

**Struktur und Funktion
von Transaminasen aus
*Corynebacterium glutamicum***

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Jan Marienhagen

aus Engelskirchen

August 2007

Aus dem Institut für Biotechnologie 1 der
Forschungszentrum Jülich GmbH

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Univ. - Professor Dr. rer. nat. Hermann Sahn
Institut für Biotechnologie 1
Forschungszentrum Jülich GmbH

Koreferent: Univ. - Professor Dr. rer. nat. Karl-Erich Jäger
Institut für Molekulare Enzymtechnologie
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2007

Structure and function of transaminases of *Corynebacterium glutamicum*

In the pathways of most amino acids transaminases reversibly catalyze the transfer of an amino group from an α -amino acid to an α -oxo-acid. Such enzymes are characterized by great sequence homology, similar structures and overlapping substrate specificities. The main objective of this thesis was to gain detailed knowledge of the structure and function of transaminases of *Corynebacterium glutamicum* with an emphasis on the enzymes participating in the synthesis of the three branched chain amino acids.

Twenty proteins containing a transaminase motif were isolated and characterized concerning their substrate spectrum. The *in vivo* function was studied by chromosomal deletion mutants. Those experiments lead to the identification of the alanine transaminase AlaT and the aspartate transaminase AspC, which is important for lysine-synthesis. Two proteins could be assigned as cysteine desulfurases, which are involved in the assembly of FeS-clusters.

The transaminase IlvE for the synthesis of the three branched chain amino acids catalyzes the formation of L-leucine, L-isoleucine and L-valine with comparable specific activities of $9.6 - 13.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (protein)}^{-1}$. However, *in vivo* this enzyme is only essential for the L-leucine- and L-isoleucine-synthesis. The alanine-valine transaminase AvtA, which is strictly alanine-dependent, contributes also to the synthesis of the three branched chain amino acids and catalyzes the formation of valine with a high specific activity of $18.2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (protein)}^{-1}$. This activity alone ensures valine-synthesis in an *ilvE*-deletion mutant.

The transaminase AroT is involved in the formation of L-phenylalanine and L-tyrosine. Interestingly, this enzymes catalyzes the conversion of 2-oxo-iso-caproate to L-leucine with less than 10 % of the specific activity of L-phenylalanine-synthesis from phenylpyruvate, but is unable to transaminate the precursors of L-isoleucine or L-valine. Directed evolution generated an AroT-mutein with a M54L-mutation, which converts 2-oxo-iso-caproate to L-leucine with an almost doubled catalytic efficiency of $59 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$.

The histidinol-phosphate transaminase HisC was crystallized and a structure model up to a resolution of 1.8 Å was calculated. The model included 364 of 366 amino acids and gave information about the amino acid residues participating in the catalysis of this enzyme. The introduction of active-site mutations almost always resulted in a decreased activity of HisC, but a Y123F-mutation doubled the specific activity for the transamination of 4-hydroxy-phenylpyruvate to L-tyrosine (0.5 to $0.9 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (protein)}^{-1}$).

L-alanine accumulates during the microbial production of L-valine with *C. glutamicum*. Single deletion of the genes for the alanine-valine transaminase (*avtA*) and the alanine-transaminase (*alaT*) in the genome of a L-valine-production strain decreased the formation of this byproduct and increased the synthesis of L-valine. During a *batch*-fermentation the loss of AlaT-activity reduced the L-alanine concentration in the culture filtrate by 75 %.

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 IlvE für die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren	37
1.2	Identifizierung der Alanin-Valin-Transaminase AvtA	43
1.3	Identifizierung der Transaminase AroT für die Synthese aromatischer Aminosäuren	47
1.4	Identifizierung der L-Alanin-Transaminase AlaT mit breitem Substratspektrum	49
1.5	Identifizierung der L-Histidinol-Phosphat-Transaminase HisC	52
1.6	Charakterisierung weiterer Transaminasen aus <i>C. glutamicum</i>	55
1.6.1	Identifizierung der L-Asparaginsäure-Transaminase AspC	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 HisC	60
2.1	Heterologe Genexpression und Proteinpräparation für die Kristallisationsexperimente	60
2.2	Proteinkristallisation von AroT und HisC	64
2.3	Röntgenbeugung, Datenauswertung und Modellierung der Strukturmodelle	66
2.4	Strukturmodell für das HisC-Monomer und Dimer	71
2.5	Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Enzymaktivität	77
3.	Gerichtete Evolution von AroT zu erhöhter Aktivität für die Bildung von L-Leucin	83
3.1	Entwicklung eines Selektionssystems für eine gerichtete Enzymevolution von AroT und HisC	83
3.2	Charakterisierung einer AroT-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 VAL1 und Experimente zur Produktbildung	94
4.2	Kultivierung der VAL1-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

ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Å	Ångström
Amp ^R	Ampicillinresistenz
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BCA	Bicinchoninsäure (<i>bicinchoninic acid</i>)
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C	Cytosin
C- / N-Terminus	Carboxy- / Aminoterminus von Proteinen
Cam ^R	Chloramphenicolresistenz
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
F	Farad (Kapazität)
G	Guanin
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktosid
Kan ^R	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen (<i>kilo bases</i>)
<i>lac</i>	Lactose
LB	Luria Bertani
LDS	Lithiumdodecylsulfat
M	Molarität [mol/L]
MALDI-TOF-MS	<i>matrix assisted laser desorption ionisation- time-of-flight- mass spectrometry</i>
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure

nt	Nukleotide
OD _x	Optische Dichte gemessen bei x nm
ORF	offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
<i>ori</i>	Replikationsursprung (<i>origin of replication</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
PMP	Pyridoxamin-5'-Phosphat
SAP	Alkaline Phosphatase (<i>shrimp alkaline phosphatase</i>)
SDS	Natriumdodecylphosphat (<i>sodium dodecylphosphate</i>)
T	Thymin
TCEP	Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin-Hydrochlorid
<i>tet</i>	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	spezifische Enzymaktivität (<i>units</i>) [$\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) ⁻¹]
Upm	Umdrehung pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

I. EINLEITUNG

Transaminasen (Aminotransferasen) katalysieren die reversible Übertragung der Aminogruppe von α -Aminosäuren auf α -Ketosäuren, die so zu α -Aminosäuren umgewandelt werden (Abbildung 1).

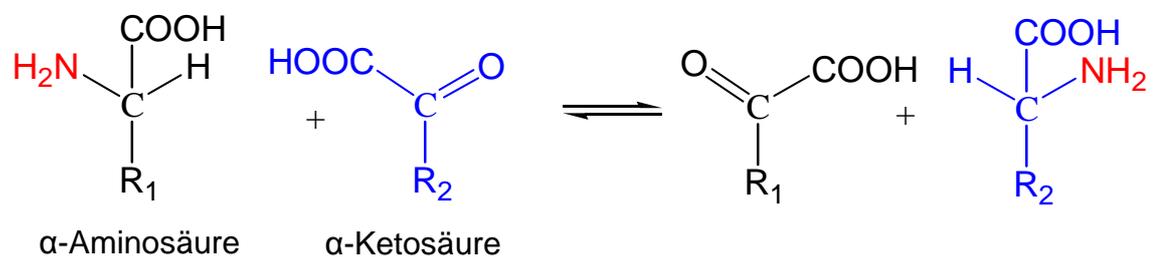


Abb. 1: Reversible Übertragung einer Aminogruppe auf eine α -Ketosäure durch Transaminasen

An dem molekular aufgeklärten Mechanismus dieser Reaktion ist das phosphorylierte Vitamin B₆-Derivat Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) als prosthetische Gruppe beteiligt (Christen und Metzler, 1985). Diese ist bei Transaminasen, wie bei allen PLP-abhängigen Enzymen, über eine Schiff-Base-Bindung an einen Lysinrest im aktiven Zentrum des Enzyms gebunden (Christen und Mehta, 2001). Erst die Anwesenheit des Apoproteins verleiht dem Holoenzym eine eigene Reaktions- und Substratspezifität (John, 1995).

Besondere Bedeutung kommt den Transaminasen von Mikroorganismen in der Biosynthese der zwanzig proteinogenen Aminosäuren zu (Herrmann *et al.*, 1983). Außerdem sind diese Enzyme für die Synthese von D-Glutaminsäure als Bestandteil der bakteriellen Peptidoglycanschicht von Bedeutung (Thorne *et al.*, 1955).

Zu den bedeutendsten Mikroorganismen bei der industriellen Aminosäureproduktion zählt das Eubacterium *Corynebacterium glutamicum* zusammen mit seinen Subspezies *flavum* und *lactofermentum* (Eggeling und Sahm, 1999; Kircher und Leuchtenberger, 1998; Liebl *et al.*, 1991). Mit *C. glutamicum* werden mehr als 1.800.000 Tonnen L-Glutaminsäure und 850.000 Tonnen L-Lysin pro Jahr hergestellt (Nakamura *et al.*, 2007; Leuchtenberger *et al.*, 2005). *C. glutamicum*, das 1957 in Japan aus einer Bodenprobe isoliert worden war (Kinoshita *et al.*, 1957), ist ein Gram-positives, unbewegliches, nicht sporenbildendes Biotin-auxotrophes Eubacterium aus der Gruppe der mycolsäurehaltigen Actinomyceten. Es ist mit Bakterien der Gattungen *Gordonia*, *Nocardia* und *Mycobacterium* eng verwandt (Pascual *et al.*, 1995; Stackebrandt *et al.*, 1997). Namensgebendes Merkmal von *C. glutamicum* ist seine keulenförmige (*coryneforme*) Gestalt und die Fähigkeit zur Produktion von L-Glutaminsäure (Kinoshita *et al.*, 1957).

Schon vor mehr als zwanzig Jahren wurde damit begonnen, die Aminosäureproduktion von *C. glutamicum*-Stämmen mit molekular-genetischen Methoden zu verbessern (Katsumata *et al.*, 1984; Ozaki *et al.*, 1984; Santamaría *et al.*, 1984). Biotechnologisch interessante Biosynthesewege wurden im Detail studiert und effiziente *C. glutamicum*-Stämme konstruiert (Sahm *et al.*, 1995, 2000; Eggeling *et al.*, 1997). Aus diesem Grunde besteht auch ein großes Interesse an den Transaminasen. So wird z. B. die Konstruktion von *C. glutamicum*-Stämmen angestrebt, die jeweils nur eine der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren spezifisch in großen Mengen produzieren können. Jährlich werden etwa je 500 Tonnen L-Isoleucin, L-Leucin und L-Valin benötigt (Blombach *et al.*, 2007; Leyval *et al.*, 2003). Verwendung finden diese Aminosäuren als Zusätze in Infusionslösungen, Nahrungsmitteln oder Tierfutter, und sie werden auch als Vorstufen in der chemischen Synthese von Herbiziden eingesetzt (Sahm *et al.*, 1995).

Transaminasen gelten als die bisher noch am wenigsten charakterisierten Enzyme in den Aminosäure-Biosynthesewegen von Mikroorganismen. Die Gründe dafür sind in der Evolution dieser Enzyme zu suchen. Nach bisherigen

Erkenntnissen ist davon auszugehen, dass die funktionelle Spezialisierung der meisten PLP-abhängigen Enzyme schon vor der Aufspaltung in die drei Domänen des Lebens, also vor 1,5 Milliarden Jahren, abgeschlossen war (Christen und Mehta, 2001). Anhand ihrer Sekundärstrukturen werden die Transaminasen in vier Klassen und mehrere Unterklassen unterteilt (Mehta *et al.*, 1993). Während Enzyme der Klassen I, II und IV wahrscheinlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen sind, scheinen Klasse III-Aminotransferasen unabhängig über konvergente Entwicklung entstanden zu sein (Sugio *et al.*, 1995; Jansonius, 1998). Zwischen Klassenzugehörigkeit und Substratspezifität gibt es in Bakterien eine gewisse Korrelation, nach der bestimmte Aminosäuren besonders häufig von Enzymen einer Klasse synthetisiert werden. So dienen z. B. hydrophobe Aminosäuren besonders häufig als Substrat für Klasse III-Transaminasen (Mehta *et al.*, 1993). Allerdings kann man aufgrund unabhängiger Entwicklung paraloger Gene, also homologer Gene, die durch Genverdopplung entstanden sind, nicht von Sequenzähnlichkeiten direkt auf die Funktion und Substratspezifität unbekannter Transaminasen schließen. Die große Zahl spezialisierter Transaminasen in heutigen Organismen resultiert zumindest zum Teil aus solchen Genverdopplungsereignissen, ausgehend von einem primitiven Enzym mit breiter Substratspezifität (Jensen, 1976). Als Folge ihrer Evolution weisen besonders Transaminasen mit einer bestimmten Hauptaktivität oft zusätzliche Nebenaktivitäten mit Substraten aus anderen Stoffwechselwegen auf (Jensen und Calhoun, 1981). So trägt z. B. die Transaminase TyrB aus *E. coli*, deren Hauptaufgabe die Synthese der aromatischen Aminosäuren ist, auch zur L-Leucinsynthese bei, für die eigentlich die Transaminase IlvE verantwortlich ist (Powell und Morrison, 1978a). Solche überlappenden Substratspektren erschweren das Studium dieser Enzyme zusätzlich, da die Abwesenheit einzelner oder sogar mehrerer Transaminase-Aktivitäten oft keinen Phänotyp erkennen lässt.

In *C. glutamicum* wurden bisher nur sechs Gene beschrieben, deren Genprodukte Transaminase-Aktivitäten haben. So wurde das für die *N*-Acetylornithin-Transaminase (ArgD) kodierende Gen *argD* identifiziert, das im

L-Arginin-Biosyntheseweg eine wichtige Rolle spielt (Sakanyan *et al.*, 1996). Auch *bioA*, dessen Genprodukt die 7,8-di-Amino-pelargonsäure-Transaminase (BioA), an der Biotin-Biosynthese beteiligt ist, wurde schon 1993 durch Hatakeyama *et al.* beschrieben. Beide Gene, *argD* und *bioA*, sind mit anderen Genen des jeweils selben Biosynthesewegs in Operons organisiert und wurden anhand ihres genomischen Kontextes entdeckt. Dies trifft auch auf *dapC* als Teil des L-Lysin-Biosyntheseweges zu, dessen Genprodukt, die Succinyl-diaminopimelinsäure-Transaminase (DapC), bisher aber nur in Zellextrakten charakterisiert worden ist (Hartmann *et al.*, 2003). Die Aktivitäten der durch *ilvE* kodierten Transaminase für die verzweigt-kettigen Aminosäuren (IlvE) wurden bisher ebenfalls nur in solchen Zellextrakten bestimmt (Radmacher *et al.*, 2002). Das Gen *serC*, mit großer Ähnlichkeit zum Phosphoserin-Transaminase-Gen aus *Mycobacterium tuberculosis*, wurde über eine Transposon-Insertion identifiziert, die eine L-Serin-Auxotrophie zur Folge hatte (Peters-Wendisch *et al.*, 2005). Stromaufwärts in umgekehrter Orientierung zu einem Operon, dessen zwei Gene vermutlich an der erst kürzlich aufgeklärten Pyridoxin-Biosynthese beteiligt sind (Ehrenshaft und Daub, 2002), ist *pdxR* lokalisiert. Dieses Gen ist vermutlich ebenfalls an der Synthese dieser PLP-Vorstufe beteiligt, da sich eine *pdxR*-Inaktivierungsmutante als Pyridoxin-auxotroph erwies (McHardy *et al.*, 2003).

Erst mit der seit kurzem zur Verfügung stehenden kompletten Genomsequenz von *C. glutamicum* (Kalinowski *et al.*, 2003) kann ein guter Überblick über die Transaminasen in diesem Bakterium gewonnen werden. Mit Hilfe einer auf einem Hidden-Markov-Modell (HMM) basierenden Profilanalyse wurde das Genom von *C. glutamicum* nach Transaminase-Genen durchsucht (McHardy *et al.*, 2003). Dazu ist die komplette Genomsequenz von *C. glutamicum* in alle sechs offenen Leseraster translatiert und anhand der Aminosäuresequenz einer Modell-Transaminase durchsucht worden. Dabei wurden insgesamt zwanzig offene Leseraster identifiziert, die ein typisches Transaminase-Motiv der Klassen I, II, III oder IV aufweisen (McHardy *et al.*, 2003). Neben den fünf schon bekannten Transaminase-Genen wurden auch die Gene für die bereits beschriebenen und ebenfalls PLP-abhängigen Enzyme Cystathionine- β -lyase

MetC (Kim *et al.*, 2001) und Glutamat 1-semialdehyd 2,1-aminomutase HemL (McHardy *et al.*, 2003) mit möglicher Transaminase-Aktivität annotiert, obwohl für diese Enzyme solch eine Nebenaktivität bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

In dieser Arbeit sollten Transaminase-Proteine aus *C. glutamicum* isoliert und funktionell charakterisiert werden. Zur weiteren Vertiefung sollten strukturelle Untersuchungen, möglichst durch Etablierung eines Proteinstrukturmodells, sowie Mutagenesen durchgeführt werden, um so letztendlich die Basis für Transaminasen mit „maßgeschneiderten“ Aktivitäten zu schaffen. Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit mit den identifizierten Genen in einem biotechnologisch relevanten Stamm eine verbesserte Produktbildung erfolgen kann.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sowie deren Eigenschaften sind in Tabelle 1 und die verwendeten Plasmide in Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
<i>Corynebacterium glutamicum</i>		
ATCC13032	Wildtyp	Abe <i>et al.</i> , 1967
ATCC13032 $\Delta alaT$	Wildtyp mit einer Deletion von 1260 bp in <i>alaT</i> (NCgl2747)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
ATCC13032 $\Delta aroT$	Wildtyp mit einer Deletion von 972 bp in <i>aroT</i> (NCgl0215)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
ATCC13032 $\Delta avtA$	Wildtyp mit einer Deletion von 1107 bp in <i>avtA</i> (NCgl2510)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
ATCC13032 $\Delta ilvE$	Wildtyp mit einer Deletion von 1050 bp in <i>ilvE</i> (NCgl2123)	Radmacher <i>et al.</i> , 2002
ATCC13032 $\Delta hisC$	Wildtyp mit einer Deletion von 1076 bp in <i>hisC</i> (NCgl2020)	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta alaT \Delta avtA$	Wildtyp mit einer Deletion von 1260 bp in <i>alaT</i> (NCgl2747) und 1107 bp in <i>avtA</i> (NCgl2510)	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta alaT \Delta ilvE$	Wildtyp mit einer Deletion von 1260 bp in <i>alaT</i> (NCgl2747) und 1050 bp in <i>ilvE</i> (NCgl2123)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005

Tab. 1 (f): In dieser Arbeit verwendete Bakterienstämme und ihre Eigenschaften

Stamm	Genotyp / Phänotyp	Referenz
ATCC13032 $\Delta aroT \Delta ilvE$	Wildtyp mit einer Deletion von 972 bp in <i>aroT</i> (NCgl0215) und 1050 bp in <i>ilvE</i> (NCgl2123)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
ATCC13032 $\Delta avtA \Delta ilvE$	Wildtyp mit einer Deletion von 1107 bp in <i>avtA</i> (NCgl2510) und 1050 bp in <i>ilvE</i> (NCgl2123)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
ATCC13032 $\Delta 2355$	Wildtyp mit einer Deletion von 1346 bp in NCgl2355	diese Arbeit
ATCC13032 $\Delta 2491$	Wildtyp mit einer Deletion von 920 bp in NCgl2491	diese Arbeit
ATCC13032:: pk18 <i>mob</i> -0780	Wildtyp mit einer chromosomalen Integration von pk18 <i>mob</i> -0780	diese Arbeit
VAL1	Valinproduzent, Kan ^R	Radmacher <i>et al.</i> , 2002
VAL1 $\Delta alaT$	VAL1 mit einer Deletion von 1260 bp in <i>alaT</i> (NCgl2747)	diese Arbeit
VAL1 $\Delta avtA$	VAL1 mit einer Deletion von 1107 bp in <i>avtA</i> (NCgl2510)	diese Arbeit
VAL1 $\Delta alaT \Delta avtA$	VAL1 mit einer Deletion von 1260 bp in <i>alaT</i> (NCgl2747) und 1107 bp in <i>avtA</i> (NCgl2510)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
BL21(DE3)	<i>F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3)</i>	Invitrogen
DH5 α MCR	<i>F endA1 supE44 thi⁻1 λ⁻ recA1 gyrA96 relA1 deoR Δ(lacZYA⁻argF) U169ϕ80dlacZΔM15 mcrA Δ(mrr⁻ hsdRMS⁻ mcrBC)</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
Electrocomp TM GeneHogs [®]	<i>F mcrA (mrr⁻ hsdRMS⁻ mcrBC) ö80lacZM15 lacX74 recA1 araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG fhuA::IS2</i>	Invitrogen

Tab. 2: In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Marker

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pASK-IBA-3C	Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (ori _{V_{E.c.}} , Cam ^R , tet-Promotor)	IBA GmbH
pJMargD	pASK-IBA-3C mit <i>argD</i> -Gen (NCgl1343)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMilvE	pASK-IBA-3C mit <i>ilvE</i> -Gen (NCgl2123)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMavtA	pASK-IBA-3C mit <i>avtA</i> -Gen (NCgl2510)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMalaT	pASK-IBA-3C mit <i>alaT</i> -Gen (NCgl2747)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM0780	pASK-IBA-3C mit NCgl0780-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMaroT	pASK-IBA-3C mit <i>aroT</i> -Gen (NCgl0215)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMhisC	pASK-IBA-3C mit <i>hisC</i> -Gen (NCgl2020)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMhemL	pASK-IBA-3C mit <i>hemL</i> -Gen (NCgl0422)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM2355	pASK-IBA-3C mit NCgl2355-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM2491	pASK-IBA-3C mit NCgl2491-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{sufS}	pASK-IBA-3C mit <i>sufS</i> -Gen (NCgl1500)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{serC}	pASK-IBA-3C mit <i>serC</i> -Gen (NCgl0794)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{aspT}	pASK-IBA-3C mit <i>aspT</i> -Gen (NCgl0237)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{bioA}	pASK-IBA-3C mit <i>bioA</i> -Gen (NCgl2515)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{dapC}	pASK-IBA-3C mit <i>dapC</i> -Gen (NCgl1058)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{pdxR}	pASK-IBA-3C mit <i>pdxR</i> -Gen (NCgl0753)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM0462	pASK-IBA-3C mit NCgl0462-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM1184	pASK-IBA-3C mit NCgl1184-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM1022	pASK-IBA-3C mit NCgl1022-Gen	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJM _{metC}	pASK-IBA-3C mit <i>metC</i> -Gen (NCgl2227)	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pJMaro _{TM54I}	pJMaroT mit Met54→Ile54-Austausch	diese Arbeit
pJMaro _{TM54L}	pJMaroT mit Met54→Leu54-Austausch	diese Arbeit
pJMaro _{TM54V}	pJMaroT mit Met54→Val54-Austausch	diese Arbeit

