoserin in <i>C. glutamicum</i>	44
3.3.1	Konstruktion der Biosensor-Varianten.....	44
3.3.2	Untersuchungen zur OAS-abhängigen Fluoreszenz	45
3.3.3	Untersuchungen zur OAH-abhängigen Fluoreszenz.....	49
3.3.4	Fluoreszenz der Biosensoren unter Schwefel-Mangel.....	52
3.4	Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Bildung	53
3.4.1	Expression von <i>cysR</i> unter Kontrolle von P_{tac}	54
3.4.2	Expression von <i>cysR</i> unter Kontrolle des nativen Promotors	54

3.5	Sulfid-Sensor <i>E. coli</i>	56
4	Diskussion	59
4.1	Konstruktion eines plasmidfreien L-Serin-Produktionsstamms	59
4.2	L-Cystein-Bildung mit <i>C. glutamicum</i>	60
4.3	Entwicklung von Biosensoren zur intrazellulären Detektion der Metabolite <i>O</i> -Acetyl-L-Serin und <i>O</i> -Acetyl-L-Homoserin in <i>C. glutamicum</i>	64
4.4	Untersuchungen zum Einfluss des Regulators CysR auf die L-Cystein-Produktion	66
4.5	Sulfid-Sensor <i>E. coli</i>	68
4.6	Ausblick	68
	Literaturverzeichnis	70
	Danksagung	81



Gesundheit / Health
Band / Volume 69
ISBN 978-3-89336-939-3