Tab. 2 (ff): In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Marker

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pJMhisCY21E	pJMhisC mit Tyr21→Glu21-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY21F	pJMhisC mit Tyr21→Phe21-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY21K	pJMhisC mit Tyr21→Lys21-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCN99D	pJMhisC mit Asn99→Asp99-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCN99F	pJMhisC mit Asn99→Phe99-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCN99G	pJMhisC mit Asn99→Gly99-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCN99K	pJMhisC mit Asn99→Lys99-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY123F	pJMhisC mit Tyr123→Phe123-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY257E	pJMhisC mit Tyr257→Glu257-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY257F	pJMhisC mit Tyr257→Phe257-Austausch	diese Arbeit
pJMhisCY257K	pJMhisC mit Tyr257→Lys257-Austausch	diese Arbeit
pBHK18	<i>E. coli</i> – <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor (pNG2, Kan ^R)	Kirchner und Tauch, 2003
pBHK18- <i>aroT</i>	pBHK18 mit <i>aroT</i> -Gen (NCgl0215) inkl. 300 bp upstream-Bereich von <i>aroT</i>	diese Arbeit
pBHK18- <i>aroT</i> -M54L	pBHK18- <i>aroT</i> mit M54 → L54-Austausch im offenen Leseraster von <i>aroT</i>	diese Arbeit
pBHK18- <i>hisCD</i>	pBHK18 mit <i>hisC</i> -Gen (NCgl0215) und <i>hisD</i> -Gen (NCgl2021) inkl. 300 bp upstream-Bereich von <i>hisD</i>	diese Arbeit
pET28a(+)	Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (oriV _{E.c.} , Kan ^R , T7-Promotor)	Novagen
pET28a(+)- <i>aroT</i>	pET28a(+) mit <i>aroT</i> -Gen (NCgl0215)	diese Arbeit
pET28a(+)- <i>hisC</i>	pET28a(+) mit <i>hisC</i> -Gen (NCgl0215)	diese Arbeit
pET22b(+)	Vektor zur heterologen Genexpression in <i>E. coli</i> (oriV _{E.c.} , Amp ^R , T7-Promotor)	Novagen
pET22b(+)- <i>aroT</i>	pET22b(+) mit <i>aroT</i> -Gen (NCgl0215)	diese Arbeit

Tab. 2 (ff): In dieser Arbeit verwendete Plasmide und ihre Marker

Plasmid	Marker / Eigenschaften	Referenz
pET22b(+)- <i>hisC</i>	pET22b(+) mit <i>hisC</i> -Gen (NCgl0215)	diese Arbeit
pJC1	<i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> Shuttle Vektor (Kan ^R <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriV_{C.g.}</i>)	Cremer <i>et al.</i> , 1990
pJC <i>ilvBNCD</i>	pJC1 mit 5,7 kb <i>HindIII/EcorR</i> -Fragment mit <i>ilvBNC</i> und 2,6 kb <i>XbaI</i> -Fragment mit <i>ilvD</i>	Sahm und Eggeling, 1999
pk18 <i>mob</i>	Integrationsvektor (Km ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> <i>oriT</i>)	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk18 <i>mob-0780</i>	pk18 <i>mob</i> mit einem 300 bp langen, internen Fragment von NCgl0780	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB</i>	Integrationsvektor (Km ^R , <i>oriV_{E.c.}</i> , <i>oriT</i> , <i>sacB</i>)	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pk19 <i>mobsacB</i> Δ <i>alaT</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit <i>alaT</i> -Sequenz (NCgl2747). Deletiert ist ein 914 bp langes, internes Fragment von <i>alaT</i>	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pk19 <i>mobsacB</i> Δ <i>aroT</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit <i>aroT</i> -Sequenz (NCgl0215). Deletiert ist ein 626 bp langes internes Fragment von <i>aroT</i>	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pk19 <i>mobsacB</i> Δ <i>avtA</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit <i>avtA</i> -Sequenz (NCgl2510). Deletiert ist ein 752 bp langes internes Fragment von <i>avtA</i>	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pk19 <i>mobsacB</i> Δ <i>ilvE</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit <i>ilvE</i> -Sequenz (NCgl2123). Deletiert ist ein 769 bp langes internes Fragment von <i>ilvE</i>	Marienhagen <i>et al.</i> , 2005
pk19 <i>mobsacB</i> Δ <i>hisC</i>	pk19 <i>mobsacB</i> mit <i>hisC</i> -Sequenz (NCgl2020). Deletiert ist ein 701 bp langes internes Fragment von <i>hisC</i>	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB</i> Δ 2355	pk19 <i>mobsacB</i> mit NCgl2355-Sequenz. Deletiert ist ein 971 bp langes internes Fragment von NCgl2355	diese Arbeit
pk19 <i>mobsacB</i> Δ 2491	pk19 <i>mobsacB</i> mit NCgl2491-Sequenz. Deletiert ist ein 506 bp langes internes Fragment von NCgl2491	diese Arbeit

Restriktionskarten der konstruierten Plasmide sind im Anhang aufgeführt.

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

2.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden ausschließlich Chemikalien der Firmen Merck AG (Darmstadt), Roche Diagnostics GmbH (Mannheim) und Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) verwendet. Bestandteile für komplexe Nährmedien wurden von den Difco-Laboratories (Detroit, MI, USA) bezogen.

2.2 Nährmedien

Zur Kultivierung und Stammhaltung der *E. coli*-Stämme wurde ausschließlich das Vollmedium LB verwendet (Bertani, 1951). Die Anzucht zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte auf SOB-Medium (Hanahan, 1985). Nach der Transformation wurden die Zellen zur Regeneration in LB-Medium oder SOC-Medium (Hanahan, 1985) überführt.

C. glutamicum wurde zur Stammhaltung und DNA-Isolierung in LB-Medium kultiviert. Als Medium für Vorkulturen wurde BHI-Komplexmedium (*Brain-Heart-Infusion*) oder CGIII-Medium (Menkel *et al.*, 1989) eingesetzt. Die Anzucht zur Herstellung kompetenter *C. glutamicum* - Zellen und die Regeneration nach erfolgter Transformation wurde ebenfalls auf BHI-Medium durchgeführt. Zur Gewinnung von Rohextrakten und zur Charakterisierung von Phänotypen wurde das Minimalmedium CGXII mit 4 % (w/v) Glucose und Protocatechusäure (30 mg/l) verwendet (Keilhauer *et al.*, 1993). Der Vorteil dieses Mediums liegt in der guten Pufferung durch 3-(N-Morpholino)propan-sulfonsäure (MOPS) bei pH 7,0.

Zur Selektion von *E. coli*-Stämmen, die Plasmide enthalten, wurden dem jeweiligen Medium 25 µg/ml Chloramphenicol (Stammlösung: 25 mg/ml in 70% Ethanol, steril filtriert), 50 µg/ml Kanamycin (Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, steril filtriert) oder 50 µg/ml Ampicillin (Stammlösung: 50 mg/ml in H₂O, steril

filtriert) zugesetzt. *C. glutamicum*-Kulturen wurden nach Integration eines Vektors in das Genom durch Elektroporation 15 µg/ml Kanamycin zugegeben. Die Selektion rekombinanter *C. glutamicum*-Stämme mit frei replizierbaren Vektoren wurde durch Zugabe von 25 µg/ml oder 50 µg/ml Kanamycin erreicht. Zur Induktion der *tet*-Promotor-abhängigen Expression von Genen in *E. coli* wurden dem Medium 0,2 µg/ml Anhydrotetracyclin (Stammlösung: 2 mg/ml in N,N-Dimethyl-formamid) zugesetzt (Botsford und Harman, 1992). Die T7-Promotor-kontrollierte Genexpression in *E. coli* hingegen, wurde durch Zugabe von 0,95 mg/ml IPTG (Stammlösung: 23,8 mg/ml in H₂O, steril filtriert) induziert (Studier *et al.*, 1990). Die Selektion auf Excision der von *pk19mobsacB*-abgeleiteten Vektoren aus dem Genom von *C. glutamicum* erfolgte auf LB-Medium-Platten mit 10 % (w/v) Saccharose (Schäfer *et al.*, 1994). Aminosäuren zur Supplementation von Aminosäure-Auxothrophien wurden in Wasser gelöst und steril filtriert zu den autoklavierten Medien gegeben. Für Agarplatten wurden den Nährmedien 1,5 % (w/v) Agar (Difco-Laboratories Detroit, MI, USA) hinzugefügt.

2.3 Kultivierung der Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* und *C. glutamicum* erfolgte, wenn nicht anders angegeben, in 50-100 ml Nährmedium in 500 ml Erlenmeyerkolben mit zwei seitlichen Schikanen bei 130 Upm auf einer Schüttelmaschine. Bei kleineren Volumina (5 ml-Kulturen) fanden Reagenzgläser Verwendung, die bei 170 Upm inkubiert wurden. Die Inkubationstemperatur betrug bei *E. coli* 37 °C. Zur Proteinexpression wurde diese Temperatur auf 30 °C reduziert, um die Bildung von Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) zu vermeiden. *C. glutamicum* wurde ausschließlich bei 30 °C kultiviert.

In Experimenten zur Aminosäurebildung in Schüttelkolben wurden *C. glutamicum*-Kulturen über Nacht auf Komplexmedium vorkultiviert und dann in Minimalmedium übertragen. Dazu wurden Aliquots der Vorkulturen steril entnommen und 10 min bei 3500 Upm und 30 °C abzentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 30 ml steriler 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung erfolgte die

Überführung in das Minimalmedium. Dabei wurde stets eine Zelldichte von $OD_{600} = 1$ eingestellt.

Für Experimente zur Aminosäurebildung in einer Fermenteranlage wurden *C. glutamicum*-Kulturen zunächst in einer ersten Vorkultur in LB-Komplexmedium über den Tag für zwölf Stunden inkubiert und abends in 50 ml CGXII-Medium als zweite Vorkultur übertragen. Für diese Minimalmediumkultur wurden 10 ml der LB-Kultur bei 3500 Upm und 30 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und nach einem Waschschrift mit steriler 0,9 %iger (w/v) NaCl-Lösung in das Minimalmedium überführt. Diese zweite Vorkultur wurde über Nacht bei 130 Upm und 30 °C geschüttelt. Zur Inokulation der „SIXFORS-Vario“-Fermenter wurden die kompletten Minimalmedium-Vorkulturen über eine sterile Strecke direkt in die Rührkessel gegeben.

2.4 Fermentation von *C. glutamicum* zur Aminosäurebildung mit der „SIXFORS-Vario“-Anlage

Fermenterversuche zur L-Valin- und L-Alaninbildung durch *C. glutamicum* wurden mit einer „SIXFORS-Vario“-Anlage (Infors AG, Basel, Schweiz) durchgeführt. Die Anlage bestand aus sechs parallelen Rührkesseln mit einem jeweiligen Arbeitsvolumen von 1,5 – 2,3 l. Die Temperaturmessung erfolgte über eine Pt-100 Sensor. Zur Temperaturanpassung dienten elektrisch beheizte Thermomäntel und Kühlfinger in den Reaktoren. Die Begasung erfolgte mit Luft, deren Zufuhr über einen Massenstromregler gesteuert wurde. Der Zuluftvolumenstrom betrug 0,5 l/min und die Rührerdrehzahl lag im Bereich von 500-1500 Upm. Die Durchführung der Fermentationen erfolgte bei Normaldruck. Zur Messung des pH-Werts kamen Gelelektroden zum Einsatz. Vorab erfolgte eine Zwei-Punkt-Kalibrierung mit Pufferlösungen pH 4,0 und pH 7,0. Der pH-Sollwert von 7,0 wurde mittels eines PID-Reglers gehalten. Über diesen wurden Peristaltikpumpen an der Basiseinheit zur Dosierung von 25 % iger Ammoniaklösung und 5 M H_2SO_4 angesteuert. Die Konzentration des im Medium gelösten Sauerstoffs wurde über eine amperometrische Sauerstoffelektrode erfasst. Die Kalibrierung erfolgte vor der Inokulation durch Einstellung

von 100 % Sättigung bei einer Drehzahl von 800 Upm und Begasung mit 1,5 l/min. Der Nullwert wurde durch Begasung mit Stickstoff eingestellt. Über eine manuelle Einstellung der Begasungsrate und die automatische Anpassung der Rührerdrehzahl wurde die Gelöstsauerstoffkonzentration geregelt. Kohlendioxid und Sauerstoff wurden in einem Teilstrom der Abluft mittels einer Abgasanalytik (Fisher-Rosemount GmbH, Hasselroth) gemessen. Die Konzentrationsbestimmung von Kohlendioxid und Sauerstoff erfolgte durch Nahinfrarotabsorption bzw. paramagnetische Messung. Der Nullabgleich der Abgasmessung erfolgte mit Stickstoff. Mit Prüfgas wurden 10 % Kohlendioxid, mit Luft 20,93 % Sauerstoff eingestellt. Antischaum wurde während der Fermentation bei Bedarf manuell zudosiert. Die Standardprozessparameter Rührerdrehzahl, Zuluftmenge, Temperatur, pH und pO_2 wurden durch das Infors-System angezeigt und geregelt. Alle Prozessparameter, einschließlich der Werte der Abgasanalytik wurden durch das Programm *LabView Vers. 7.1.1* (National Instruments, Austin, USA) auf einem Prozessrechner erfasst. Sterile Probenahmen erfolgten alle zwei Stunden über eine Fermentationsdauer von 48 Stunden. Die Offline-Analytik beinhaltete die Bestimmung des Bakterienwachstums mittels photometrischer Messung der optischen Dichte und HPLC-Analysen zur Ermittlung der Konzentrationen von L-Valin und L-Alanin im Kulturüberstand.

2.5 Stammhaltung

Zur Stammhaltung auf LB-Platten wurden die verwendeten Stämme alle zwei Wochen auf neue LB-Platten überimpft und bei 4 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden Dauerkulturen angelegt. Dazu wurden 2 ml einer LB-Kultur abzentrifugiert (*Heraeus®-Biofuge®-Pico*, Kendro-Laboratory-Products, Langenselbold) und in 750 µl LB mit 250 µl sterilem Glycerin (87 %) resuspendiert (Sambrook *et al.*, 1989). Die so erhaltenen Zellsuspensionen wurden bei -70 °C aufbewahrt und zum Beimpfen von Agarplatten verwendet.

2.6 Bestimmung des Bakterienwachstums

Da eine lineare Abhängigkeit zwischen optischer Dichte und Zellkonzentration bei einer Extinktion von 0,05 bis 0,5 besteht, kann anhand der optischen Dichte das Wachstum von Bakterien bestimmt werden. Dazu wurde ein *Pharmacia Ultrospec 3300 pro UV/Visible Spectrometer* (Amersham Biosciences, Uppsala Schweden) verwendet. Als Referenz diente das jeweilige Medium. Lag die gemessene Extinktion außerhalb des linearen Bereichs, wurde die Probe entsprechend mit Medium verdünnt.

3. Molekulargenetische Methoden

3.1 Isolierung von DNA

Die Isolierung chromosomaler DNA aus *C. glutamicum* erfolgte entweder durch Aussalzen nach Lyse der Zellen (Eikmanns *et al.*, 1994) oder mit Hilfe des *DNeasy™ Tissue Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Um Plasmid-DNA aus *E. coli* zu präparieren, wurde die nach Birnboim und Doly (1979) modifizierte Methode der alkalischen Lyse eingesetzt oder das *QIAprep Spin Miniprep Kit* (QIAGEN, Hilden) verwendet. Zur Gewinnung einer größeren Menge Plasmid-DNA, wurde das *QIAfilter Plasmid Purification Kit* der Firma QIAGEN (Hilden) eingesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA mit beiden Kits erfolgte hierbei jeweils gemäß den Angaben des Herstellers.

3.2 Restriktion, Modifikation und Ligation von DNA

Techniken zur Restriktion, Ligation, Klenow- und Phosphatasebehandlung wurden im Allgemeinen nach Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Die Verwendung von Restriktionsendonukleasen erfolgte für die einzelnen Enzyme

nach Angaben der Hersteller (Roche Diagnostics, Mannheim; Fermentas, St. Leon-Rot; New England Biolabs, Frankfurt am Main). Dabei spaltet 1 U Enzym 1 µg DNA in einer Stunde. Restriktionsansätze zu analytischen Zwecken wurden in einem Volumen von 20 µl und präparative Restriktionsansätze in einem Volumen von 50 µl durchgeführt. Für die Berechnung der optimalen DNA-Mengenverhältnisse für Ligationen wurden die DNA-Konzentrationen zunächst mit Hilfe eines *NanoDrop*-ND-1000-Spektrophotometers (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, USA) bestimmt. Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die Ligase des Bakteriophagen T4 nach Sambrook *et al.* (1989) bei 16 °C im Wasserbad über Nacht eingesetzt. Darüber hinaus wurden das *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche Diagnostics, Mannheim) und, um eine Ligation von DNA-Fragmenten über stumpfe Enden zu ermöglichen, das *SureCloneTM Ligation Kit* (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) verwendet. Dafür wurden mittels Klenow-Enzym das 3'-überhängende Ende abgespalten bzw. das 5'-überhängende Ende in Anwesenheit von 0,2 µM dNTP's aufgefüllt. Die Religation von linearisierten Vektoren wurde stark reduziert, indem der Phosphatrest des 5'-Endes mittels *shrimp alkaline phosphatase* (SAP) (USB, Bad Honnef) zuvor abgespalten worden war. Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte je nach Größe in 1-2 %igen Agarosegelen in TAE-Puffer nach Sambrook *et al.* (1989). Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Reaktionen zu deren Modifizierung oder zur präparativen Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das *NucleoSpin Extract 2 in 1 Kit* (Macharey & Nagel, Düren) oder das *Mini-Elute Gel Extraction Kit* (QIAGEN, Hilden) nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

3.3 Transformation von *E. coli* und *C. glutamicum*

Zur Transformation von *E. coli* fand eine modifizierte Methode nach Hanahan (1983) Anwendung, bei der die kompetenten Zellen mittels Hitzeschock transformiert wurden (Hanahan, 1985). Für den Aufbau von Genbibliotheken für die gerichtete Enzymevolution wurden ElectrocompTM GeneHogs[®] *E. coli* - Zellen (Invitrogen, Carlsbad, USA) durch Elektroporation transformiert. Dazu

wurden 20 µl Zellen zunächst vorsichtig mit 3 µl der zu transformierenden DNA vermischt und dann in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ *Gene Pulser Cuvette*, 0,1 cm, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die Elektroporation wurde dann mit einem Puls bei einer Spannung von 1,8 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER XCELLTM (Biorad, Hercules, USA) durchgeführt. Sofort nach dem Puls wurde den Zellen 480 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellsuspension für eine Stunde bei 37 °C unter Schütteln bei 170 Upm inkubiert, um eine Expression der auf den Vektoren lokalisierten Antibiotika-Resistenzgene zu ermöglichen.

Die Transformation von *C. glutamicum* erfolgte durch Elektroporation mit anschließendem Hitzeschock nach Tauch *et al.*, (2002). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden zunächst 50 ml BHIS-Medium (BHI-Komplexmedium mit 0,5 M Sorbit) mit einer Einzelkolonie von einer frischen LB-Agarplatte beimpft und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden 100 ml auf 30 °C vorgewärmtes BHIS-Medium mit 2 ml dieser Vorkultur beimpft und das Wachstum der Zellen bei 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,75 verfolgt, dann erfolgte die Zellernte (6000 Upm, 4 °C, 15 min). Im Folgenden wurden die Zellen dreimal mit 50 ml eiskaltem TG-Puffer (1 mM Tris, 10 % (v/v) Glycerin, pH 7,5) und zweimal mit 50 ml eiskaltem Glycerin (10 % (v/v)) gewaschen. Bis zur weiteren Verwendung sind die kompetenten Zellen in 150 µl Aliquots bei -70 °C aufbewahrt worden. Zur Elektroporation wurden 150 µl Zellen mit 1 – 2 µl der zu transformierenden DNA gemischt und luftblasenfrei in eine vorgekühlte, sterile Elektroporationsküvette (Typ *Gene Pulser Cuvette*, 0,2 cm, Biorad, Hercules, USA) überführt. Die Elektroporation wurde dann mit einem Puls bei einer Spannung von 2,5 kV, einem Widerstand von 200 Ω und einer Kondensatorkapazität von 25 µF in einem BIORAD GENE PULSER XCELLTM (Biorad, Hercules, USA) durchgeführt (Kirchner und Tauch, 2003). Sofort nach der Elektroporation wurden die Zellen in 4 ml BHIS-Medium überführt, das auf 46 °C vorgewärmt war, und für 6 min einem Hitzeschock bei 46 °C unterzogen. Vermutlich wird durch diesen Hitzeschock die Restriktionsaktivität von *C. glutamicum* reduziert, so dass die Transformationseffizienz bei Verwendung heterologer DNA deutlich erhöht war (van der Rest *et al.*, 1999). Anschließend

wurden die Zellen zur Regeneration und Ausprägung der Antibiotikaresistenz für 1 – 2 h bei 30 °C unter Schütteln bei 170 Upm inkubiert, bevor sie auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten zur Selektion ausplattiert wurden.

3.4 Polymerasekettenreaktion

3.4.1 *In vitro*-Amplifizierung von DNA

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde sowohl präparativ zur *in vitro*-Amplifizierung von DNA-Fragmenten (Saiki *et al.*, 1988) als auch analytisch zur Überprüfung von Insertions- und Deletionsmutanten eingesetzt (Kirchner und Tauch, 2003). Dazu fanden jeweils zwei, den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankierende synthetische Oligonukleotide als Primer („*forward*“- bzw. „*reverse*“-Primer) Verwendung, die bei MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen wurden (die Sequenzen der in dieser Arbeit verwendeten Primer befinden sich im Anhang). Zum speziellen Design von Primern für die Klonierung von Genen zur Überexpression und Affinitätsaufreinigung nativer Proteine mit Hilfe des *Strep Tag*[®] II-Systems wurde das Program *Primer D'Signer 1.1* (IBA, Göttingen) verwendet. Die Anlagerungstemperatur der PCR-Primer lag zwischen 60 – 66 °C. Die Durchführung der PCR erfolgte im T3000 Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen) durch in der Regel 30 sich wiederholende Zyklen aus DNA-Denaturierung bei 94 °C, Anlagerung der Oligonukleotide (*annealing*) bei 54 – 58 °C und DNA-Kettenverlängerung (*elongation*) mittels thermostabiler *Taq*-DNA-Polymerase bei 72 °C (Tindall und Kunkel, 1988). Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die zur weiteren Klonierung verwendet wurden, erfolgte unter Zusatz der fehlerkorrigierenden *Pwo*-Polymerase (Barnes *et al.*, 1994), die in einem Gemisch zusammen mit der *Taq*-Polymerase im *Expand High Fidelity Kit* (Roche) vorliegt. Um in einigen Fällen DNA-Fragmente mit stumpfen Enden (*blunt ends*) zu amplifizieren, fand die *KOD*-Polymerase (Novagen, Madison, USA) Verwendung. Die optimale Anlagerungstemperatur (T_a) für die PCR wurde entweder vom Hersteller der Oligonukleotide angegeben, oder aus der Basenzusammensetzung berechnet (Sambrock *et al.*, 1989). Dabei wurde nur der Bereich der Oligonukleotide berücksichtigt, der bereits im ersten Zyklus

an die DNA-Matrize anlagert ($T_a = 2\text{ }^\circ\text{C}$ (pro A-T-Basenpaarung mit der Matrizen-DNA) + $4\text{ }^\circ\text{C}$ (pro G-C-Paarung) – $5\text{ }^\circ\text{C}$). Die Elongationszeit betrug 1 min pro 1 kb. Als DNA-Matrize wurden chromosomale DNA, Plasmid-DNA und auch DNA aus Zellextrakten eingesetzt (Kolonien-PCR). Für eine Kolonien-PCR wurde zunächst eine Kolonie in 50 μl sterilem Wasser resuspendiert, und bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten inkubiert. Dies diente zum Aufschluß der Zellen und zur Denaturierung DNA-assoziiierter Proteine. Von dieser Suspension wurden 5 μl als DNA-Matrize zur PCR eingesetzt.

3.4.2 Generierung von DNA-Abschnitten mit zufälligen Fehlern

Für die gerichtete Enzymevolution wurden große Bibliotheken verschiedener Versionen eines Gens mittels PCR erstellt. Aufgrund fehlender Fehlerkorrekturfunktion neigen die in solchen Reaktionen verwendeten DNA-Polymerasen dazu, während des Kopiervorgangs von der DNA-Matrize zufällige Mutationen einzubauen („*error-prone*“-PCR). Für die Durchführung solcher PCRs wurden das *DiversifyTMPCR Random Mutagenesis Kit* (Clontech Laboratories Inc., Mountain View, USA) und das *GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit* (Stratagene, La Jolla, USA) gemäß den Angaben der Hersteller eingesetzt. Die statistische Anzahl der zufällig eingeführten Mutationen wurde von 1,0 bis 4,6 pro 1000 bp variiert.

3.5 Ortsgerichtete Mutagenese

Mittels PCR wurden gezielt Punktmutationen in die offenen Leseraster von Genen eingeführt, die in doppelsträngige DNA-Vektoren integriert waren. Bei dieser ortsgerichteten Mutagenese („*site-directed mutagenesis*“) fanden etwa 35 bp lange Primer Verwendung, die die gewünschte Mutation bereits in der Mitte ihrer Sequenz enthielten (Braman *et al.*, 1996). Ein Beispiel für das Design solcher Primer ist in Abbildung 2 angegeben. Beide Primer eines Primerpaares waren bis auf die einzuführende Mutation jeweils zum identischen Teilabschnitt auf dem Vektor komplementär.

Original Sequenz *hisC*:

5'-GGCTGCCAATGGTTCC**AAT**GAAATTCTGCAGCAGC-3'
Asn99

Nötige Nukleotidaustausche für die Mutation Asn99→Gly99:

5'-GGCTGCCAATGGTTCC**GGT**GAAATTCTGCAGCAGC-3'
Gly99

Primer:

HisCN99G_for:

5'-GGCTGCCAATGGTTCC**GGT**GAAATTCTGCAGCAGC-3'

HisCN99G_rev:

5'-GCTGCTGCAGAATTT**CA**CCGGAACCATTGGCAGCC-3'

Abb. 2: Schema Primerdesign für den Aminosäureaustausch Asparagin gegen Glycin an Position 99 im *hisC*-Gen (Das zu mutierende Codon ist fett und kursiv hervorgehoben, die nötigen Nukleotidaustausche sind unterstrichen)

Während der PCR wurde die komplette DNA-Sequenz des Plasmids von den veränderten Primern ausgehend verlängert und so die Mutation in die Plasmide inkorporiert. Um zusätzliche, ungewollte Mutationen weitestgehend vermeiden zu können, wurde für diese Reaktion die *PfuTurbo*-DNA-Polymerase (Fermentas, Burlington, Kanada) mit sehr guter Korrekturaktivität eingesetzt. Als Matrize wurde die aus *E. coli* isolierte und methylierte Vektor-DNA eingesetzt, um nach Abschluss der PCR diese Matrizen-DNA mit Hilfe des Restriktionsenzym *DpnI*, das ausschließlich methylierte DNA degradieren kann, abbauen zu können (Nelson und McClelland, 1992). Die punktmutations-tragenden Plasmide blieben dabei intakt, da die in die PCR eingesetzten Nukleotide stets unmethyliert waren. Nach Transformation der Plasmide in *E. coli*-Zellen und Selektion auf den entsprechenden Selektionsmarker wurden die Vektoren isoliert und die Einführung der jeweiligen Punktmutation(en) mittels DNA-Sequenzierung überprüft.

3.6 Konstruktion von Deletions-und Integrationsmutanten von *C. glutamicum*

In *C. glutamicum* wurden die Transaminase-Gene im Leseraster („*in-frame*“) deletiert, um die Expression stromabwärts liegender Gene möglichst nicht zu beeinträchtigen. Dazu wurde zunächst eine *cross-over* PCR nach Link *et al.*, 1997 durchgeführt. In zwei ersten PCRs wurden zwei jeweils 400 bp lange stromabwärts und stromaufwärts liegende, flankierende DNA-Bereiche des zu deletierenden Gens getrennt amplifiziert. Die dazu verwendeten Oligonukleotide wurden so modifiziert, dass die entstandenen PCR-Fragmente am 5'-Ende jeweils mit einer 21 Nukleotid langen *linker*-Sequenz verbunden waren, die bei den Fragmenten zueinander komplementär war. Zur *cross-over* PCR fanden die Produkte der ersten PCRs als DNA-Matrize Verwendung, wobei über den komplementären Bereich während der Reaktion eine Anlagerung stattfand. Durch Einsatz der äußeren Primer entstand so das Deletionskonstrukt, das in den Vektor pK19*mobsacB* kloniert wurde (Schäfer *et al.*, 1994). Nach Transformation dieses nicht frei replizierbaren Vektors in *C. glutamicum* und anschließender Selektion auf die durch pK19*mobsacB* vermittelte Kanamycinresistenz wurden Klone isoliert, in denen das Plasmid durch homologe Rekombination in das Chromosom integriert war (Schäfer *et al.*, 1994). Durch Kultivierung dieser Zellen in Vollmedium ohne Kanamycin konnte ein zweites Rekombinationsereignis über die jetzt im Chromosom doppelt vorliegenden DNA-Bereiche erfolgen. Die Bakterienkultur wurde in verschiedenen Verdünnungen auf LB-Medium mit 10 % Saccharose ausplattiert. Aufgrund der durch *sacB* auf pK19*mobsacB* kodierten Levan-Sucrase wurde Saccharose zu Levan polymerisiert. Dieses Polymer wiederum führte zur Letalität (Bramucci *et al.*, 1996). So konnten nur solche Klone wachsen, die das Plasmid durch die zweite Rekombination verloren hatten. Bei den dann Saccharose-resistenten und Kanamycin-sensitiven Klonen war entweder die genetische Wildtyp-Situation wieder hergestellt oder das gewünschte Gen deletiert. Die Bestätigung der Deletion im Genom von *C. glutamicum* erfolgte über die PCR mit Primern, die zu einem Bereich außerhalb des Gens komplementär waren.

Integrationsmutanten wurden erzeugt, indem in den Vektor *pk18mob*, der ebenfalls in *C. glutamicum* nicht frei replizierbar ist, ein internes 300 bp langes Fragment des zu unterbrechenden Gens kloniert wurde (Schäfer *et al.*, 1994). Nach Transformation des Plasmids durch Elektroporation konnten schließlich Integrationsmutanten durch Selektion auf die durch das Plasmid vermittelte Resistenz gegen Kanamycin isoliert werden.

3.7 DNA-Sequenzierung und computergestützte Sequenzanalyse

Alle DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode von Sanger *et al.*, (1977) mit den im Anhang aufgeführten Primern bei der Firma AGOWA (Berlin) durchgeführt. Die so erhaltenen DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *Clone Manager 7 for Windows* (Version 7.03; Scientific & Educational Software) analysiert, wodurch Restriktionsschnittstellen und offene Leseraster identifiziert werden konnten. Datenbankvergleiche zur Suche nach DNA- und Proteinsequenzen mit Ähnlichkeiten zu den in dieser Arbeit ermittelten Sequenzen wurden sowohl am *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Washington, USA) mit den Programmen *BLASTn* und *BLASTp* (Altschul *et al.*, 1997) als auch mit Hilfe von *ERGO* (Integrated Genomics, Chicago, USA) durchgeführt. Die Datenbank *ERGO*, die darüber hinaus genomweite Analysen des Stammes *C. glutamicum* ATCC13032 ermöglicht, wurde auch zur Untersuchung des genomischen Kontextes einzelner Gene genutzt.

4. Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren wurde mit Hilfe der *reversed phase High Performance Liquid Chromatography* (RP-HPLC) durchgeführt (Jones und Giligan, 1983). Vor der säulenchromatographischen Auftrennung erfolgte eine

Derivatisierung der Aminosäuren mit dem Reagenz *o*-Phthaldialdehyd, das mit der Aminogruppe der Aminosäuren reagiert (Lindroth und Mopper, 1979; Jones und Giligan, 1983). Hierzu wurden je 2,5 µl der Probe mit 20 µl *o*-Phthaldialdehyd/Mercaptoethanol-Lösung (Pierce Europe BV, Niederlande) vermischt und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur zur Auftrennung auf eine RP-HPLC Säule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 125 x 4 mm) mit vorgeschalteter Vorsäule (LiChrospher 100 RP 18 EC 5 µm, 40 x 4 mm, CS-Chromatographie Service GmbH Langerwehe) gegeben. Die bei der Derivatisierung entstandenen thiosubstituierten Isoindolverbindungen wurden mit einem Gradienten mit zunehmender Methanolkonzentration von der Säule eluiert. Als polarer Laufpuffer diente hierbei 0,1 M Natriumacetat (pH 7,2). Die Detektion der fluoreszierenden Derivate erfolgte nach Anregung bei 230 nm bei einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zur säulenchromatographischen Auftrennung und Detektion wurde ein HPLC-Gerät vom Typ HP1100 (Hewlett Packard, Waldbronn) mit angeschlossenem Fluoreszenzdetektor (G1321A) verwendet. Die Systemsteuerung und Datenauswertung erfolgte mit dem Programm *HP-Chemstation* (Hewlett Packard, Waldbronn). Die Konzentration der jeweils analysierten Aminosäure wurde über den Vergleich mit einem externen Standard der betreffenden Aminosäure (AS) und unter zusätzlicher Verwendung von L-Asparagin (Asn) als internen Standard ermittelt.

Berechnung der Aminosäurekonzentration:

$$c[\text{AS}] = \frac{A^{(*)}(\text{Asn})_{\text{Standard}} \times A(\text{AS})_{\text{Probe}} \times \text{Verd.}^{(**)} \times c[\text{AS}]_{\text{Standard}}}{A(\text{Asn})_{\text{Probe}} \times A(\text{AS})_{\text{Standard}}}$$

[^(*) A: Fläche (*area*); [^(**) Verd: Verdünnungsfaktor der HPLC-Probe]

5. Biochemische Methoden

5.1 Herstellung von zellfreien Rohextrakten von *C. glutamicum*

Eine 50 ml CGXII-Hauptkultur wurde mit einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0,25$ von einer 50 ml CGIII-Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (4000 Upm, 4 °C, 10 min), das Zellpellet mit Waschpuffer (1 M Tris, pH 8) gewaschen und in 1 ml desselben Puffers resuspendiert. Die Zellen wurden in ein vorgekühltes 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und der Zellaufschluss bei 0 °C durch einen Ultraschalldesintegrator (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA; Beschalldauer 10 min, Pulslänge 20 %, Beschallintensität 2) durchgeführt. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) abgetrennt. Zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen wurde der Extrakt jeweils auf eine *PD-10* Säule der Firma Amersham Biosciences (Uppsala, Schweden) nach Angaben des Herstellers gegeben und anschließend das Eluat in verschiedenen Verdünnungen in Enzymtests eingesetzt.

5.2 Überexpression heterologer Proteine in *E. coli* und native Affinitätsaufreinigung

Für die Überexpression und Aufreinigung heterologer Proteine fand sowohl das *Strep-Tag II*[®]-System der Firma IBA (Göttingen), als auch das pET-System der Firma Novagen (Merck Biosciences, Darmstadt) Verwendung. Während die mit Hilfe des *Strep-Tag II*[®] gewonnenen Proteine für Enzymtests und für Proteinkristallisationsversuche eingesetzt wurden, wurden die pET-Systemaufgereinigten Proteine lediglich für die Kristallisation verwendet.

5.2.1 Genexpression und Proteinaufreinigung mit dem *Strep-Tag II*[®]-System

Zur Genexpression wurden die entsprechenden Gene in den pASK-IBA-3C-Vektor kloniert. Die Überexpression in diesem Vektor ist sehr leicht induzierbar, da die Expressionskassette unter der transkriptionellen Kontrolle der *tet*-Promotor/Operator-Region steht (Skerra, 1994). Die Kontrolle des *tet*-Promotors ist nicht - wie die des *lac*-Promotors - an zelluläre Regulationsmechanismen wie die Katabolit-Repression gebunden, und erst durch Zugabe von Anhydrotetracyclin induzierbar (Botsford und Harman, 1992). Die konstitutive Expression des *tet*-Repressorgens *tetA*, das ebenfalls auf dem Expressionsplasmid vorhanden ist, garantiert die Repression des Promotors in Abwesenheit dieses Induktors. Durch die gezielte Klonierung wurde den Proteinen bei der Genexpression der acht Aminosäuren lange *Strep-Tag II*[®] (Sequenz: N-WSHPQFEK-C) an das C-terminale Ende angefügt. Dieses lediglich durch zwei Aminosäuren (N-Ser-Ala-C) mit dem Protein fusionierte Peptid erlaubt eine spezifische Affinitätsaufreinigung an *StrepTactin*[®]-Sepharose[®]-Säulen unter sehr milden Bedingungen in einem Schritt (Voss und Skerra, 1997).

Ausgangspunkt für die Überexpression der Transaminase-Gene war eine 5 ml LB-Vorkultur des *E. coli*-Stammes, der das jeweilige Plasmid zur Proteinexpression trug. Diese Kultur wurde über Nacht bei 30 °C inkubiert. Mit 2 ml dieser Kultur wurde eine 100 ml LB-Hauptkultur angeimpft, die dann ebenfalls bei 30 °C bis zu einer OD₅₅₀ = 0,5 auf dem Schüttler bei 130 Upm inkubiert wurde. In dieser Wachstumsphase erfolgte die Induktion der Transkription durch Zugabe von 10 µl einer Anhydrotetracyclin-Lösung (Stammlösung: 2 mg/ml in *N,N*-Dimethyl-formamid). Nach drei Stunden weiterer Inkubation bei 30 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 Upm, 4 °C, 12 min) geerntet und in 1 ml eiskaltem Waschpuffer (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4 °C durch den Ultraschall-desintegrator (*Branson Sonifier W-250*, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA; Beschallungsdauer 4 min, Pulslänge 20 %, Beschallungsintensität 2). Durch Zentrifugation (30 min, 13000 Upm, 4 °C) wurden die

Zelltrümmer nach der Ultraschallbehandlung vom cytoplasmatischen Rohextrakt abgetrennt.

Um die Stabilität der rekombinanten Proteine während der Aufreinigung zu gewährleisten, wurden alle Schritte bei 4 °C mit vorgekühlten Säulen und Puffern durchgeführt. Die *StrepTactin*[®]-Affinitätssäulen wurden mit 1 ml Bettvolumen *StrepTactin*[®]-Sephrose[®] befüllt. Nach Äquilibrierung der Säulen mit Waschpuffer wurde 1 ml des Rohextraktes auf die Sepharose gegeben. Nach Durchlauf des Extraktes wurde die Affinitätssäule fünfmal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution des Proteins wurde in sechs Fraktionen mit einem Elutionspuffer (100 mM Tris/HCl pH 8, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin) durchgeführt. Das Desthiobiotin konkurriert mit dem *Strep*-Tag II[®]-Fusionsprotein um die Bindestellen an der *StrepTactin*[®]-Sephrose[®] und bindet reversibel an das *StrepTactin*[®] (Voss und Skerra, 1997). Zur Regeneration der Affinitätssäulen wurde zuerst das gebundene Desthiobiotin durch Zugabe von dreimal 5 ml Regenerationspuffer (100 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA, pH 8) entfernt. HABA (2-[4'-hydroxy-benzenazo]-benzoesäure) verdrängt dabei sowohl Desthiobiotin als auch noch über den *Strep*-Tag II[®] gebundenes Protein vom *StrepTactin*[®]. Nach Zugabe von zweimal 4 ml Waschpuffer stand die Affinitätssäule für erneute Proteinaufreinigungen zur Verfügung. Die Elutionsfraktionen wurden in die Enzymtests direkt eingesetzt oder jeweils zu 50 µl aliquotiert und bei -20 °C für eine spätere Verwendung eingefroren.

5.2.2 Genexpression und Proteinaufreinigung mit dem pET-System

Gene, die in die Vektoren pET28a(+) und pET22b(+) (Novagen, Madison, WI, USA) kloniert werden, unterliegen der Expressionskontrolle des T7-Promotors, der durch die *E. coli* RNA-Polymerase nicht erkannt wird (Studier *et al.*, 1990). Durch diese stringente Transkriptionskontrolle kommt es nicht zur Transkription, wenn keine T7 RNA-Polymerase in der Zelle aktiv ist. In das Genom des *E. coli* Stammes BL21 (DE3) ist der lysogene λDE3-Phage integriert, der über das T7 RNA-Polymerase-Gen unter Kontrolle des *lac*-Promotors verfügt. Durch Zugabe von IPTG wird also so zunächst die T7-Polymerase exprimiert, die dann die

heterologen Gene auf den pET-Vektoren transkribiert. Die Expression dieser Gene mit dem pET28a(+)-Vektor resultiert in Fusionsproteinen mit einem N-terminalen 6XHis-Tag. Zwischen Protein und Tag ist außerdem eine Thrombin-Erkennungsstelle lokalisiert, die eine Abspaltung des Tags im Anschluss an die Proteinaufreinigung ermöglicht. Fusionsproteine, die das Ergebnis heterologer Genexpression vom pET22b(+)-Vektor sind, haben einen nicht abspaltbaren C-terminalen 6XHis-Tag.

Für die Expression im 500 ml Maßstab wurde zunächst eine 50 ml LB-Vorkultur mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler inkubiert. Mit 25 ml dieser Vorkultur wurde eine 500 ml LB-Hauptkultur in einem 2000 ml Kolben beimpft und diese bei 30 °C und 130 Upm geschüttelt. Bei einer OD_{600} von 0,6 wurde die Genexpression durch Zugabe von 2 ml einer 0,1 M IPTG-Lösung (Endkonzentration 0,4 mM) induziert. Nach fünfstündiger Genexpression wurden die Zellen geerntet, in 10 ml eines Lysis-Puffers (50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol) resuspendiert und im Ultraschalldesintegrator unter Eiskühlung aufgeschlossen (Beschallungsdauer 4 min, Pulslänge 20 %, Beschallungsintensität 2). Zur Abtrennung der unlöslichen Zellfragmente wurde zentrifugiert (14.000 rpm, 15 min, 4 °C) und so jeweils der Rohextrakt gewonnen.

Die Proteine wurden über an Agarose gebundene Ni-NTA (Nickel-Nitrilotriessigsäure) aufgereinigt, an dessen komplexierte Nickel-Atome die Fusionsproteine mit Hilfe des 6XHis-Tags binden können (Hochuli, 1989, Janknecht *et al.*, 1991). Dazu wurde der Rohextrakt auf mit 2 ml Bettvolumen beladene Ni-NTA-Agarose Säulen (QIAGEN, Hilden) gegeben, die zuvor mit viermal 4 ml Wasch-Puffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) äquilibriert worden waren. Nach dem Spülen der Säulen mit achtmal 4 ml Wasch-Puffer erfolgte die Elution in 4 Fraktionen zu je 2 ml mit einem Elutionspuffer (50 mM NaH_2PO_4 pH 8, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol).

Unmittelbar im Anschluss an die Affinitätschromatographie erfolgte ein Pufferaustausch über PD10-Säulen (Amersham Biosciences Uppsala, Schweden) gegen 20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl gemäß Herstellerangaben, um das bei längerer Lagerung auf Eis zum Ausfall der

Proteine führende Imidazol zu beseitigen. Danach wurde eine Gelfiltration mit einem 20 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl-Puffer bei 4 °C durchgeführt. Bei der Gelfiltration fand ein Äkta UPC 900 / P900-Gerät mit dem Fraktionssammler Fac-920 und einer Superdex 900 prep-grade Säule (alle Geräte Amersham Biosciences Uppsala, Schweden) Verwendung. Das Absorptionsspektrum von Proteinen nach der Gelfiltration zeigte, dass der Cofaktor PLP entweder nicht bei der heterologen Genexpression in *E. coli* durch die Transaminasen akquiriert wurde oder während der Proteinaufreinigung und der Gelfiltration verloren ging. Aus diesem Grund wurde den Proteinen im Anschluss an die Gelfiltration bis zu einer Endkonzentration von 1 mM PLP zugegeben und die Proteinlösung anschließend für zwei Stunden auf Eis inkubiert.

5.3 Abspaltung des N-terminalen His-Tags

Um Proteine ohne Tag kristallisieren zu können, wurde der N-terminale 6XHis-Tag bei Fusionsproteinen der pET28a(+)-Vektor-Expression durch Thrombin abgespalten (Chang, 1985). Dafür wurde das *Thrombin Cleavage Capture Kit* der Firma Novagen (Madison, WI, USA) verwendet. Für einen präparativen Thrombin-Verdau von 20 mg 6XHis-Tag- Fusionsprotein wurden 7,5 U biotinyliertes Thrombin in einem Gesamtvolumen von 10 ml eingesetzt, und dieser Versuchsansatz wurde dann für 2 h bei 20 °C inkubiert. Um das Thrombin anschließend aus dem Ansatz zu entfernen, wurden 200 µl einer 50 % Streptavidin-Sepharose Suspension zum Reaktionsansatz gegeben und das Gemisch für 30 Minuten bei 20 °C rotierend inkubiert. Über den Biotin-Tag des Thrombins wurde dieses an die Streptavidin-Sepharose gebunden und über Zentrifugationsfilter abgetrennt. Die Proteine konnten dann ohne Tag, lediglich mit einem drei Aminosäuren langen N-terminalen Überhang, der sich durch die Thrombin-Restriktion ergab (Sequenz: N-Gly-Ser-His-C), weiterverwendet werden.

5.4 Proteinanalyse

Zur Bestimmung des Molekulargewichts der isolierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen wurde das *NuPAGE*[®] System (Invitrogen, Carlsbad, USA) eingesetzt. Die Auftrennung erfolgte in 10 %igen Bis-Tris-Polyacrylamidgelen, wobei zur Probenvorbereitung ein vom Hersteller mitgelieferter Lithiumdodecylsulfathaltiger (LDS) Ladepuffer verwendet wurde. Als Laufpuffer wurde MOPS-haltiger (3-(N-Morpholino)propansulfonsäure) SDS-Laufpuffer (50 mM MOPS; 50 mM Tris; 3,5 mM SDS; 1 mM EDTA) eingesetzt. Zur Abschätzung des jeweiligen Molekulargewichts wurde der vorgefärbte Standard SeeBlue[™] (14-200 kDa) von Invitrogen verwendet. Die Proteine wurden mit Hilfe eines kolloidalen Coomassie-Farbstoffes (GelCode[®] Blue Stain Reagent, Pierce Chemical Company, Rockford, USA) für eine Stunde direkt angefärbt und der überschüssige Farbstoff durch einstündiges Waschen mit H₂O entfernt. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele in Cellophan (Laboratory Plast Utensils, Hellerup, Dänemark) eingelegt und getrocknet. Absorptionsspektren von Proteinen wurden in einem Wellenlängenbereich von 200 nm – 800 nm mit einem Jasco V-560 UV/VIS Spektrophotometer (Jasco GmbH, Groß-Umstadt) aufgenommen.

5.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in Rohextrakten beruhte auf dem Prinzip der Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺ durch die Proteine und anschließender Komplexierung der Cu¹⁺-Ionen mit Bicinchoninsäure (BCA). Dieser Farbkomplex absorbiert das Licht bei einer Wellenlänge von 562 nm (Smith *et al.*, 1985). Die Analyse wurde nach Angaben des Herstellers mit dem BCA-Kit (Pierce Chemical Company, Rockford, USA) durchgeführt. Als Standard sind 5 µg, 25 µg, 50 µg, 125 µg und 250 µg Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt worden.

5.6 Analyse von Proteinen mittels MALDI-TOF-MS Analyse

Um die Identität der isolierten Proteine zu überprüfen, wurden diese mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie nach Schaffer *et al.* (2001) analysiert. Dazu wurden die mit kolloidalem Coomassie angefärbten Proteinbanden aus den Polyacrylamidgelen (NuPAGE) ausgeschnitten und zweimal mit 750 µl 0,1 M Ammoniumbicarbonat in 30 %igem (w/v) Acetonitril gewaschen. Die so erhaltenen Gelstücke wurden in einer Vakuumzentrifuge komplett getrocknet und anschließend in 6 ml 3 mM Tris/HCl pH 8,8 mit 10 ng/µl Trypsin rehydratisiert. Zum Verdau der Proteine wurden die Proben über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peptide wurden anschließend durch Zusatz von 10 µl 30 % (v/v) Acetonitril und 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure aus dem Gel eluiert. Ein Aliquot von 0,5 µl dieser Lösung wurde mit 0,5 µl Matrixlösung (20 mg α -Cyano-4-hydroxy-zimtsäure in 1 ml 50 % (v/v) Acetonitril, 0,25 % (v/v) Trifluoressigsäure) auf einer Trägerplatte vermischt. Die anschließende Analyse erfolgte mit einem *PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STR*-Massenspektrometer (PerSeptive Biosystems, Langen), wobei zur Kalibrierung der *Sequazyme Peptide Mass Standard Kit* (Applied Bioscience, Weiterstadt) Verwendung fand. Der Vergleich der mono-isotopischen Peptidmassen mit den theoretischen Massen einer Datenbank aller corynebakteriellen Peptide ermöglichte eine Zuordnung der Proteine. Dafür wurde das Programm *Gpmaw* (Version 4.0, Lighthouse Data, Odense, Dänemark) verwendet.

5.7 Bestimmung der Substratspezifität und Aktivität der Transaminasen aus *C. glutamicum*

Sowohl mit den Rohextrakten aus *C. glutamicum* als auch mit aufgereinigten Proteinen wurden Enzymtests zur Bestimmung von Substratspezifitäten und zur Ermittlung biochemischer Parameter durchgeführt (Radmacher *et al.*, 2002). Der Test wurde in 200 mM Tris/HCl pH 8 in einem Gesamtvolumen von 1 ml ausgeführt. Dem Testansatz wurde jeweils der für Transaminierungsreaktionen essentielle Cofaktor Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) in einer Endkonzentration von

0,25 mM hinzugefügt. Bestandteil jedes Tests waren außerdem α -Ketosäuren, die als Aminoakzeptor in den Transaminierungsreaktionen zu der jeweiligen Aminosäure aminiert werden sollten. Die Endkonzentration der Akzeptoren im Test betrug jeweils 4 mM. Als Aminodonoren konnten vier verschiedene L-Aminosäuren fungieren. Dabei lagen die Donoren L-Glutaminsäure, L-Alanin, L-Asparaginsäure und L-Asparagin in einer Endkonzentration von 50 mM im Test vor. Der Rohextrakt oder die aufgereinigten Proteine wurden entweder direkt oder mit Puffer (20 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl) verdünnt dem Testansatz zugegeben. Die Zusammensetzung des Enzymtests ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tab. 3: Enzymtest zur Bestimmung von Transaminaseaktivitäten

Volumen	Lösung	Endkonz. im Test
200 μ l	Tris/HCl pH8 (1 M)	200 mM
100 μ l	Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) (2,5 mM)	0,25 mM
100 μ l	α -Ketosäure (Aminoakzeptor) (40 mM)	4 mM
100 μ l	L-Aminosäure (Aminodonor) (0,5 M)	50 mM
500 μ l – x μ l	Wasser	
x μ l	Rohextrakt/aufgereinigtes Enzym	

Bei dem Test der Enzyme auf L-Histidin-Aktivität wurde der Aminodonor L-Histidinol-phosphat (Taros Chemicals GmbH, Dortmund) in einer Endkonzentration von 10 mM (Stocklösung: 100 mM in H₂O, steril filtriert) verwendet, während die Konzentration des Aminoakzeptors α -Ketoglutarat nicht verändert wurde.

Der Enzymtest wurde bei 30 °C in einem *Thermocycler 5436* der Firma Eppendorf (Hamburg) durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Rohextraktes bzw. des reinen Enzyms gestartet. Durch Zugabe von 30 μ l eines Stoppreagenzes [6,7 % (v/v) Perchlorsäure (70 %), 40 % (v/v) Ethanol (95 %) in Wasser] zu jeweils 50 μ l des Testansatzes wurde der Enzymtest zu definierten Zeitpunkten gestoppt. Um die Proben für den Nachweis der gebildeten Aminosäuren über *reversed phase* HPLC vorzubereiten, wurden 20 μ l eines Neutralisierungspuffers (20 mM Tris/HCl pH 8, 2,3 M Di-Kalium-carbonat)

zugegeben. Der durch die Neutralisierung der Perchlorsäure ausfallende Niederschlag wurde abzentrifugiert (13000 Upm, 10 min) und der Überstand in verschiedenen Verdünnungen in die *reversed phase* HPLC-Analytik eingesetzt.

5.8 Enzymtest zur Bestimmung von Cystein-Desulfurase-Aktivitäten

Enzymtests zur Charakterisierung potentieller Cystein-Desulfurasen wurden nach Zheng *et al.* (1993) mit 0,5 M L-Cystein und 0,25 mM PLP in 20 mM Tris/HCl pH 8 durchgeführt. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte bei Raumtemperatur. Gestartet wurden die Enzymtests durch das Hinzufügen aufgereinigten Enzyms. Das Abstoppen und die Neutralisierung von Testaliquots zu definierten Zeitpunkten erfolgte wie bei den Transaminase-Enzymtests. Das gebildete L-Alanin wurde mittels *reversed phase* HPLC nachgewiesen.

5.9 Bestimmung spezifischer Aktivitäten

Zur Ermittlung der spezifischen Enzym - Aktivitäten wurde der Extrakt oder das isolierte Enzym so weit verdünnt in den Enzymtest eingesetzt, dass die Reaktion über die Inkubationszeit linear verlief. Die spezifische Aktivität U [$\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$] ergibt sich durch Division der Volumenaktivität V [$\mu\text{mol Aminosäure min}^{-1} (\text{ml Enzymtestvolumen})^{-1}$] durch die Proteinkonzentration im Rohextrakt bzw. in den Elutionsfraktionen der aufgereinigten Proteine [$\text{mg Protein ml}^{-1}$].

Zur Berechnung von K_M -Werten, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit pro Substrat (Aminoakzeptor oder Aminodonor) bei mindestens 12 verschiedenen Substratkonzentrationen von 0,05 mM bis 105 mM bestimmt. Dabei wurde die Konzentration des jeweils anderen Substrates (Aminodonor bzw. Aminoakzeptor) konstant gehalten. Die verschiedenen Reaktionsgeschwindigkeiten

wurden gegen die Substratkonzentration aufgetragen und der jeweilige K_M -Wert durch Angleichung an die Michaelis–Menten-Gleichung mit Hilfe des Tabellenkalkulationsprogramms *Microcal Origin* Vers. 6.0 (Microcal Software Inc., Northampton, USA) bestimmt.

6. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

6.1 Proteinkristallisation

Für die Proteinkristallisation wurden die aufgereinigten Proteine mit Hilfe von YM-10 Zentrifugal-Filterröhrchen (Millipore, Billerica, USA) zunächst aufkonzentriert und auf eine Proteinkonzentration von 12 mg ml^{-1} eingestellt. Kristallisations-Screens zur Identifizierung der unvorhersagbaren Bedingungen unter denen die Proteine geordnet präzipitieren und Proteinkristalle bilden, wurden nach dem Evaporationsprinzip („*vapor diffusion*“) durchgeführt (McPherson, 1985). Dies geschah in 96-well Microtiter-Platten mit der „*sitting drop*“-Methode, bei der ein Tropfen Proteinlösung über einer Reservoirlösung sitzt (McPherson, 1999). Für das Screening wurden fünf Kristallisations-Screens eingesetzt, die jeweils aus 96 verschiedenen, steril filtrierten Reagenzien bestehen: „*Crystal Screen HT*“, „*Index HT*“ (beide Hampton Research, Aliso Viejo, USA), „*Expanded Core Screen*“, „*Wizard I + II*“ (beide Emerald Biosystems Inc., Bainbridge Island, USA) und „*PACT Premier Screen*“ (Molecular Dimensions Ltd., Apopka, USA). Diese Reagenzien setzen sich jeweils aus Puffern mit definiertem pH-Wert, Salzen oder Additiven und Präzipitaten, wie z.B. Polyethylenglycol (PEG), zusammen (Chayen *et al.*, 2005). Die 96-well Platten wurden für das Screening nach geeigneten Kristallisationsbedingungen entweder manuell mit der Pipette oder mit Hilfe eines „*Phoenix*“-Roboters (Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA) angesetzt. Dazu wurden zunächst $200 \mu\text{l}$ der Kristallisationsreagenzien ($100 \mu\text{l}$ beim Roboter) in die Reservoirs pipettiert. Pro Reaktionsraum wurde dann $1 \mu\text{l}$

der Proteinlösung (200 nl beim Roboter) auf einem Sockel über dem Reservoir positioniert. Dieser Tropfen wurde dann mit dem gleichen Volumen der jeweiligen Reservoirlösung gemischt, um die Präzipitation der Proteine zu induzieren. Nach Versiegelung der Ansätze durch eine Polypropylen-Folie, die über die 96-well Platten geklebt wurde, konnten die Tropfen mit dem Reservoir bei 20 °C äquillibrieren. Da im jeweiligen Reservoir die gleichen Salze, Puffer und Präzipitate in doppelter Konzentration vorliegen wie im Proteintropfen, kommt es bis zu einem Äquilibrium zu einem Wassertransfer vom Proteintropfen zum Reservoir über Evaporation. Dadurch erhöht sich im Tropfen die Protein- und Präzipitatkonzentration, was bei geeigneter Reagenzienzusammensetzung die Kristallbildung begünstigen kann. Die 96-well Platten wurden direkt nach dem Ansatz und danach einmal pro Tag mit einem Mikroskop auf die Bildung von Kristallen hin überprüft. Der Vorteil der „*sitting drop*“-Evaporationsmethode ist der unkomplizierte Ansatz, der mit Pipette oder Roboter das schnelle Testen von vielen verschiedenen Bedingungen ermöglicht.

Konnten Kristalle mikroskopisch identifiziert werden, wurden die entsprechenden Kristallisationsbedingungen optimiert. Dazu wurden alle Parameter wie z.B. die pH-Werte, der Puffer, der Salztyp, die Salzkonzentration, der Präzipitattyp, die Präzipitatkonzentration oder die Proteinkonzentration systematisch verändert. Weitere Möglichkeiten der Optimierung waren die Zugabe von Reduktionsmitteln wie z. B. Dithiothreitol (DTT) und Tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin-Hydrochlorid (TCEP) (McPherson, 1999). Außerdem wurde versucht, mittels Dehydrierung durch schrittweise Erhöhung der Präzipitatkonzentration die Packungsdichte in den Proteinkristallen zu erhöhen. Bei sich sehr schnell (und dadurch ungeordnet) bildenden Kristallen sollte das Herabsetzen der Inkubationstemperatur auf 4 °C die Kristallbildung verlangsamen. Alle Optimierungen wurden nach der „*hanging drop*“-Methode durchgeführt, die ebenfalls auf dem Evaporationsprinzip beruht (McPherson, 1999). Dabei wurden in einer 24-well Platte der Proteintropfen (in der Regel 2 µl + 2 µl Reservoirlösung) auf einem Deckglas umgekehrt über dem Reservoir (1 ml Volumen) fixiert und der Reaktionsraum mit Silicon abgedichtet.

Die „*hanging drop*“-Methode ermöglichte eine leichte Entnahme der Kristalle für die sich anschließende Röntgenanalyse.

6.2 Sammlung von Röntgenbeugungsmustern und Datenverarbeitung

Erste Röntgenstreuungsexperimente wurden mit einer Mikrofocus-Röntgenquelle am Karolinska Institutet (Stockholm, Schweden) durchgeführt, um zu sehen, inwieweit die optimierten Kristalle die Röntgenstrahlen beugen können. Röntgenbeugungsmuster mit hoher Auflösung wurden an der ID14-2- und der ID23-1-beamline an der European Synchrotron Radiation Facility (ESRF, Grenoble, Frankreich) mit einem ADSC Q4 CCD-Detektor bei einer Wellenlänge von 0,933 Å bzw. 0,939 Å gesammelt. Für die Datensammlung wurden die Kristalle manuell mit kleinen Schlaufen („*cryo loops*“) einzeln aus den Kristallisationsansätzen entnommen und in den Röntgenstrahlengang gesetzt. Dort wurden die Kristalle blitzschnell durch einen stetigen Strom flüssigen Stickstoffs eingefroren. Zuvor wurden die Kristalle jedoch kurz in ihre jeweilige Reservoirlösung getaucht, der 30 % (v/v) Glycerin oder 25 % (v/v) Ethylenglykol zugesetzt wurde. Das Glycerin verhindert die Bildung von Eiskristallen durch den Stickstoffstrom, die die Abbildung der Röntgenbeugungsmuster auf dem Röntgendetektor negativ beeinflussen können. Während der Datensammlung wurde der Kristall um 0,5 ° pro aufgenommenes Röntgenbeugungsbild gedreht, um letztendlich aus diesen zweidimensionalen Bildern eine dreidimensionale Struktur des Proteins berechnen zu können. Die Beugungsdaten wurden zunächst mit dem Programm *MOSFLM* des *CCP4*-Programmpaketes (Collaborative Computational Project, number 4, 1994) ausgewertet. Dabei wurden zunächst die einzelnen Punkte auf den Röntgenbeugungsbildern erkannt und ihre Intensität bestimmt. Nach Berechnung der Abstände aller Punkte zur Röntgenquelle und Integration der Daten skalierte das Programm *SCALA* desselben Programmpaketes alle multiplen Observationen der jeweils gleichen Reflektion, die sich bei der Drehung des Kristalls ergaben, und führte diese zusammen.

6.3 Erstellen von Proteinstrukturmodellen

Wenn bereits Strukturmodelle für ähnliche Proteine erstellt worden sind, ist es einfacher, diese als Vorlage zu verwenden und so das eigene Proteinstrukturmodell zu entwickeln. Für dieses so genannte „*molecular replacement*“ wurde das Programm *MOLREP* (Vagin und Teplyakov, 1997) eingesetzt. Das damit erhaltene erste Strukturgerüst wurde dann mit Hilfe von *REFMAC5* (Murshudov *et al.*, 1997) verfeinert, um schließlich das endgültige Modell mit den Visualisierungsprogrammen *O* (Jones *et al.*, 1991) oder *COOT* (Emsley und Cowtan, 2004) zu entwickeln. Die Identifizierung von Wassermolekülen am oder im Strukturmodell wurde durch das Programm *wARP/ARP* (Cohen *et al.*, 2004) unterstützt. Mit *PROCHECK* (Laskowski *et al.*, 1993) wurde die Stereochemie im Modell (wie z. B. die Zulässigkeit der Peptidbindungswinkel) überprüft. Abbildungen des Strukturmodells wurden mit dem Programm *PyMOL* (DeLano, 2002) erstellt.

Für eine *in silico*-Generierung von Proteinstrukturmodellen anhand von Strukturen homologer Proteine und ohne röntgenkristallographische Analysen, wurde das online verfügbare Programm *SWISS-Model* (Biozentrum der Universität Basel und Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Basel; <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) genutzt.

III. ERGEBNISSE

1. Identifizierung und Charakterisierung von Transaminasen aus *C. glutamicum*

Um die zwanzig Gene, die bei der genomweiten Suche nach potentiellen Transaminasen identifiziert wurden (McHardy *et al.*, 2003), untersuchen zu können, wurden diese Gene zunächst aus *C. glutamicum* isoliert und kloniert. Nach heterologer Expression dieser zwanzig Gene in *E. coli* wurden die entsprechenden Proteine jeweils über Affinitätschromatographie aufgereinigt und die Identität jedes Proteins über MALDI-TOF-Massenspektrometrie bestätigt. Die sich anschließenden *in vitro*-Enzymtests mit den isolierten potentiellen Transaminasen sollten dazu dienen, die auf Basis von Sequenzvergleichen, genomischen Kontextanalysen oder phänotypischer Charakterisierung von Deletionsmutanten vermutete Funktion der jeweiligen Enzyme zu verifizieren und zu quantifizieren.

1.1 Charakterisierung der Transaminase IlvE für die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren

Über Komplementationsexperimente mit einem für die verzweigtkettigen Aminosäuren L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin auxotrophen *C. glutamicum*-Stamm war die auch als Transaminase B bezeichnete Aminotransferase IlvE identifiziert worden (Radmacher *et al.*, 2002). Um das Substratspektrum und die jeweiligen spezifischen Aktivitäten von IlvE zu bestimmen, wurden *in vitro* Enzymtests mit diesem aufgereinigtem Enzym durchgeführt. Dabei wurden nicht nur die drei Vorstufen der verzweigtkettigen Aminosäuren, sondern auch 2-Keto-buttersäure, ein Intermediat des L-Isoleucinbiosyntheseweges, als

Aminoakzeptor in die Enzymtests eingesetzt. Dieses Substrat kann durch eine transaminaseabhängige Reaktion zu α -Aminobuttersäure umgesetzt werden, das bei der mikrobiellen Produktion von L-Isoleucin als Nebenprodukt gebildet wird (Wilhelm *et al.*, 1989). Für eine mögliche Verbesserung durch Verminderung der α -Aminobuttersäurebildung von L-Isoleucin-produktionsstämmen war es deshalb interessant zu erfahren, ob IlvE und vielleicht auch andere Transaminasen 2-Keto-buttersäure zu α -Aminobuttersäure umsetzen können. Des Weiteren wurde eine Enzymaktivität von IlvE mit den Vorstufen von L-Phenylalanin und L-Tyrosin (Phenylpyruvat bzw. 4-Hydroxy-phenylpyruvat) getestet, da bekannt ist, dass IlvE in *E. coli* an der Synthese dieser beiden aromatischen Aminosäuren beteiligt ist (Gelfand und Steinberg, 1977). Als Aminodonor wurde L-Glutaminsäure eingesetzt, da die Transaminase B ausschließlich diese Aminosäure als Aminogruppenquelle nutzen kann (Christen und Metzler, 1985; Hutson, 2001). Die Ergebnisse für die Bestimmung der Substratspezifitäten und spezifischen Aktivitäten von IlvE sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tab. 4: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten von IlvE mit verschiedenen Substraten in Abhängigkeit des Aminodonors L-Glutaminsäure

Substrat (Produkt)	spezifische Aktivität U * [$\mu\text{mol Aminosäure min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$]
3-Methyl-2-keto-valeriansäure (L-Leu)	13,9
2-Keto-iso-capronsäure (L-Ile)	9,6
2-Keto-iso-valeriansäure (L-Val)	13,7
Phenylpyruvat (L-Phe)	10,7
4-Hydroxy-phenylpyruvat (L-Tyr)	2,4
2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	4,3

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Wie erwartet, katalysiert IlvE die Synthese der drei verzweigtkettigen Aminosäuren. Dabei waren die spezifischen Aktivitäten für die Bildung von

L-Leucin und L-Valin mit $13,9$ bzw. $13,7 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gleich hoch und lagen über der von L-Isoleucin ($9,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Nur etwa halb so groß war die Aktivität für die Umsetzung des im Vergleich zu diesen drei Vorstufen sehr ähnlichen Substrates 2-Keto-buttersäure zu α -Aminobuttersäure ($4,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Überraschend hoch hingegen war die spezifische Aktivität für L-Phenylalaninbildung ($10,7 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) durch IlvE, die sogar die von L-Isoleucin übertraf. Die vergleichsweise geringe Aktivität mit der L-Tyrosinvorstufe 4-Hydroxy-phenylpyruvat ($2,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) ist auf die Hydroxylgruppe am aromatischen Ring des Substrates zurückzuführen.

Um zu überprüfen, inwieweit es sich bei der Transaminierung von 2-Keto-buttersäure zu α -Aminobuttersäure um eine Nebenreaktion von IlvE handelt, wurde die Substrataffinität (K_M -Wert) des Enzyms zu den Vorstufen der drei verzweigtkettigen Aminosäuren und 2-Keto-buttersäure in Abhängigkeit des Aminodonors L-Glutaminsäure bestimmt (Tabelle 5).

Tab. 5: K_M -Werte verschiedener Aminosäurevorstufen für IlvE in Abhängigkeit des Aminodonors L-Glutaminsäure

Substrate (gebildete Aminosäure)	K_M-Werte [mM]
2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	0,15
3-Methyl-2-keto-valeriansäure (L-Ile)	0,23
2-Keto-iso-valeriansäure (L-Val)	0,63
2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	1,42

Die Transaminase IlvE besitzt die höchste Affinität zu den strukturell sehr ähnlichen Vorstufen von L-Leucin und L-Isoleucin ($0,15$ mM bzw. $0,23$ mM). Etwa dreimal so hoch ist der K_M -Wert für die L-Valinvorstufe 2-Keto-iso-valeriansäure ($0,63$ mM). Der im Vergleich zu diesen Konzentrationen hohe K_M -Wert für 2-Keto-buttersäure von $1,42$ mM bestätigt, dass es sich bei der

Umsetzung zu α -Aminobuttersäure nur um eine Nebenreaktion von IlvE handelt.

In *E. coli* sind noch andere Transaminasen wie z. B. TyrB und AvtA, für die es im Genom von *C. glutamicum* keine homologen Gene gibt, an der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren beteiligt (Jensen und Calhoun, 1981). Um nun zu überprüfen, inwieweit noch andere Enzyme in *C. glutamicum* an der Transaminierung der Vorstufen von L-Leucin, L-Isoleucin und L-Valin *in vivo* beteiligt sind, wurde der Aminosäurebedarf einer *ilvE*-Deletionsmutante untersucht. Dazu wurde das Wachstum des *C. glutamicum* 13032 Wildtyps und der *C. glutamicum* 13032 $\Delta ilvE$ -Mutante auf CGXII-Minimalmedium Agarplatten verglichen, denen die verzweigtkettigen Aminosäuren in verschiedenen Kombinationen zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt worden waren (Abbildung 3).

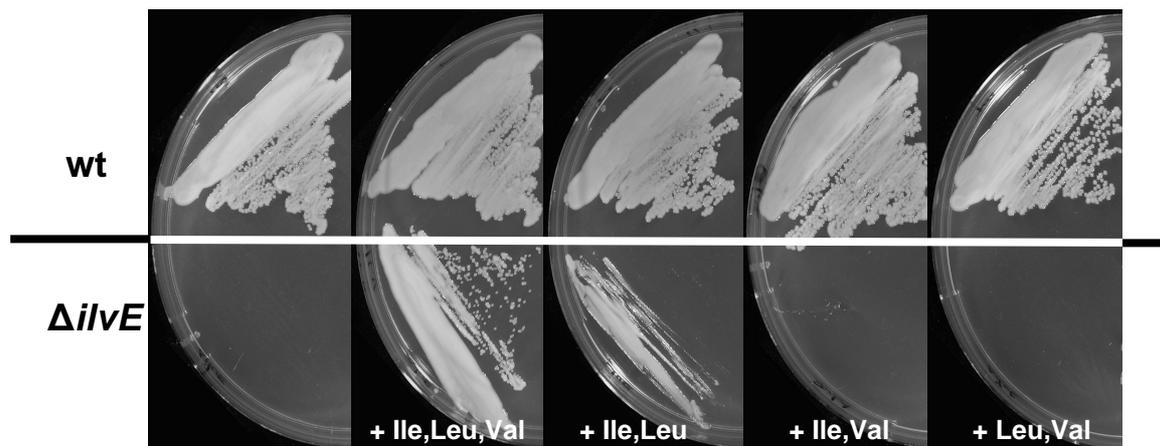


Abb. 3: Bedarf verzweigtkettiger Aminosäuren von *C. glutamicum* 13032 $\Delta ilvE$ (unten) im Vergleich zu *C. glutamicum* 13032 wt (oben) auf CGXII-Minimalmedium
(Supplementierte Aminosäuren wie angegeben, jeweilige Konzentration 1 mM)

Wie die Supplementationsversuche auf Minimalmedium zeigten, ist die *ilvE*-Deletionsmutante auf die Zugabe von L-Leucin und L-Isoleucin angewiesen, um auf dem Minimalsalzmedium CGXII wachsen zu können. Die Transaminase IlvE scheint somit *in vivo* das einzige Enzym zu sein, das den Transfer einer Aminogruppe zu den entsprechenden Vorstufen katalysieren kann. Da die Mutante in Abwesenheit von L-Valin im Vergleich zum *C. glutamicum* 13032

Wildtyp immer noch wachsen kann, ist anzunehmen, dass noch mindestens eine weitere Transaminase an der L-Valinsynthese *in vivo* beteiligt ist.

Um einen Eindruck davon zu bekommen, ob *in vivo* neben IlvE noch andere Transaminasen in Abhängigkeit anderer Aminodonoren an der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren beteiligt sind, wurden Aktivitätstests in Rohextrakten durchgeführt. Dabei wurde die Aktivität in den Rohextrakten des *C. glutamicum* 13032 Wildtyps und der *C. glutamicum* 13032 $\Delta ilvE$ -Mutante für die Bildung von L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin und auch α -Aminobuttersäure verglichen. In die Enzymtests wurde nicht nur L-Glutaminsäure, sondern auch L-Alanin als Aminodonor eingesetzt, da bereits in Rohextrakten von *C. glutamicum* der Nachweis einer Transaminase C-Aktivität gelungen ist. Bei solch einer Aktivität wird L-Alanin als Aminodonor für die Umsetzung von 2-Keto-iso-valeriansäure zu L-Valin genutzt (Leyval *et al.*, 2003). Diese Transaminaseaktivität konnte aber bisher noch keinem Protein oder Gen zugeordnet werden. Neben L-Glutaminsäure und L-Alanin können in Bakterien auch L-Glutamin und L-Asparaginsäure als Aminodonoren in Transaminierungsreaktionen fungieren (Campbell, 1956).

Pro cytoplasmatischem Extrakt wurden sechzehn Enzymtests durchgeführt, weil jeder Aminodonor jeweils mit den vier Aminoakzeptoren 3-Methyl-2-keto-valeriansäure, 2-Keto-iso-capronsäure, 2-Keto-iso-valeriansäure und 2-Keto-buttersäure getestet werden sollte. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Mit den Aminodonoren L-Glutamin und L-Asparaginsäure konnten in beiden Extrakten keinerlei Enzymaktivitäten nachgewiesen werden. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass IlvE das einzige Enzym mit Transaminase B-Aktivität in *C. glutamicum* ist, da es zu keiner Bildung verzweigtkettiger Aminosäuren im Extrakt der *ilvE*-Deletionsmutante kam. Wie der Vergleich zeigte, wurde lediglich α -Aminobuttersäure neben IlvE von mindestens einem weiteren Enzym aus 2-Keto-buttersäure mit L-Glutaminsäure als Aminodonor gebildet. Mit Rohextrakten beider Stämme kam es hingegen zur Synthese von L-Isoleucin, L-Valin und α -Aminobuttersäure, wenn L-Alanin als Aminodonor zur Verfügung stand. Die durch Leyval *et al.* (2003) beschriebene Existenz von mindestens einem Enzym mit Transaminase C-

Aktivität wird also durch dieses Ergebnis bestätigt. Lediglich eine L-Leucinsynthese ließ sich in keinem der Extrakte nachweisen. Die Aktivität der L-Alanin-abhängigen L-Isoleucinsynthese blieb weit hinter derjenigen der L-Glutamat-abhängigen zurück. Wie die Agarplattentests gezeigt haben, reicht diese Aktivität auch nicht aus, um den Verlust der *IlvE*-Aktivität für die L-Isoleucinsynthese zu komplementieren.

Tab. 6: Transaminaseaktivitäten im Rohextrakt von *C. glutamicum* 13032 Wildtyp und *C. glutamicum* 13032 $\Delta ilvE$

Amino-donor	Aminoakzeptor / (gebildete Aminosäure)	<i>C. glutamicum</i> 13032 Wildtyp spez. Aktivität [mU mg⁻¹]	<i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta ilvE$ spez. Aktivität [mU mg⁻¹]
L-Glutamin-säure	2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	44	< 1
	3-Methyl-2-keto- valeriansäure, (L-Ile)	38	< 1
	2-Keto-iso-valerian- säure, (L-Val)	24	< 1
	2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	61	18
L-Alanin	2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	< 1	< 1
	3-Methyl-2-keto- valeriansäure, (L-Ile)	5	3
	2-Keto-iso-valerian- säure, (L-Val)	19	16
	2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	49	26

Die Messungen wurden zweimal mit einer Abweichung von < 12 % durchgeführt

Obwohl eine Transaminaseaktivität mit L-Glutamin und L-Asparaginsäure nicht nachgewiesen werden konnte, kann eine Verwendung dieser Aminodonoren in Transaminierungsreaktionen grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Grund dafür ist, dass über die Expressionslevel der einzelnen Gene, die an der Biosynthese verzweigtkettiger Aminosäuren beteiligt sind, nichts bekannt ist.

1.2 Identifizierung der Alanin-Valin-Transaminase AvtA

Ziel der weiteren Untersuchungen war es, die Transaminase zu identifizieren, die für die L-Alanin-abhängige Bildung von L-Isoleucin und L-Valin im *C. glutamicum* Rohextrakt verantwortlich ist. Allerdings führten weder Datenbankanalysen mit *BLASTP* noch der direkte Vergleich aller zwanzig putativen Transaminasen aus *C. glutamicum* mit bekannten Transaminase C-Sequenzen aus *E. coli* (Wang *et al.*, 1987a) oder *S. typhimurium* (Berg *et al.*, 1983) zur Identifikation einer solchen Transaminase. Da diese Enzyme mit Transaminase C-Aktivität keinem Biosyntheseweg direkt zugeordnet werden können, konnte auch die Analyse des genomischen Kontextes mit *ERGO* keine Hinweise liefern. Aus diesem Grunde wurden alle zwanzig potentiellen Transaminasen in Abhängigkeit von L-Alanin auf die Bildung der verzweigtkettigen Aminosäuren und α -Aminobuttersäure mit den entsprechenden α -Ketosäuren getestet. Im Zuge dieser Untersuchung konnte als einziges Genprodukt das von *NCgl2510* als Transaminase identifiziert werden, das mit L-Alanin- und nicht mit L-Glutaminsäure die verzweigtkettigen Aminosäuren und α -Aminobuttersäure synthetisiert. Zur Charakterisierung dieses Enzyms wurden zunächst die spezifischen Aktivitäten mit isoliertem Enzym bestimmt (Tabelle 7).

Tab. 7: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten der durch *NCgl2510* kodierten Transaminase AvtA

Aminodonor	Substrat (Produkt)	spezifische Aktivität* [U mg ⁻¹]
L-Alanin	2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	0,9
	3-Methyl-2-keto-valeriansäure (L-Ile)	3,7
	2-Keto-iso-valeriansäure (L-Val)	18,2
	2-Keto-butyrat (α -Aminobuttersäure)	27,5

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Auffällig sind die sehr hohen spezifischen Aktivitäten für die L-Valin- und die α -Aminobuttersäure-Bildung (18,7 bzw. 27,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$). Außerdem konnten geringe Aktivitäten für die Synthese von L-Leucin und L-Isoleucin ermittelt werden (0,9 bzw. 3,7 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$). Die L-Alanin-abhängige L-Leucinbildung ist wahrscheinlich zu gering, als dass sie im Rohextrakt von *C. glutamicum* hätte nachgewiesen werden können. Sowohl die Aktivität mit der L-Leucin- als auch mit der L-Isoleucinvorstufe reicht *in vivo* aber nicht aus, um die Auxotrophie der *ilvE*-Deletionsmutante zu komplementieren.

Aufgrund der α -Ketosäure- und Aminodonorspezifität und der hohen spezifischen Aktivität für die L-Valin Synthese ist zu vermuten, dass es sich bei dem *NCgl2510*-Genprodukt um die Transaminase handelt, die der im Rahmen dieser Arbeit gemessenen und von Leyval *et al.* (2003) beschriebenen Transaminase C-Aktivität im Rohextrakt von *C. glutamicum* entspricht. Deshalb wird dieses Enzym im Folgenden als AvtA (Alanin-Valin-Transaminase) oder Transaminase C bezeichnet. Eine auf Sequenzvergleichen beruhende Annotation (*ERGO*) sagte für AvtA ursprünglich eine Funktion als L-Aspartat-Transaminase voraus. Eine Aktivität mit der Vorstufe Oxalacetat konnte in Abhängigkeit keines Aminodonors in den Enzymtests beobachtet werden. Dies unterstreicht die Schwierigkeit, Transaminasen alleine aufgrund von Sequenzhomologien und struktureller Ähnlichkeit zu bereits bekannten Enzymen eine Funktion zuzuordnen (Jensen, 1976).

Verglichen mit den K_M -Werten von *IlvE* hat AvtA eine eher geringe Substrataffinität zu den Vorstufen der drei verzweigtkettigen Aminosäuren (Tabelle 8). Den niedrigsten K_M -Wert bezüglich dieser drei Substrate hat AvtA für 2-Keto-iso-valeriansäure (2,51 mM), für dessen Umsetzung zu L-Valin die Transaminase C auch die höchste Aktivität zeigt (18,7 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$). Weitaus niedriger ist die Affinität zur L-Leucin-Vorstufe 2-Keto-iso-capronsäure (16,84 mM). Wahrscheinlich aus diesem Grunde setzt AvtA dieses Substrat nur mit einer spezifischen Aktivität von 0,9 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$ um. Schon bei einer 2-Keto-buttersäurekonzentration von 0,6 mM ist die halbmaximale Umsatzgeschwindigkeit zu α -Aminobuttersäure erreicht.

Tab. 8: K_M -Werte verschiedener Aminosäurevorstufen für AvtA in Abhängigkeit des Aminodonors L-Alanin

Substrat (gebildete Aminosäure)	K_M-Werte [mM]
2-Keto-iso-capronsäure (L-Leucin)	16,84
3-Methyl-2-keto-valeriansäure (L-Isoleucin)	3,52
2-Keto-iso-valeriansäure (L-Valin)	2,51
2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	0,60

Um zu überprüfen, ob AvtA auch *in vivo* die einzige Transaminase ist, die L-Alanin-abhängig zur Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren beiträgt, wurden Enzymtests mit cytoplasmatischem Extrakt einer *avtA*-Deletionsmutante durchgeführt und die ermittelten spezifischen Aktivitäten mit denen des Extrakts des Wildtyps verglichen (Tabelle 9). Wie die Ergebnisse zeigen, ist in dieser Mutante keine Bildung der drei Aminosäuren mehr möglich, wenn lediglich L-Alanin als Aminodonor zur Verfügung steht. Im Rohextrakt konnte hingegen immer noch α -Aminobuttersäure nachgewiesen werden. Es gibt also noch mindestens eine weitere Transaminase, die eine Aminogruppe von L-Alanin auf 2-Keto-buttersäure transferieren kann. Die L-Glutaminsäure-abhängige Synthese der drei Aminosäuren bleibt durch die Deletion von *avtA* unverändert. Auch *in vivo* kann AvtA diesen Aminodonor also nicht nutzen. Eine in *E. coli* durch Transposonmutagenese konstruierte *avtA-ilvE*-Doppelmutante ist im Gegensatz zu einer *ilvE*-Einzelmutante auxotroph für L-Valin (Whalen und Berg, 1982).

Tab. 9: Transaminaseaktivitäten im Rohextrakt von *C. glutamicum* 13032 Wildtyp und *C. glutamicum* 13032 $\Delta avtA$

Amino-donor	Aminoakzeptor / (gebildete Aminosäure)	<i>C. glutamicum</i> 13032 Wildtyp spez. Aktivität [mU]	<i>C. glutamicum</i> 13032 $\Delta avtA$ spez. Aktivität [mU]
L-Glutamin-säure	2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	44	45
	3-Methyl-2-keto- valeriansäure, (L-Ile)	38	35
	2-Keto-iso-valerian- säure, (L-Val)	24	21
	2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	61	55
L-Alanin	2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	< 1	< 1
	3-Methyl-2-keto- valeriansäure, (L-Ile)	5	< 1
	2-Keto-iso-valerian- säure, (L-Val)	19	< 1
	2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	49	35

Die Messungen wurden zweimal mit einer Abweichung von < 12 % durchgeführt

Um zu überprüfen, inwieweit sich das Substratspektrum dieser beiden Transaminasen auch in *C. glutamicum in vivo* überschneidet, wurde das Wachstum einer $\Delta avtA$ -Mutante, einer $\Delta ilvE$ -Mutante und einer $\Delta avtA \Delta ilvE$ -Doppelmutante mit dem *C. glutamicum* 13032 Wildtyp auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten verglichen (Abbildung 4).

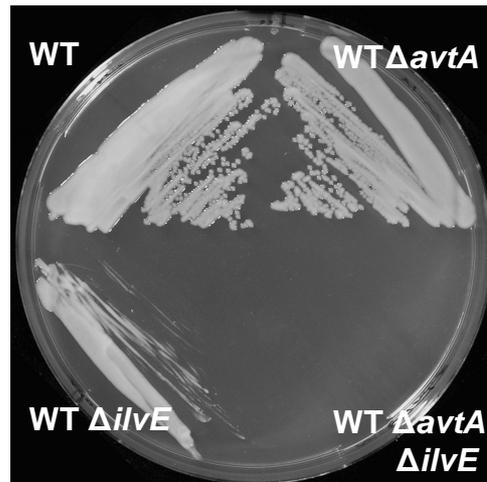


Abb. 4: L-Valinbedarf von *C. glutamicum* wt, *C. glutamicum* $\Delta avtA$, *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ und *C. glutamicum* $\Delta avtA \Delta ilvE$ auf CGXII-Minimalmedium + 1 mM L-Leu, L-Ile

Die *C. glutamicum* $\Delta avtA$ -Mutante zeigte auf Minimalmedium keine Auxotrophie für L-Leucin, L-Isoleucin (nicht gezeigt) und L-Valin. Eine $\Delta avtA \Delta ilvE$ -Doppelmutante von *C. glutamicum* konnte hingegen nicht mehr ohne L-Valin-Supplementation wachsen. Die AvtA-Aktivität macht also das Wachstum der $\Delta ilvE$ -Mutante auf Minimalmedium ohne L-Valin möglich.

1.3 Identifizierung der Transaminase AroT für die Synthese aromatischer Aminosäuren

Die Inaktivierung von *NCgl0215* im Hintergrund einer *ilvE*-Inaktivierungsmutante von *C. glutamicum* resultierte überraschenderweise in einer Auxotrophie für L-Leucin, L-Isoleucin und L-Phenylalanin (McHardy *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde wurde dieses Enzym von den Autoren als Pat-Transaminase (*Phenylalanine-amino**transferase*) bezeichnet. In der ERGO-Datenbank ist diese Transaminase aufgrund hoher Sequenzhomologie zu HisC aus *E. coli* (Mizuguchi *et al.*, 2003) als L-Histidinol-phosphat-Transaminase annotiert. Zur Erfassung des Substratspektrums und zur Bestimmung von spezifischen Aktivitäten wurden deshalb wiederum Enzymtests mit aufgereinigtem Protein durchgeführt (Tabelle 10).

Tab. 10: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten von AroT/Pat (Aminodonor L-Glutaminsäure bzw. L-Histidinol-phosphat)

Substrat (Produkt)	spezifische Aktivität* [U mg ⁻¹]
2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	1,3
2-Keto-iso-valeriansäure, (L-Val)	< 0,1
α -Keto-glutarsäure (L-Glu) (mit L-Histidinol-phosphat)	---
Phenylpyruvat (L-Phe)	13,6
4-Hydroxy-phenylpyruvat (L-Tyr)	8,8
2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	1,1

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Im Rahmen der Untersuchungen erwies sich Pat als L-Glutaminsäure-abhängige Transaminase, für die keine Aktivität mit L-Histidinol-phosphat nachweisbar war. Mit diesem Enzym konnten die höchsten spezifischen Aktivitäten für die Synthese von L-Phenylalanin und L-Tyrosin bestimmt werden (13,6 bzw. 8,8 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$), was die aus den Inaktivierungsexperimenten geschlussfolgerte Beteiligung an der *in vivo*-Synthese von L-Phenylalanin bestätigt. In *E. coli* ist die Transaminase TyrB neben IlvE an der Synthese von L-Phenylalanin und L-Tyrosin beteiligt (Powell und Morrison 1978b). Ein direkter Vergleich der Aminosäuresequenzen von Pat und TyrB aus *E. coli* zeigte allerdings keinerlei Homologien zwischen beiden Proteinen. Da den aromatischen und verzweigtkettigen Aminosäuren ein hydrophober Charakter gemein ist, lag es nahe, Pat auch auf eine Aktivität mit den Vorstufen der verzweigtkettigen Aminosäuren und auch 2-Keto-buttersäure zu testen. Mit 3-Methyl-2-keto-valeriansäure (L-Ile) war überhaupt keine und mit 2-Keto-iso-valeriansäure (L-Val) nur eine sehr geringe Enzymaktivität von $< 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ messbar. Für die L-Leucinvorstufe 2-Keto-iso-capronsäure hingegen konnte eine im Vergleich dazu sehr hohe spezifische Aktivität von $1,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bestimmt werden. Ähnlich hoch ist die spezifische Aktivität für die Bildung des Nebenproduktes α -Aminobutter-

säure ($1,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Die Transaminase TyrB aus *E. coli* besitzt ebenfalls für L-Leucin als einzige der drei verzweigt-kettigen Aminosäuren eine Spezifität (Powell und Morrison, 1978a). In *E. coli* kann die TyrB-Aktivität bezüglich des L-Leucin-Bedarfs sogar den Verlust der *IlvE*-Aktivität *in vivo* komplementieren, so dass dieser Stamm nur eine L-Isoleucin-Auxotrophie zeigt (Gelfand und Steinberg, 1977). Wie die *in vivo* Experimente mit der *ilvE*-Deletionsmutante (phänotypische Charakterisierung auf Agarplatten, Rohextrakt-Enzymtests) zeigten, ist dies in *C. glutamicum* nicht der Fall (s. Seite 40 bzw. 42). Da das Substratspektrum von Pat nicht nur auf Phenylalanin beschränkt ist, und die Bezeichnung TyrB auch nicht den Charakter dieses Enzyms beschreibt, wird Pat im Folgenden treffender als AroT („*Aromatic amino acid transaminase*“) bezeichnet.

Um zu überprüfen, inwieweit der Verlust der AroT-Aktivität alleine oder im Hintergrund einer *ilvE*-Deletionsmutante auch zu anderen Phänotypen als der beobachteten L-Phenylalanin-Auxotrophie führt, wurde das *aroT*-Gen in den entsprechenden Stämmen deletiert und das Wachstum auf CGXII-Minimalmedium-Agarplatten mit dem *C. glutamicum* 13032 Wildtyp verglichen. Während die *C. glutamicum* ΔaroT -Mutante zum Vergleichstamm keinerlei Phänotyp zeigte, konnte die $\Delta\text{aroT}\text{-}\Delta\text{ilvE}$ -Doppelmutante nur durch Supplementation von L-Phenylalanin wie der Wildtyp wachsen (Daten nicht gezeigt). Da eine L-Tyrosin-Zufuhr für eine Kultivierung der Doppelmutante nicht nötig war, muss es in *C. glutamicum* noch mindestens eine weitere Transaminase mit L-Tyrosin-Spezifität geben.

1.4 Identifizierung der L-Alanin-Transaminase AlaT mit breitem Substratspektrum

Die drei Transaminasen *IlvE*, *AvtA* und *AroT*, die bisher im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden sind, transaminieren 2-Keto-buttersäure. Die Aktivitätsmessungen in Rohextrakten machten deutlich, dass es neben *IlvE* und *AvtA* noch weitere Enzyme geben muss, die *in vivo* α -Aminobuttersäure

synthetisieren können. Da eine Reduzierung dieses bei der mikrobiellen L-Isoleucinsynthese anfallenden Nebenproduktes von großem Interesse ist (Morbach *et al.*, 1996), wurden alle 20 Proteine mit allen 4 möglichen Aminodonoren auf eine Aktivität mit 2-Keto-buttersäure getestet. Es zeigte sich, dass neben IlvE, AvtA und AroT noch für fünf weitere Enzyme eine Nebenaktivität mit diesem Substrat nachgewiesen werden konnte (Tabelle 11).

Tab. 11: Transaminasen neben IlvE, AvtA und AroT, die *in vitro* 2-Keto-buttersäure zu α -Aminobuttersäure transaminieren können

Enzym	Aminodonor	spezifische Aktivität * [U mg ⁻¹]
ArgD	L-Glutaminsäure	< 0,1
	L-Alanin	< 0,1
	L-Asparaginsäure	< 0,1
	L-Glutamin	< 0,1
NCgl0780	L-Glutaminsäure	0,2
NCgl0462	L-Glutaminsäure	< 0,1
	L-Alanin	< 0,1
	L-Glutamin	< 0,1
NCgl2020	L-Glutaminsäure	0,2
	L-Alanin	< 0,1
	L-Asparaginsäure	< 0,1
	L-Glutamin	< 0,1
NCgl2747	L-Glutaminsäure	5,4
	L-Alanin	3,0
	L-Asparaginsäure	2,3
	L-Glutamin	0,7

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Die Erkenntnis, dass acht verschiedene Enzyme, inklusive der beiden Transaminasen IlvE und AvtA mit L-Isoleucin-Spezifität, auch *in vivo* an der α -Aminobuttersäurebildung beteiligt sein könnten, macht eine Reduktion dieser Substanz in *C. glutamicum* L-Isoleucinproduktionsstämmen durch Deletion einzelner Transaminase-Gene sehr unwahrscheinlich. Allerdings fiel das durch NCgl2747 kodierte Enzym auf, das mit sehr hoher Aktivität und allen vier

verschiedenen Aminodonoren 2-Keto-buttersäure zu α -Aminobuttersäure transaminieren kann. Da auch in diesem Fall die Suche nach Sequenzhomologien zu Enzymen mit ähnlicher Aktivität erfolglos blieb, wurde das Gen im *C. glutamicum* 13032 deletiert. Wie sich nach 48 stündiger Inkubation zeigte, wuchs die Deletionsmutante schlechter als der Wildtyp (Abbildung 5). Da die Zugabe von 1 mM L-Alanin jedoch ausreichte, damit die Deletionsmutante wieder wie der Wildtyp wachsen konnte (Abbildung 5), ist davon auszugehen, dass das durch *NCgl2747* kodierte Enzym an der L-Alaninsynthese in *C. glutamicum* beteiligt ist.

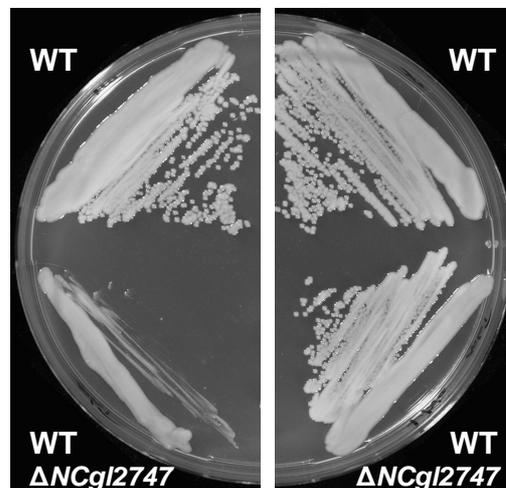


Abb. 5: Wachstumsvergleich *C. glutamicum* Wildtyp und *C. glutamicum* Δ *NCgl2747* auf CGXII-Minimalmedium ohne (links) und mit (rechts) 1 mM L-Alanin

Bei Enzymtests mit aufgereinigtem NCgl2747-Protein zeigte sich, dass dieses Enzym ein sehr breites Substratspektrum hat. Sowohl L-Glutaminsäure ($26,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$), L-Asparaginsäure ($1,8 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) als auch α -Aminobuttersäure ($8,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) können durch das Enzym als Aminodonoren für die Aminierung der L-Alaninvorstufe Pyruvat genutzt werden. Die spezifische Aktivität von $26,6 \text{ U}$ für die Synthese von L-Alanin mit L-Glutaminsäure ist der höchste Wert, der überhaupt mit einer Transaminase aus *C. glutamicum* in *in vitro*-Enzymtests ermittelt werden konnte. Aufgrund dieser Eigenschaften wird diese Transaminase im Folgenden als AlaT („Alanin-Transaminase“) bezeichnet. Eine prokaryotische L-Alanin-

Transaminase wurde in Rohextrakten von *E. coli* zwar nachgewiesen, das verantwortliche Gen oder das Transaminase-Protein selber aber nie näher charakterisiert (Wang *et al.*, 1987b)

Neben AlaT konnten nur mit der Transaminase AvtA L-Alanin-abhängige Enzymaktivitäten $> 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ bestimmt werden. Um zu klären, wie sich der Verlust der AvtA-Aktivität im Hintergrund der *C. glutamicum* ΔalaT -Mutante auswirkt, wurde das *avtA*-Gen in diesem Stamm deletiert. Diese Transaminase-Doppelmutante konnte nicht mehr auf Agarplatten mit CGXII-Minimalmedium ohne Supplementation mit 1 mM L-Alanin wachsen. Wie diese L-Alanin-auxotrophe Mutante zeigt, sind in *C. glutamicum* also nur AlaT und AvtA an der *in vivo* Synthese von L-Alanin beteiligt.

1.5 Identifizierung der L-Histidinol-Phosphat-Transaminase HisC

Um dem Genprodukt von *NCgl2020*, das im Zusammenhang mit der Suche nach Transaminasen mit α -Aminobuttersäure-Spezifität identifiziert wurde (s. Tab. 11) eine Funktion zuzuordnen, wurde zunächst dessen genomischer Kontext untersucht. Das Gen *NCgl2020* ist in einem Operon mit Genen des L-Histidin-biosyntheseweges organisiert (Abbildung 6).

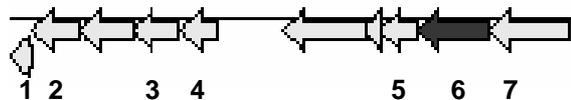


Abb. 6: L-Histidin-Operon in *C. glutamicum*
 (1: *hisI*, PRPP-hydrolase, PRAMP-cyclohydrolase; 2: *hisF*, IGP-synthase UE1;
 3: *hisA*, 5'-PRFAR-Isomerase; 4: *hisH*, IGP-synthase UE2; 5: *hisB*, IAP-
 Dehydratase 6: ***NCgl2020***; 7: *hisD*, HOL-dehydrogenase)

Außer *hisG*, das für die *N*'-5'-phosphoribosyl-ATP-transferase kodiert, sind alle für die Synthese von L-Histidin nötigen Gene in diesem Operon lokalisiert. Ein ähnliches Operon ist auch im Genom von *E. coli* und *S. typhimurium* beschrieben worden (Alifano *et al.*, 1996). Auf dem Chromosom dieser beiden Enterobakterien liegt das Gen *hisC* für die L-Histidinol-phosphat-Transaminase

HisC auch zwischen *hisB* und *hisD*. Aus diesem Grunde wurde *NCgl2020* als Transaminase mit HisC-Funktion annotiert. Eine Insertionsmutante zur Inaktivierung dieses Gens war L-Histidin-auxotroph (McHardy *et al.*, 2003), was aber auch durchaus auf *downstream*-Effekte auf die stromabwärts gelegenen *his*-Gene durch die Insertion des Plasmids zurückzuführen sein könnte. Aus diesem Grund wurde eine *NCgl2020*-Deletionsmutante konstruiert und deren Wachstum mit dem *C. glutamicum* 13032-Wildtyp auf Agarplatten mit Minimalmedium verglichen. Diese Δ *NCgl2020*-Mutante zeigte wie die Insertionsmutante eine L-Histidin-Auxotrophie (Daten nicht gezeigt). Deshalb wird das Gen *NCgl2020* im Folgenden als *hisC* bezeichnet. HisC ist also *in vivo* die einzige Transaminase, die die reversible Umsetzung von 3-(Imidazol-4-yl)-keto-propylphosphat und L-Glutaminsäure zu L-Histidinol-phosphat und 2-Keto-glutarsäure katalysiert. Dies bestätigten die Enzymtests mit AroT, die eine Beteiligung dieser Transaminase an der L-Histidin-biosynthese ausschlossen (s. Tab. 10).

Für HisC aus *Bacillus subtilis* konnten Enzymaktivitäten mit den Vorstufen von L-Phenylalanin und L-Tyrosin (Weigent und Nester, 1976) gemessen werden. Außerdem wurde für das gleiche Enzym aus *Zymomonas mobilis* eine Substratspezifität für L-Leucin beschrieben (Gu *et al.*, 1996). In diesen Experimenten erwies sich HisC stets als strikt L-Glutaminsäure-abhängiges Enzym, obwohl auch mit den anderen drei möglichen Aminodonoren im Rahmen der Suche nach α -Aminobuttersäure-spezifischen Transaminasen Aktivitäten mit HisC gemessen werden konnten (s. Tab. 11). Um zu überprüfen, inwieweit auch HisC aus *C. glutamicum* über ein breites Substratspektrum verfügt, wurden Enzymtests mit aufgereinigtem Protein durchgeführt (Tabelle 12).

Tab. 12: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten von HisC (Aminodonor L-Glutaminsäure bzw. L-Histidinol-phosphat)

Substrat (Produkt)	spezifische Aktivität* [U mg ⁻¹]
α -Keto-glutarsäure (L-Glu) (mit L-Histidinol-phosphat)	2,8
2-Keto-iso-capronsäure (L-Leu)	1,4
3-Methyl-2-keto-valeriansäure, (L-Ile)	---
2-Keto-iso-valeriansäure, (L-Val)	---
Phenylpyruvat (L-Phe)	1,5
4-Hydroxy-phenylpyruvat (L-Tyr)	0,5
2-Keto-buttersäure (α -Aminobuttersäure)	0,2

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Die höchste spezifische Aktivität war mit L-Histidinol-phosphat bestimmbar (2,8 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹). Die von Weigent und Nester (1976) für HisC aus *B. subtilis* beschriebene Aktivität mit L-Phenylpyruvat und 4-Hydroxy-phenylpyruvat war ebenfalls nachweisbar (1,5 bzw. 0,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹). Wie HisC aus *Z. mobilis* setzte HisC aus *C. glutamicum* 2-Keto-iso-capronsäure zu L-Leucin um. Die Transaminierung der sehr ähnlichen Vorstufen für L-Iso-leucin und L-Valin konnte HisC interessanterweise nicht katalysieren. Dies ist umso erstaunlicher, wenn man berücksichtigt, dass das Substrat L-Histidinol-phosphat hingegen als sehr viel größeres und geladenes Molekül von HisC umgesetzt werden kann.

Für eine nähere Charakterisierung dieses Enzyms wurden die Michaelis-Menten-Konstanten (K_M -Werte) und die molekularen Aktivitäten (k_{cat} -Werte) für einige Substrate bestimmt (Tabelle 13).

Für HisC wurde der jeweilige K_M -Wert für die Substrate L-Histidinol-phosphat, L-Leucin und L-Phenylalanin berechnet. Bei L-Tyrosin scheiterte der experimentelle Versuch zur Ermittlung des K_M -wertes an der begrenzten Löslichkeit der Aminosäure im Enzymtestpuffer.

Tab. 13: Katalytische Parameter für HisC mit einigen Substraten

Substrat	K_M [mM]	k_{cat} [s ⁻¹]	k_{cat}/K_M [M ⁻¹ s ⁻¹]
L-Histidinol-phosphat	0,89 ± 0,05	1,18	1330
L-Leucin	94 ± 6,31	3,27	35
L-Phenylalanin	107 ± 11,35	4,21	39

Für die Berechnung der Wechselzahlen für L-Leucin und L-Phenylalanin wurden die nach der Michaelis-Menten-Gleichung mit *Microcal Origin* ermittelten Substrataffinitäten und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten zugrunde gelegt, die aufgrund der nicht ausreichenden Substratlöslichkeit experimentell nicht belegt werden konnten. Aus diesem Grunde ergaben sich für diese beiden Substrate höhere Wechselzahlen (3,27 bzw. 4,21 s⁻¹) als für L-Histidinol-phosphat (1,18 s⁻¹). Die größere Affinität des Enzyms zu diesem Substrat (0,89 mM) gegenüber 94 mM und 107 mM für L-Leucin bzw. L-Phenylalanin bewirkte wiederum, dass die katalytische Effizienz von HisC mit L-Histidinol-phosphat (1330 M⁻¹ s⁻¹) etwa vierzigmal höher war als mit den beiden Aminosäuren (35 bzw. 39 M⁻¹ s⁻¹). Diese Ergebnisse zeigten, dass es sich bei der Umsetzung von L-Leucin und L-Phenylalanin mit HisC nur um Nebenaktivitäten dieser Transaminase handelt, während L-Histidinol-phosphat das Hauptsubstrat ist.

1.6 Charakterisierung weiterer Transaminasen aus *C. glutamicum*

1.6.1 Identifizierung der L-Asparaginsäure-Transaminase AspC

Im Folgenden sollte die L-Asparaginsäure-Transaminase identifiziert werden, die für die Synthese L-Asparaginsäure-abgeleiteter L-Aminosäuren interessant ist (Kalinowski *et al.*, 2003). Solche strikt L-Glutaminsäure-abhängigen Enzyme werden, basierend auf ihrer strukturellen Ähnlichkeit, nach Mehta *et al.* (1993) zu den Klasse I - Transaminasen gezählt. Neun der zwanzig als Transaminasen

annotierten Enzyme aus *C. glutamicum* gehören zu dieser Gruppe. Aufgrund der Instabilität von Oxalacetat in Lösung wurde stets die Rückreaktion getestet, das heißt die Aktivität mit den Substraten L-Asparaginsäure und α -Keto-glutarsäure. Mit diesem Enzymtest wurde schließlich das durch *NCgl0237* kodierte Protein als L-Asparaginsäuretransaminase AspC identifiziert. Die spezifische Aktivität betrug $10,7 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$.

Wie sich herausstellte, wurde das Gen *aspC* bereits in einem japanischen Patent zur L-Lysinproduktion zwar geschützt (Araki *et al.*, 1998), Daten hierzu wurden aber nie veröffentlicht. Eine für AspC aus *E. coli* beschriebene Aktivität mit den Vorstufen der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin (Hayashi *et al.*, 1993) konnte für AspC aus *C. glutamicum* nicht nachgewiesen werden.

1.6.2 Charakterisierung an der L-Lysin-Synthese beteiligter Transaminasen

Die Transaminase DapC, aktiv in der L-Lysinsynthese, wurde durch Aktivitätsbestimmungen in Rohextrakten charakterisiert (Hartmann *et al.*, 2003). Das Gen *dapC* ist im Genom von *C. glutamicum* zusammen mit anderen Genen des L-Lysinbiosyntheseweges ganz ähnlich wie im eingehend beschriebenen L-Lysin-Operon aus *Bordetella pertussis* organisiert (Fuchs *et al.*, 2000). Das Gen für die Transaminase ArgD, verantwortlich für die L-Argininsynthese, wurde über die Position im L-Arginin-Operon entdeckt (Sakanyan *et al.*, 1996). Diese beiden Enzyme aminieren die strukturell verwandten Substrate *N*-Succinyl-L,L- α,ϵ -diaminopimelinsäure und *N*-Acetylornithin. In *E. coli* sind beide Enzyme mit beiden Substraten aktiv, was die Annotation der entsprechenden Gene erschwerte (Cox and Wang, 2001; Ledwidge and Blanchard, 1999). Trotz Inaktivierung beider Gene in *C. glutamicum* konnte die entsprechende Mutante ohne L-Lysin-Supplementation wachsen (Hartmann *et al.*, 2003), was auf eine weitere Transaminase mit Aktivität in der Synthese dieser Aminosäure hindeutet. Aufgrund der Vermutung von Herrn Dr. Tauch (Universität Bielefeld), dass die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase (HemL) auch *N*-Succinyl-L,L- α,ϵ -diamino-pimelinsäure als Substrat nutzen

könnte, wurden entsprechende Enzymtests durchgeführt. Der Hidden-Markov-Modell-Analyse zufolge verfügt HemL ebenfalls über ein Transaminase-Motiv (McHardy *et al.*, 2003). Bei den Tests mit isoliertem DapC, ArgD und HemL-Proteinen wurden *N*-Succinyl-L,L- α,ϵ -diaminopimelinsäure und *N*-Acetylorithin als Aminodonoren und α -Keto-glutarsäure als Aminoakzeptor eingesetzt (Tabelle 14).

Tab. 14: Substratspezifitäten und spezifische Aktivitäten von DapC, ArgD und HemL

Enzym	Substrat	
	<i>N</i> -Succinyl-L,L- α,ϵ -diaminopimelinsäure	<i>N</i> -Acetylorithin
DapC	1,2	< 0,1
ArgD	< 0,1	6,4
HemL	< 0,1	< 0,1

Die spezifischen Aktivitäten sind in $\mu\text{mol Aminosäure min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ angegeben
 Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

Die *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten bestätigen die DapC und ArgD zugewiesene Rolle im Metabolismus von *C. glutamicum* und zeigen auch, dass beide Enzyme das jeweils andere Substrat nutzen können. Auch HemL kann beide Substrate mit einer kaum nachweisbaren Aktivität ($< 0,1 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) nutzen. Inwieweit HemL auch *in vivo* an der Synthese von L-Lysin beteiligt ist, müssen zukünftige Studien zeigen.

1.7 Cystein-Desulfurasen

Bei der Affinitätschromatographie zur Proteinaufreinigung erschienen die Genprodukte von *NCgl1022*, *NCgl1184* und *NCgl1500* auf den *StrepTactin*[®]-Sepharose[®]-Affinitätsäulen gelb-grün. Die durch die anderen 17 Gene kodierten Proteine waren hingegen stets farblos. Ein Vergleich der Absorptionsspektren dieser drei Proteine mit dem Absorptionsspektrum anderer Transaminasen und

ungebundenem Cofaktor PLP zeigte, dass die Farbigkeit auf PLP beruht. Während keine der anderen Transaminasen nach der Affinitätschromatographie PLP im aktiven Zentrum gebunden hat, scheint die prosthetische Gruppe bei diesen drei Proteinen besonders gut im aktiven Zentrum stabilisiert zu sein und die gelb-grüne Farbe zu bewirken.

Von den zwanzig potentiellen Transaminasen aus *C. glutamicum* sind diese drei PLP-abhängigen Enzyme die einzigen Vertreter der Klasse IV-Transaminasen (McHardy *et al.*, 2003). Zu dieser Gruppe gehören vor allem Phosphoserin-Transaminasen und die nicht zu den Transaminasen zählenden Cystein-Desulfurasen (Mehta *et al.*, 1993). Die Identität der Phosphoserin-Transaminase SerC aus *C. glutamicum* scheint geklärt, da eine Transposon-Insertion im Promotorbereich des als Transaminase annotierten Gens *NCgl0794* eine L-Serin-Auxotrophie bewirkte (Peters-Wendisch *et al.*, 2005). Die Analyse des genomischen Kontextes der Gene für die drei gelb-grünen Proteine deutete auf eine mögliche Verbindung zu FeS-Komplexen hin. Das Gen *NCgl1022* scheint in einem Operon mit dem Gen für die NAD⁺-Pyrophosphorylase in der Nicotinamid-Synthese organisiert, und *NCgl1184* ist wahrscheinlich Bestandteil einer Transkriptionseinheit, deren Produkte am Elektronentransport beteiligt sein könnten. Am direkten Aufbau von FeS-Clustern könnte das durch *NCgl1500* kodierte Protein beteiligt sein, da *NCgl1500* in einem Operon mit *iscU* lokalisiert zu sein scheint. Das durch *iscU* (*iron-sulfur cluster*) kodierte FeS-Bindeprotein interagiert direkt mit einer Cystein-Desulfurase und ist für die Synthese solcher FeS-Cluster essentiell (Hoff *et al.*, 2000, Zheng *et al.*, 1993). Cystein-Desulfurasen [E.C. 2.8.1.7] als PLP-abhängige Enzyme spielen beim Aufbau solcher Komplexe eine wichtige Rolle, da bei der durch diese Enzyme katalysierten L-Cystein-Spaltung Schwefel in Form eines Enzym-Cysteinyl-persulfid-Intermediats entsteht. Dieser Schwefel wird dann für den Aufbau von FeS-Clustern oder zur Synthese schwefelhaltiger prosthetischer Gruppen, wie z. B. Thiaminpyrophosphat und Liponsäure genutzt (Mihara und Esaki, 2002).

Um die drei Proteine auf eine Cystein-Desulfurase Aktivität hin zu überprüfen, wurden Enzymtests durchgeführt. Neben der Entwicklung eines stark

schwefeligen Geruchs konnte eine L-Alaninbildung durch *NCgl1022* und *NCgl1500* beobachtet werden, was ihre Identität als Cystein-Desulfurase bestätigt. Die anhand des entstehenden L-Alanins berechneten spezifischen Aktivitäten betragen 0,04 bzw. 0,35 $\mu\text{mol L-Alanin min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$. Das Gen *NCgl1500* wird im Folgenden als *sufS* bezeichnet. Obwohl die Funktion von *NCgl1184* zunächst offen bleibt, da das Genprodukt keinerlei Aktivität in den Cystein-Desulfurase-Tests zeigte, ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich auch bei diesem Enzym nicht um eine Transaminase handelt.

1.8 Potentielle Transaminasen mit ungeklärter Aktivität

Weder Sequenzvergleiche noch Analysen des genomischen Kontextes konnten Hinweise auf die Aufgabe der durch *NCgl0780*, *NCgl2355* und *NCgl2491* kodierten Proteine im Metabolismus von *C. glutamicum* liefern. Aus diesem Grunde sollten zunächst alle drei Gene jeweils einzeln im *C. glutamicum*-Wildtyp deletiert werden.

Während es im Falle der Gene *NCgl2355* und *NCgl2491* gelang, die entsprechenden Deletionsmutanten zu konstruieren, war die Deletion von *NCgl0780* erfolglos. Für etwa 200 Klone mit vermuteter Deletion dieses Gens konnte mit Hilfe der PCR nur jeweils die Wildtypsituation festgestellt werden. Schließlich gelang aber die Inaktivierung von *NCgl0780* durch Insertion von *pk18mob-0780* in den *NCgl0780*-Genort. Für die beiden Deletionsmutanten *C. glutamicum* $\Delta 2355$ und *C. glutamicum* $\Delta 2491$ war auf Minimalmedium-Agarplatten kein phänotypischer Unterschied sichtbar, während die Insertionsmutante *C. glutamicum* 13032::*pk18mob-0780* gar nicht mehr auf Minimalmedium wachsen konnte. Erst nach einer 48-stündigen CgXII-Flüssigmedium-Vorkultur wurde ein geringer Wachstumsunterschied zum Wildtyp für *C. glutamicum* $\Delta 2355$ und *C. glutamicum* $\Delta 2491$ in einer CgXII-Hauptkultur deutlich. Für keine der drei Mutanten war der Wachstumsdefekt durch Zugabe der 20 proteinogenen Aminosäuren oder D-Alanin und D-Glutaminsäure supplementierbar. Die Funktion dieser drei Gene bleibt somit weiterhin offen.

2. Aufklärung der dreidimensionalen Struktur der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC

Sowohl die Transaminase für die aromatischen Aminosäuren AroT, als auch die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC konnten in Abhängigkeit des Aminodonors L-Glutaminsäure in Enzymtests die Bildung von L-Leucin katalysieren. Während für AroT zusätzlich eine kaum nachweisbare Aktivität mit der L-Valinvorstufe 2-Keto-iso-valeriansäure nachgewiesen werden konnte, erwies sich HisC in Bezug auf die Synthese verzweigtkettiger Aminosäuren als strikt L-Leucin-spezifisch. Um einen Einblick in die Substraterkennung und den Reaktionsmechanismus dieser beiden Transaminasen gewinnen zu können, sollten Strukturmodelle mit Hilfe röntgenkristallographischer Untersuchungen erstellt werden. Dazu mussten die Proteine zunächst in konzentrierter und hochreiner Form präpariert werden. Sich daran anschließende Kristallisationsexperimente und röntgenkristallographische Analysen sollten die nötigen Informationen zur Berechnung der Elektronendichtekarten liefern, auf deren Basis dann Proteinstrukturmodelle berechnet werden können. Anhand dieser Modelle sollten Aminosäuren im aktiven Zentrum identifiziert werden, deren Mutation Aufschluss über ihre Bedeutung für die Katalyse geben soll.

2.1 Heterologe Genexpression und Proteinpräparation für die Kristallisationsexperimente

Für die heterologe Expression in *E. coli* wurden zunächst die Stämme *E. coli* DH5 α MCR pJMaroT und *E. coli* DH5 α MCR pJMhisC eingesetzt, die auch schon im Rahmen der Funktionsaufklärung aller Transaminasen aus *C. glutamicum* Verwendung fanden. Da sich aber der nicht abspaltbare Strep-Tag II[®], wie noch eingehend beschrieben werden wird, bei den Kristallisations- und Röntgenbeugungsexperimenten als störend erwies, wurden noch andere AroT- und HisC-Fusionsproteine synthetisiert. Dazu wurden die Vektoren

pET28a(+) und pET22b(+) genutzt. Die Expression von *aroT* und *hisC* mit dem pET28a(+)-Vektor resultierte in Fusionsproteinen mit einem N-terminalen 6XHis-Tag. Zwischen Protein und Tag war außerdem eine Thrombin-Erkennungsstelle lokalisiert, die eine Abspaltung des Tags im Anschluss an die Proteinaufreinigung ermöglichte. Fusionsproteine, die das Ergebnis heterologer Genexpression vom pET22b(+)-Vektor waren, verfügten über einen nicht-abspaltbaren C-terminalen 6XHis-Tag. Ein Schema zum direkten Vergleich der jeweils drei verschiedenen Fusionsproteine ist in Abbildung 7 dargestellt.

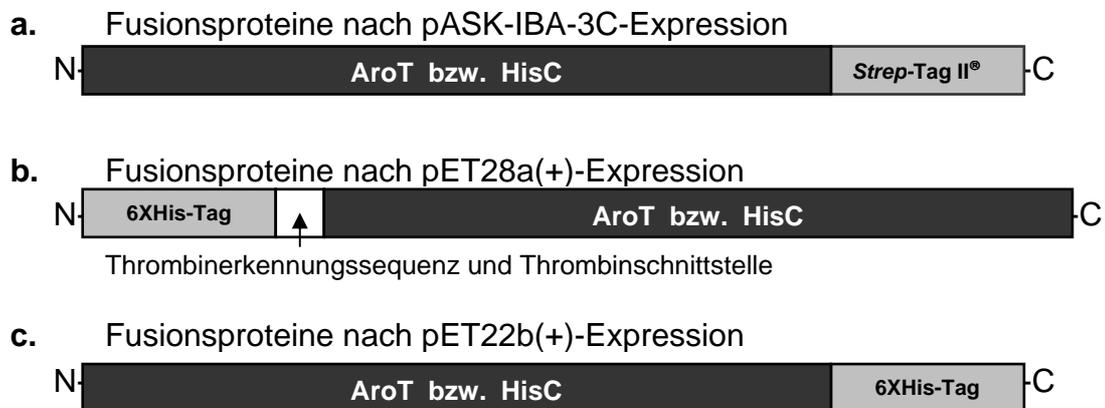


Abb. 7: Schematische Darstellung von AroT- und HisC-Fusionsproteinen nach heterologer Expression durch die Vektoren (a) pASK-IBA-3C, (b) pET28a(+) und (c) pET22b(+) in *E. coli*

Die N-terminalen 6XHis-Tags der AroT- und HisC-Fusionsproteine, die aus der Expression mit dem pET28a(+)-Vektor resultierten, wurden durch Thrombin abgespalten. Dafür wurde zunächst sowohl die optimale Thrombinkonzentration als auch die geringstmögliche Inkubationszeit mit diesem Enzym bestimmt, um die Entstehung unerwünschter Spaltprodukte zu minimieren. Die Kontrolle der verschiedenen Ansätze zur Optimierung der 6XHis-Tag-Proteolyse erfolgte über SDS-PAGEs (Abbildung 8). Getestet wurden Thrombinkonzentrationen von 0,005 U – 0,04 U pro 10 µg eingesetztem Protein und eine Inkubationszeit von 2 und 18 Stunden (Spuren 1-5 bzw. Spuren 7-11). Der Vergleich mit den Negativkontrollen ohne Thrombin (Spuren 1 und 7, Pfeile I) zeigte, dass kleinere Spaltprodukte entstanden, deren Größe jeweils der Proteingröße ohne

6XHis-Tag entsprach (Spuren 2–6 und 8–11, Pfeile II). Beide Fusionsproteine exponieren die Thrombinerkennungssequenz also so, dass der 6XHis-Tag abgespalten werden kann.

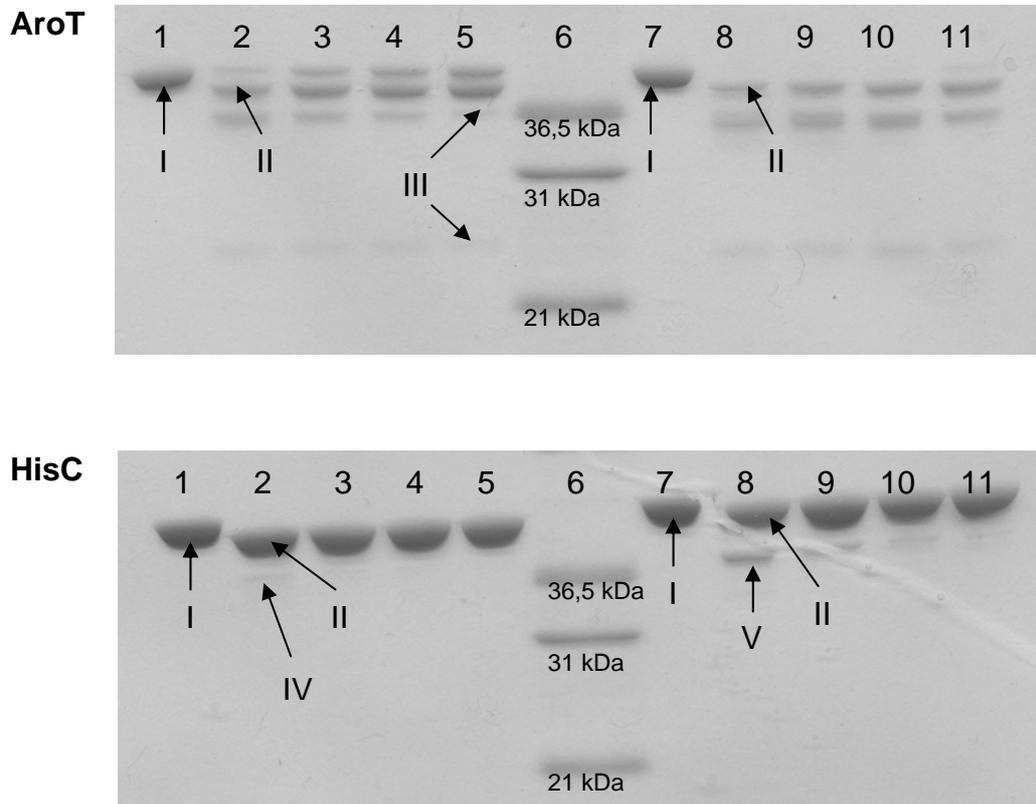


Abb. 8: 6XHis-Tag-Abspaltung von den AroT- und HisC-Fusionsproteinen durch Thrombin
 (1: 2h, Negativkontrolle; 2: 2h, 0,04 U; 3: 2h, 0,02 U; 4: 2h, 0,01 U; 5: 2h, 0,005 U; 6: Standard; 7: 18h, Negativkontrolle; 8: 18h, 0,04 U; 9: 18h, 0,02 U; 10: 18h, 0,01 U; 11: 18h, 0,005 U)

Allerdings kam es sowohl für AroT als auch für HisC zu einer Akkumulation von Nebenprodukten, obwohl eine Analyse beider Proteinsequenzen vor der Klonierung in den pET28a(+)-Vektor die Existenz keiner internen Thrombinschnittstellen angezeigt hatte. Die Nebenprodukte sind wahrscheinlich auf suboptimale Thrombinschnittstellen innerhalb der Proteine zurückzuführen.

Bei der Transaminase AroT war eine große Menge dieser kleineren Spaltprodukte (Spur 5, Pfeile III) schon nach zwei Stunden bei der geringsten eingesetzten Thrombinmenge von 0,005 U nachweisbar. Nach 18 Stunden

Inkubation und bei Thrombinmengen zwischen 0,01–0,04 U konnte eine vollständige Spaltung des Ausgangsproteins beobachtet werden. Dabei wurden etwa 50 % des Gesamtproteins zu den kleineren Spaltprodukten weiter abgebaut (Spuren 8–10). Das Gleiche galt auch für ein etwa 38 kDa großes Nebenprodukt, das bei der Inkubation des 6XHis-Tag-Fusionsproteins von HisC mit Thrombin (Spur 2, Pfeil IV; Spur 8 Pfeil V) entstand. Allerdings wurde dieses Produkt wesentlich langsamer gebildet und war erst nach zwei Stunden Inkubation bei der höchsten eingesetzten Thrombinmenge von 0,04 U sichtbar (Spur 2, Pfeil IV). Schon bei der geringsten Thrombinmenge im Testansatz war der 6XHis-Tag nach zwei Stunden komplett abgespalten. Nach 18 Stunden Inkubation hingegen konnte das 38 kDa große, unerwünschte Abbauprodukt unabhängig von der eingesetzten Thrombinmenge stets auf der SDS-PAGE nachgewiesen werden (Spur 8–11, Pfeil V). Auf Basis der Ergebnisse dieser Experimente wurde der N-terminale 6XHis-Tag von HisC-Fusionsproteinen in einem präparativen Ansatz mit $0,5 \text{ U Thrombin (mg Protein)}^{-1}$, ausgehend von $0,005 \text{ U Thrombin (10 } \mu\text{g Protein)}^{-1}$, in zwei Stunden abgespalten.

Nach der Beseitigung des biotinylierten Thrombins aus der Proteinlösung mit Hilfe einer 50 % Streptavidin-Sepharose Suspension konnten die HisC-Proteine ohne 6XHis-Tag weiterverwendet werden. Die HisC-Proteine verfügten lediglich über einen drei Aminosäuren langen N-terminalen Überhang, der sich durch die Thrombin-katalysierte Proteinspaltung ergab (Sequenz: N-Gly-Ser-His-C). Ausgehend von einer 500 ml-Kultur für die Genexpression konnten je nach Stamm und Protein 22 bis 31 mg hochreines Protein für die Kristallisationstests isoliert und präpariert werden.

2.2 Proteinkristallisation von AroT und HisC

Da die Aufnahme von Röntgenbeugungsmustern von Proteinen in Lösung aufgrund zufälliger Orientierung der Proteinmoleküle im dreidimensionalen Raum nicht möglich ist, müssen diese zunächst stets geordnet und exakt gleich ausgerichtet werden. Dies geschieht während der Kristallisation, bei der die Proteinlöslichkeit in einer hoch gesättigten Proteinlösung durch die Zugabe von Reagenzien stark herabgesetzt wird. Reagenzien, z. B. Salze oder Präzipitate wie Polyethylenglykol (PEG), stören die Protein-Lösungsmittel-Interaktionen und favorisieren thermodynamisch Protein-Protein-Wechselwirkungen. Weitere Konzentrierung der Proteinlösung durch langsame Evaporation führt schließlich zur Bildung von Kristallen, in denen die Proteine absolut regelmäßig und gleich ausgerichtet in einem dreidimensionalen Gitter angeordnet sind. Da die für die Kristallisation eines bestimmten Proteins benötigten idealen Bedingungen, wie z. B. die Reagenzienzusammensetzung, die Temperatur oder die Proteinkonzentration, nicht vorhersagbar sind, müssen diese stets empirisch gefunden werden.

In einer systematischen Suche wurden für die AroT- und HisC-Proteine jeweils etwa 500 verschiedene Kristallisationsbedingungen nach dem Evaporationsprinzip getestet (McPherson, 1985). Dies geschah in 96-well Microtiter-Platten, die von Hand oder mittels Roboter und kommerziell erhältlichen Kristallisations-Screens beschickt wurden. Dabei wurden für AroT zwei und für HisC vier Bedingungen identifiziert, unter denen sich innerhalb von 2 bis 4 Tagen Mikrokristalle bilden konnten. Allerdings gelang die Kristallisation nicht in Anwesenheit des Substrates L-Leucin. Durch Variation vieler Parameter, wie z. B. des Puffer-pH-Wertes, des Salz-Typs, der Salzkonzentration oder der Proteinkonzentration, wurde im Folgenden versucht, die Kristallbildung hin zu größeren Kristallen zu optimieren. Eine weitere Möglichkeit der Kristallisationsmodifizierung war die Zugabe von Reduktionsmitteln oder die Variation der Kristallisationsmethode durch erhöhte Dehydrierung bereits entstandener Proteinkristalle. Je ein Beispiel für optimierte Proteinkristalle von AroT und HisC ist in den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

Abb. 9:

Uneinheitliche AroT-Kristalle im polarisierten Licht unter dem Mikroskop (50x-Vergrößerung)

(27 % PEG 10.000; 0,2 M Na-acetat; 0,1 M Na-dimethylarsensäure pH 6,7; Proteinkonzentration: 48 mg ml⁻¹; AroT-*Strep*-Tag II[®]-Fusionsprotein)

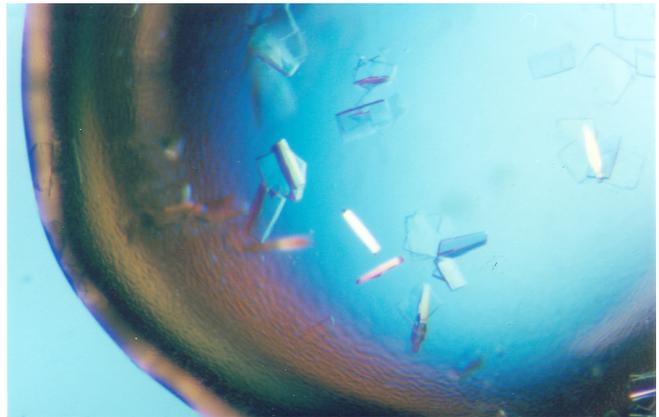
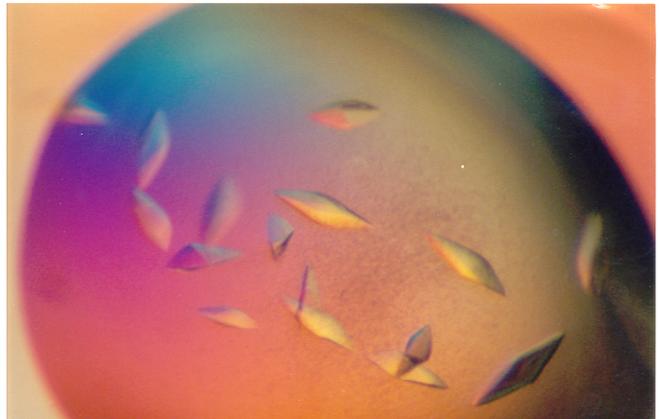


Abb. 10:

Dreieckig-bipyramidale HisC-Kristalle (0,3 x 0,05 x 0,05 mm) im polarisierten Licht unter dem Mikroskop (50x-Vergr.)

(9 % PEG 6.000; 1 M Li-acetat; 0,1 M 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES) pH 5,8 – 6,2; Proteinkonzentration: 12 mg ml⁻¹; HisC-*Strep*-Tag II[®]-Fusionsprotein)



Zunächst gestaltete sich die Kristalloptimierung als sehr schwierig, da es mit keinem der AroT- und HisC-Kristalle in ersten Tests mit einer Mikrofocus-Röntgenquelle am Karolinska Institutet (Stockholm, Schweden) zur Streuung von Röntgenstrahlen kam. Letztendlich gelang es aber, drei Kristallisationsbedingungen für HisC so weit zu verbessern, dass anhand der Kristalle die für die Berechnung einer Elektronendichtekarte nötigen Röntgenbeugungsdaten gesammelt werden konnten. Die dafür verwendeten Bedingungen sind in Tabelle 15 zusammengefasst.

Tab. 15: Erfolgreiche Kristallisationsbedingungen für HisC-Proteine

Fusionsprotein	Kristallisationsbedingungen	Kristall
A HisC- <i>Strep</i> -Tag II®	9 % PEG 6.000; 1 M Li-acetat ; 0,1 M MES pH 5,8 – 6,2; Proteinkonzentration: 12 mg ml ⁻¹ 20 °C; 1-3 Tage	dreieckig- bipyramidal 0,3 x 0,05 x 0,05 mm (s. Abb. 10)
B HisC (kein Tag)	1,7 M (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,2 M Li ₂ SO ₄ ; 0,1 M Tris pH 7; Proteinkonzentration: 12 mg ml ⁻¹ ; 20 °C; 1-7 Tage	stabförmig 0,3 x 0,05 x 0,05 mm
C HisC (kein Tag)	0,4 M NaH ₂ PO ₄ ; 1,6 M K ₂ HPO ₄ ; 0,2 M NaCl; 0,1 M Imidazol pH 6; Proteinkonzentration: 12 mg ml ⁻¹ ; 20 °C; 1-7 Tage	stabförmig 0,3 x 0,05 x 0,05 mm

2.3 Röntgenbeugung, Datenauswertung und Modellierung der Strukturmodelle

Die Röntgenbeugungsdaten für einen Kristall, der unter Kristallisationsbedingungen A gezüchtet wurde, wurden an der Beamline ID14-2 ($\lambda = 0,933 \text{ \AA}$) der *European Synchrotron Radiation Facility* (ESRF, Grenoble, Frankreich) gesammelt (Tabelle 15). Die kristallographische Raumgruppe („*space group*“), die die Symmetrie der kleinsten Elementarzelle („*asymmetric unit cell*“) im Proteinkristall am besten beschrieb, war die Raumgruppe P3₂21 (trigonale oder rhombohedrale Geometrie). Die Abmessungen („*cell dimensions*“) dieser kleinsten Kristalluntereinheit im Kristall betragen $a = b = 102,3 \text{ \AA}$, $c = 140,1 \text{ \AA}$ mit $\gamma = 120^\circ$. Insgesamt 202 Röntgenbeugungsbilder wurden mit einem Drehwinkel von jeweils $0,5^\circ$ gesammelt. Daraus resultierte ein Datensatz mit insgesamt 266.411 Reflektionen („*reflections observed*“), von denen 43.528 Reflektionen einzigartig („*reflections unique*“) waren, d. h. aufgrund der Symmetrie der Raumgruppe nicht mehrfach registriert wurden. Die Vollständigkeit („*completeness*“) des Datensatzes mit 99,8 % gibt die Zahl der

gemessenen Reflektionen im Verhältnis zu den erwarteten Reflektionen bei einer bestimmten Auflösung in Prozent an. Der R_{merge} -Faktor ist ein Maß für die Übereinstimmung aller identischen Reflektionen, die in den unterschiedlichen Röntgenbeugungsbildern bestimmt werden konnten. Je kleiner der Wert, umso größer die Übereinstimmung der identischen Reflektionen. Ein Proteinstrukturmodell auf Basis der Daten wurde mittels „*molecular replacement*“ berechnet (Drenth, 2006). Dafür wurde das Modell der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *Thermotoga maritima* (PDB-Eintrag 1UU1; Fernandez *et al.*, 2004) als Vorlage verwendet, das 34 % Aminosäuresequenzidentität mit HisC aus *C. glutamicum* hat. Die Maße der Elementarzelle, zusammen mit der Kenntnis des Wassergehalts des Kristalls (53,2 %), ließen auf das Vorliegen eines Dimers in der kleinsten Kristalluntereinheit schließen. Die Analyse der Elektronendichtekarte zeigte allerdings keinerlei Elektronendichte für den Cofaktor PLP im aktiven Zentrum. Aus diesem Grund wird das Strukturmodell für dieses HisC-Apoprotein im Folgenden als Apo-HisC-Struktur bezeichnet. Insgesamt gesehen war die Elektronendichtekarte von so guter Qualität, dass die Aminosäuresequenz von HisC direkt hinein modelliert werden konnte. Am C-terminalen Ende beider Monomere wurde noch eine Elektronendichte identifiziert, in die sieben Aminosäurereste des *Strep*-Tag II[®] hinein „passten“. Die Position des *Strep*-Tag II[®] im Raum war für beide Monomere allerdings nicht identisch. Außerdem waren die sieben Aminosäuren Teil der Konformation zwischen den Monomeren benachbarter Kristalluntereinheiten und somit an der Packung der Proteine im Kristall beteiligt. Insgesamt 238 Wassermoleküle waren proteinassoziiert. Das fertige Modell für Apo-HisC hatte einen R_{cryst} -Wert von 21,5 %, der ein statistisches Maß für die Übereinstimmung des kristallographischen Modells mit den Röntgenbeugungsdaten darstellt. Je geringer dieser Wert, umso besser das Modell.

Mit Kristallen, die unter den Bedingungen B und C gezüchtet wurden, konnte jeweils ein Datensatz an der ID23-1 beamline am ESRF ($\lambda = 0,939 \text{ \AA}$) gesammelt werden (Tabelle 15). Beide Kristalle gehören zur Raumgruppe C2 (monoklin-sphenoidisch). Die Dimensionen der Elementarzelle betragen für den Kristalltyp B: $a = 195,3 \text{ \AA}$, $b = 85,5 \text{ \AA}$, $c = 89,4 \text{ \AA}$, $\beta = 93,6^\circ$ und für den Kristalltyp C: $a = 191,8 \text{ \AA}$, $b = 80,0 \text{ \AA}$, $c = 88,5 \text{ \AA}$, $\beta = 94,8^\circ$. Für den Kristall B-

Datensatz konnte eine maximale Auflösung von 1,8 Å, für den von Kristall C eine maximale Auflösung von 2,1 Å erreicht werden. Als Vorlage für das „*molecular replacement*“ mit den beiden Datensätzen wurde das Apo-HisC-Strukturmodell verwendet. Dabei wurde deutlich, dass in beiden Kristallen drei statt zwei Monomere in Elementarzelle vorlagen. Während zwei Monomere ein Dimer bildeten, formte das dritte Monomer mit einem Proteinmolekül der nächsten kleinsten Kristalleinheit ein Dimer. Die Analyse der Elektronendichtekarte zeigte für den vom Kristalltyp B erhaltenen Datensatz in allen drei Monomeren die Anwesenheit des Cofaktors, der allerdings nicht-kovalent an den Lysinrest 228 gebunden war (Abbildung 11). Deshalb war davon auszugehen, dass der Cofaktor PLP in aminierter Pyridoxamin-5'-phosphat-Form (PMP) im aktiven Zentrum vorlag. Dieses Strukturmodell wird von nun an als PMP-HisC bezeichnet. Zusätzlich zum Cofaktor konnten zwei Elektronenpeaks, die als Sulfat-Ionen aus den Kristallisationsbedingungen stammen, modelliert werden. Eines dieser Ionen war im aktiven Zentrum lokalisiert. Das Hinzufügen von 774 Wassermolekülen komplettierte das Modell mit einem R_{cryst} -Wert von 19,4 % für alle Daten zwischen 74 Å und 1,8 Å.

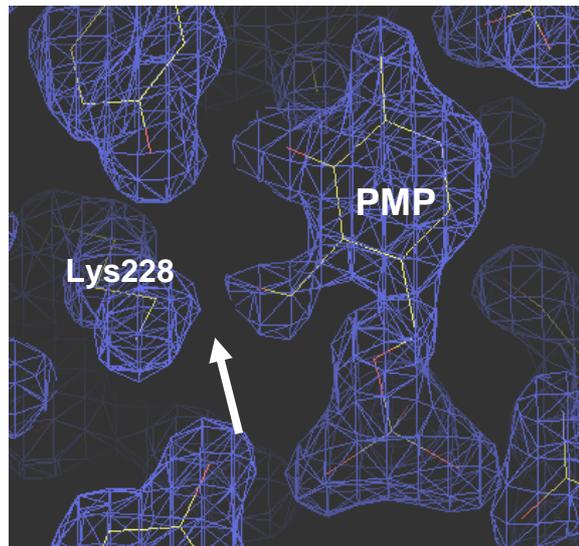


Abb. 11: Elektronendichtekarte des aktiven Zentrums von PMP-HisC im Detail
Die fehlende Elektronendichte zwischen Cofaktor und Lys228 (Pfeil) deutet auf das Vorliegen des Cofaktors in PMP-Form hin

Auch im Datensatz des dritten Kristalltyps (Kristallisationsbedingungen C) konnte im aktiven Zentrum eine zusätzliche Elektronendichte für den Cofaktor PLP identifiziert werden. Darüber hinaus zeigte sich in diesem Fall aber eine kovalente Bindung zwischen PLP und dem L-Lysinrest 228 des Proteins, was auf ein Vorliegen eines Schiff-Base-Komplexes von Enzym und Cofaktor PLP schließen ließ. Dieses Modell wird deshalb im Folgenden als PLP-HisC-Modell bezeichnet. Weiterhin wurden an exakt der gleichen Position wie in der Elektronendichtekarte von PMP-HisC wieder zwei zusätzliche punktuelle Bereiche hoher Elektronendichte gefunden, die als Phosphat-Ionen modelliert wurden, da NaH_2PO_4 - und K_2HPO_4 -Puffer Teil der Kristallisationsbedingungen waren. Das PLP-HisC-Modell enthielt 361 Wassermoleküle und einen R_{cryst} -Wert von 19,7 %.

Die Analyse der Stereochemie aller drei Modelle zeigte, dass 90 – 92 % aller ϕ - und ψ -Winkel in den erlaubten und keiner in den nicht erlaubten Regionen des Ramachandran-Diagramms lokalisiert waren.

Generell waren die Elektronendichtekarten für alle drei Strukturmodelle von sehr guter Qualität, was die Modellierung fast aller Aminosäureseitenketten des Proteins erlaubte. Die PMP-HisC- und PLP-HisC-Modelle beinhalten 364 von 366 Aminosäurebausteinen. Lediglich die beiden N-terminalen Aminosäuren fehlten. Trotz der Besonderheit der *Strep*-Tag II[®] - Beteiligung an der Kristallpackung im Apo-HisC-Modell (und der daraus resultierenden veränderten Struktur des Proteins) ähneln sich alle drei Modelle sehr. Die durchschnittliche Abweichung zwischen allen drei Strukturen über 300 Aminosäuren betrug lediglich 1,1 Å.

Eine vollständige Liste mit der Statistik zur Datensammlung und Datenverarbeitung ist für alle drei Strukturmodelle in Tabelle 16 aufgeführt.

Tab. 16: Datensammlung und statistische Auswertung der Röntgenbeugungsdaten für drei verschiedene HisC-Kristalle

	Apo-HisC	PMP-HisC	PLP-HisC
Datensammlung			
Auflösung [Å]	54,9-2,2	78-1,8 (1,9-1,8)	88-2,1 (2,2-2,1)
Raumgruppe	P3 ₂ 21	C2	C2
au-Dimension a; b; c [Å]	102,3; 102,3; 140,1	195,3; 85,5; 89,4	191,8; 80,0; 88,5
au-Winkel α ; β ; γ	90,0; 90,0; 120,0	90,0; 93,6; 90,0	90,0; 94,8; 90,0
Reflektionen beobachtet	266411	494758	193015
einzigartig	43528	133625	75438
$\langle I/\sigma \rangle$	25,5 (4,7)	15,9 (2,7)	10,4 (1,8)
Vollständigkeit [%]	99,8 (99,7)	97,7 (98,0)	96,9 (96,8)
R _{merge} [%]	5,1 (53,3)	5,9 (45,6)	9,0 (45,0)
Anzahl Monomere / au	2	3	3
Lösungsmittelgehalt [%]	53,2	60,4	60,0
$\langle B \rangle$ Wilson plot [Å ²]	41,2	25,1	28,6
Refinement			
R _{cryst} [%]	21,5	19,3	19,7
R _{free} [%]	27,0	21,9	23,8
Anzahl Atome			
Total	5656	9302	8838
Protein	5410	8406	8370
Wasser	238	774	361
Ionen	8	50	35
PLP	-	48	48
B-Faktor [Å ²]			
Durchschnitt	44,3	27,6	30,7
Protein Hauptketten	44,0	26,1	30,2
Protein Seitenketten	45,0	27,6	31,3
Sulfat/Phosphat	-	47,9	50,4
PLP	-	26,0	24,5
Lösungsmittel	40	34,5	30,0
Abweichung von der idealen Geometrie			
Bindungslängen	0,01	0,01	0,01
Bindungswinkel	1,33	1,44	1,42
Ramachandran-Diagr. [%]			
favorisierte Regionen	90,0	92,3	90,8
unerlaubte Regionen	0	0	0

Werte in Klammern gelten für den Bereich höchster Auflösung

au = *a*symmetric *u*nit cell

2.4 Strukturmodell für das HisC-Monomer und Dimer

Das HisC-Monomer (Abbildung 12) aus *C. glutamicum* (CgHisC) lässt sich wie viele andere Transaminasen (Schneider *et al.*, 2000) in einen langen N-terminalen Arm (Ile4–Val28; rot), eine große PLP-Bindedomäne (Glu36–Arg272; gelb) und eine kleine C-terminale Domäne (Asp29–Asn35 und His273–Leu366, grün) unterteilen.

Der N-terminale Arm, der aus der Mitte des Monomers in Richtung des zweiten Monomers ragt, beinhaltet zwei kleine 3_{10} -Helices (Leu6–Leu9 und Arg12–Arg16). Die Konformation des Arms weicht damit von der von HisC aus *T. maritima* (ausgedehnt) und *E. coli* (eine Helix) ab und ist mit dem Rest des Proteins über eine lange flexible Schleife („loop“) verbunden. Die große PLP-Bindedomäne gehört zum PLP-abhängigen Transferase-Falttyp, der durch eine $\alpha/\beta/\alpha$ -Architektur mit einem sieben-strängigen β -Faltblatt (Stränge $\beta 2$ – $\beta 8$; Strang 8 ist antiparallel zu allen anderen) und einigen α -Helices (8 in CgHisC) auf beiden Seiten charakterisiert ist.

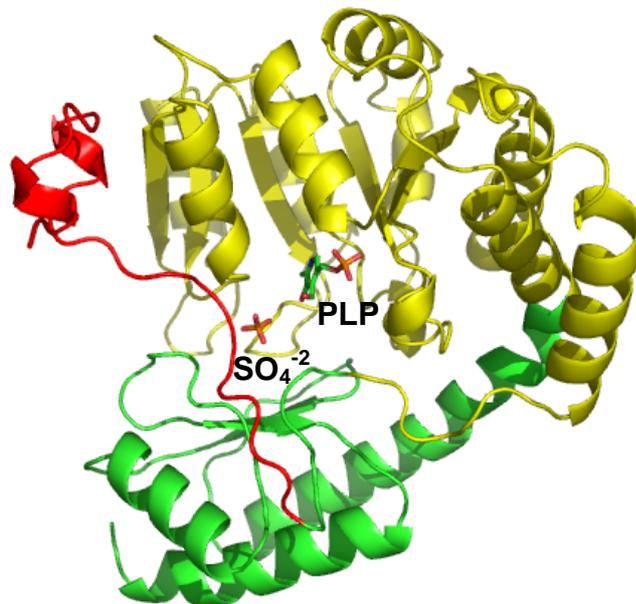


Abb. 12: Strukturmodell für das Monomer der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum*
N-terminaler Arm (rot), PLP-Bindedomäne (gelb) C-terminale Domäne (grün)

Die kleine C-terminale Domäne besteht aus einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt (Stränge β 9- β 12) und vier α -Helices. Eine Seite des β -Faltblatts liegt an der PLP-Bindedomäne, während die andere Seite durch die α -Helices abgedeckt ist. Die β -Faltblätter der großen und der kleinen Domäne stehen beinahe orthogonal zueinander. Das erste β -Faltblatt wird durch die N-terminalen Aminosäurereste Ile30-Asn33 über einige Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) und hydrophobe Wechselwirkungen von Ile30 und Leu32 mitgeformt.

Bei allen PLP-abhängigen Enzymen ist die Dimerisierung essentiell für die Enzymaktivität (Schneider *et al.*, 2000). Deshalb war es nicht verwunderlich, dass auch die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC im Kristall Dimere bildete. Das CgHisC-Dimer, das in Abbildung 13 dargestellt ist, hat eine Dimension von 95 Å X 50 Å X 45 Å.

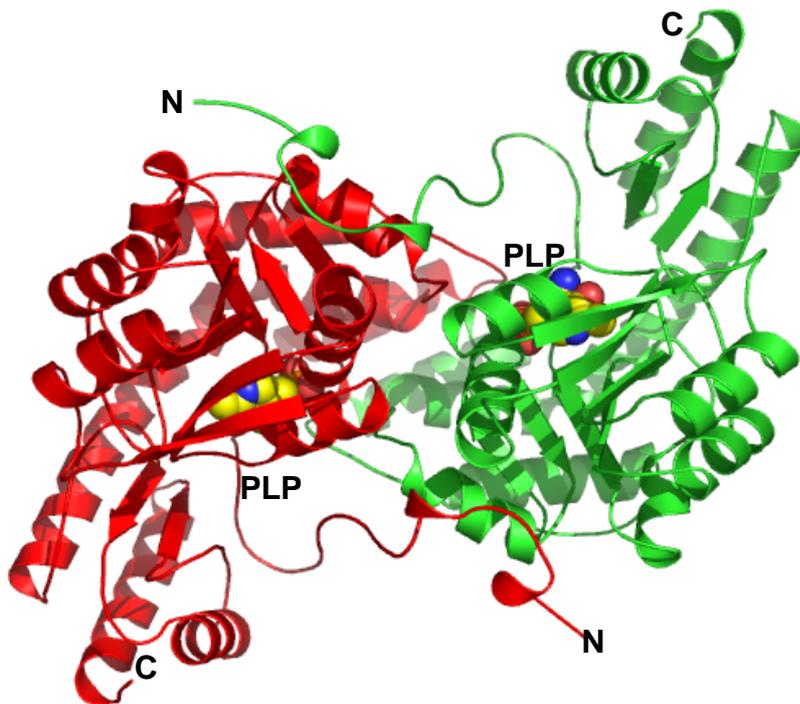


Abb. 13: Strukturmodell für das Dimer der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum* (PLP in der Kalottendarstellung)

Die Oberfläche, die durch die Dimerisierung abgedeckt ist, beträgt 3650 Å² und ist zu 65 % nicht-polar. Extensive hydrophobe Interaktionen, 24 H-Brücken und eine Salzbrücke stabilisieren den engen Kontakt zwischen den Untereinheiten.

Vier dieser H-Brücken werden von Aminosäureresten der N-terminalen Arme jedes Monomers gebildet. Diese Arme machen 23 % der Grenzfläche zwischen beiden Monomeren aus. Vier helicale Segmente der PLP-Bindedomäne, $\alpha 1$ (Ser42-Thr58), $\alpha 3$ (Gly97-Ala108), $\alpha 4$ (Thr127-Lys131), $\alpha 7$ (Asn243-Leu252) und eine α -Helix der kleinen Domäne $\alpha 8$ (Ser260-Ala265) haben Kontakte mit der jeweils anderen Domäne.

Im Apo-HisC-Strukturmodell, das auf Kristallen aus HisC-Protein mit *Strep*-Tag II[®] basiert, sind sieben Aminosäuren des Tags mit gestreckter Konformation gut sichtbar und Teil der Proteinpackung im Kristall (Abbildung 14).

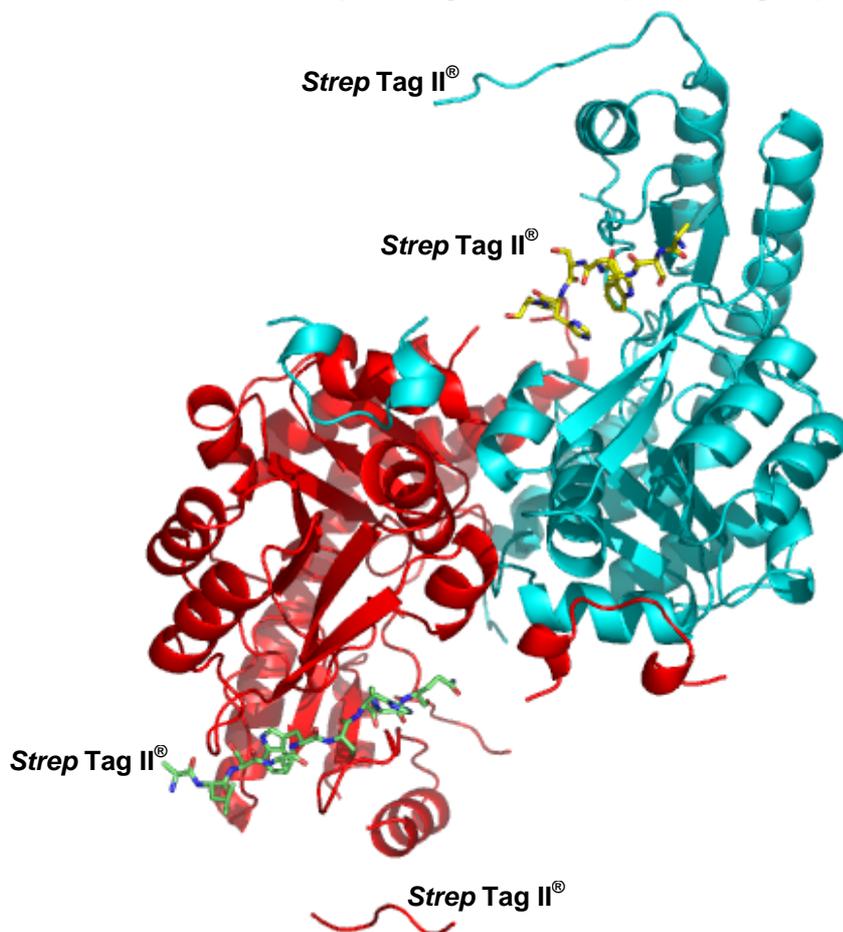


Abb. 14: Dimer der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum* in der Apo-Form mit insgesamt vier *Strep*-Tag II[®]. Die beiden Tags der nächsten Kristalluntereinheit, die an der Kristallpackung teilnehmen, sind als Strichmodelle dargestellt.

Der *Strep*-Tag II[®] eines Monomers der benachbarten kleinsten kristallographischen Einheit liegt dabei genau vor dem Eingang des aktiven Zentrums und könnte den Cofaktor PLP während der Kristallisation verdrängt haben. Darüber hinaus sind die α -Helices $\alpha 11$ (Gln318-Arg328) und $\alpha 12$ (Val347-

Asn365) im Apo-HisC Strukturmodell aufgrund der Bindung des Tags anders orientiert. Der *Strep*-Tag II[®] ist genau an der Stelle lokalisiert, die im Modell für PMP-HisC und PLP-HisC von Tyr21 eingenommen wird. Dabei ist die Position des *Strep*-Tag II[®] in beiden Monomeren nicht identisch und weicht um etwa 1 Å ab. Die lange Schleife (Arg18-Arg28), die den N-terminalen Arm mit dem Rest des jeweiligen Monomers verbindet, war in der Elektronendichtekarte für Apo-HisC nicht sichtbar (Abbildung 14). Insgesamt 36 Å liegen zwischen den letzten sichtbaren Aminosäuren Gly17 und Asp29. Diese Schleife wurde schon in anderen Apo-Aminotransferasen als sehr flexibel beschrieben (Fernandez *et al.*, 2004).

Die Architektur des aktiven Zentrums wird hauptsächlich durch Aminosäuren der zentralen β -Faltblätter und den N-terminalen Teilen der α -Helices α_2 und α_3 bestimmt. Die Distanz der aktiven Zentren beider Monomere beträgt ca. 25 – 30 Å, wobei sich die beiden Phosphatgruppen der Cofaktoren mit etwa 23 Å am nächsten sind. Die PLP-Bindestelle ist am Boden eines tiefen Hohlraums zwischen der Grenze der PLP-Bindedomäne, der kleinen Domäne und den beiden Untereinheiten selber lokalisiert. Dieser Hohlraum wird von vielen streng konservierten Aminosäuren wie z. B. Gly97, Ser98, Ala199, Tyr200, Thr25, Lys228 und Arg236 begrenzt.

Der Cofaktor ist durch viele nicht-kovalente Interaktionen mit Aminosäureresten des aktiven Zentrums fixiert (Abbildungen 15 und 16). Dabei besitzt jede Untereinheit die Aminosäuren, die zur PLP/PMP-Stabilisierung im aktiven Zentrum notwendig sind. Eine Ausnahme bildet Tyr63B des jeweils anderen Monomers (deshalb als Tyr63B bezeichnet), das zur Cofaktor-Stabilisierung über zwei H-Brücken beiträgt. Außerdem schirmt die jeweils andere Untereinheit das aktive Zentrum vor der wässrigen Umgebung ab. Die große Aminosäure Tyr257 schützt den Eingang zum Hohlraum. Arg236 stabilisiert die Sauerstoffatome O1P und O3P der PLP/PMP-Phosphatgruppe über zwei H-Brücken.

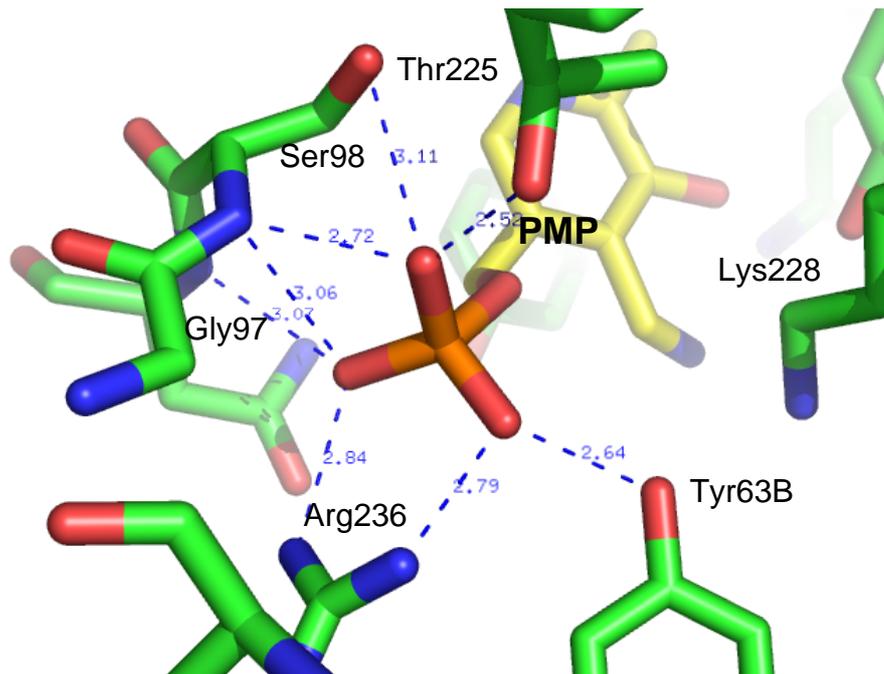


Abb. 15: Stabilisierung des PMP-Phosphatrests im aktiven Zentrum der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum*

Die Hydroxylgruppe von Ser227 liegt unmittelbar benachbart zu O1P. Absolut konserviert ist Gly97 als erste Aminosäure der α -Helix α_3 , die einen engen Kontakt von α_3 zur PLP/PMP-Phosphatgruppe sichert. Dadurch kommt es zur Ausbildung von zwei H-Brücken (NH98 und NH99) zwischen α_3 -helix und der PLP/PMP-Phosphatgruppe. Die Hydroxylgruppen von Thr225 und Tyr63B stabilisieren O2P der PLP-Phosphatgruppe über zwei H-Brücken. Diese beiden letztgenannten H-Brücken sind zwar in HisC-Proteinen, nicht aber in anderen Transaminasen konserviert. Der aromatische Ring von PLP ist zwischen Tyr123 und Ala199 fixiert (Abbildung 16). Dabei ist der Phenolring von Tyr123 in einem Abstand von nur 3,2 Å fast parallel zum Pyridin-Ring von PLP/PMP ausgerichtet. Beide π -Systeme stehen über aromatische Wechselwirkungen („aromatic stacking“) in Kontakt. Insgesamt drei H-Brücken in der Ebene des Pyridin-Ringes stabilisieren seine Orientierung im aktiven Zentrum. Das Seitenkettensauerstoffatom OD1 des konservierten Asp197 bildet eine dieser H-Brücken zum N1-Atom des Pyridin-Ringes, was darauf hindeutet, dass dieses Stickstoffatom protoniert vorliegt.

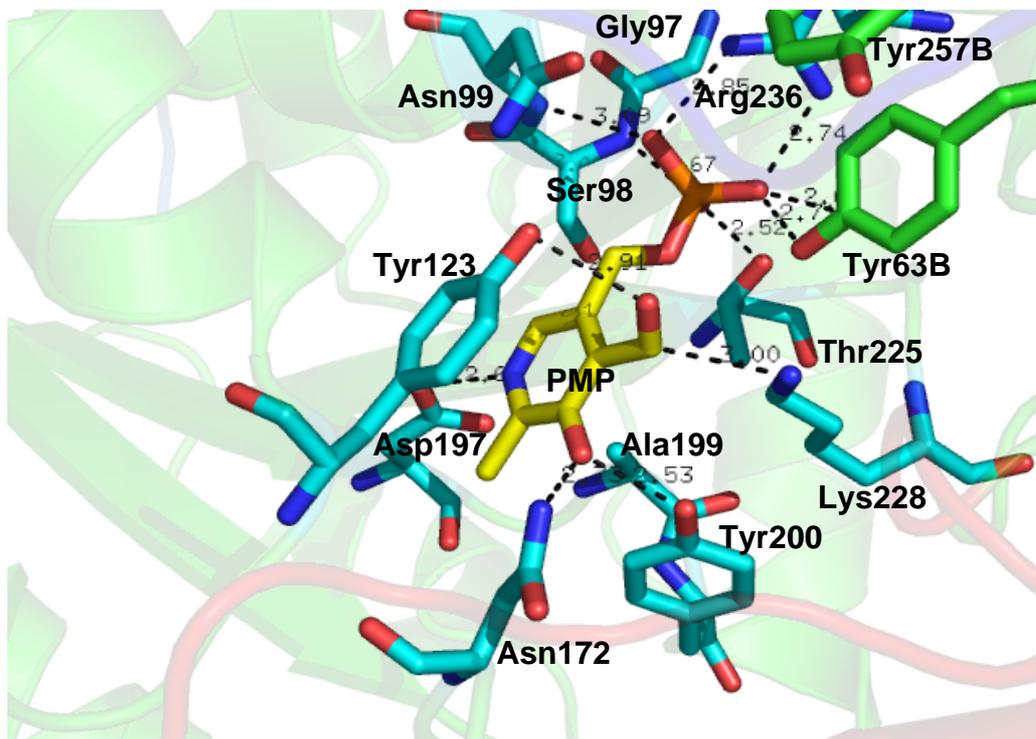


Abb. 16: Fixierung des Pyridin-Ringes von PMP im aktiven Zentrum der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum*

Zwei H-Brücken zwischen O3 des Pyridins und den Seitenketten von Asn172 und Tyr200 komplettieren die Fixierung von PLP/PMP im aktiven Zentrum. Ein Vergleich der PLP-HisC- und PMP-HisC-Strukturmodelle zeigte, dass die Bildung der Schiff-Base zwischen PLP und Lys228 die Konformation des Proteins nicht nachhaltig beeinflusst. Der Unterschied zwischen beiden Modellen beträgt über das Rückgrat von allen 364 Aminosäuren gesehen lediglich 0,25 Å.

Die zusätzlichen Elektronendichten im aktiven Zentrum der PLP-HisC und PMP-HisC-Modelle wurden als Phosphat- bzw. Sulfat-Ionen modelliert, da entsprechende Salze Bestandteil der Kristallisationsbedingungen waren. Beide Ionen sind exakt an der Phosphatbindestelle des Substrats L-Histidinol-phosphat lokalisiert, die schon in HisC-Substrat-Strukturmodellen von *E. coli* (PDB-Eintrag 1GEX; Haruyama *et al.*, 2001) und *T. maritima* (PDB-Eintrag 1UU1; Fernandez *et al.*, 2004) beschrieben worden sind. Die konservierten Aminosäuren Arg333, Arg342, Tyr21 und Asn172 halten das Sulfat/Phosphat-Ion im aktiven Zentrum über insgesamt sechs H-Brücken in seiner Position (Abbildung 17). Die Distanz zwischen den Ionen und dem nächsten Atom des Cofaktors beträgt 4,5 Å.

Das Vorliegen von HisC-Strukturmodellen aus *E. coli* und *T. maritima*, in denen die Proteine mit L-Histidinol-phosphat komplexiert sind, erlaubte die Modellierung dieses Substrates in das aktive Zentrum von HisC aus *C. glutamicum*. Das Histidinol wird über zwei H-Brücken im aktiven Zentrum in seiner Orientierung gehalten.

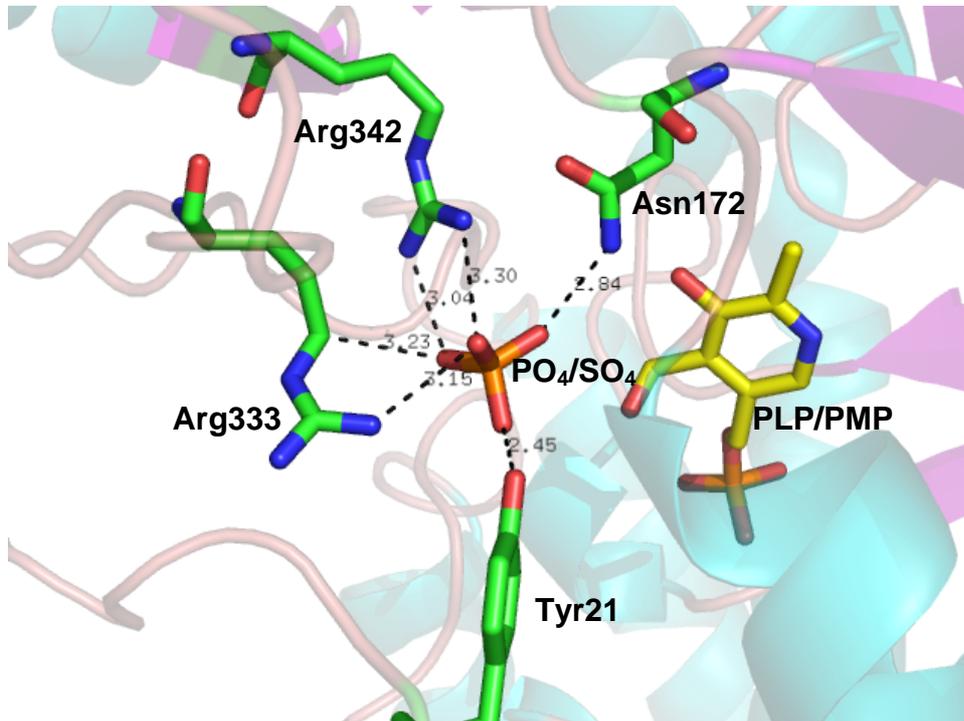


Abb. 17: Stabilisierung des Phosphat- bzw. Sulfat-Ions im aktiven Zentrum von PLP/PMP-HisC

Die Hydroxylgruppe der Seitenkette von Tyr21 ist an ND1 von Histidinol gebunden, während das OD1-Atom von Asn99 eine H-Brücke mit dem Histidinol-NE2-Atom ausbildet. Tyr123 hält Asn99 über eine H-Brücke zum Asn99-ND2-Atom in seiner Position.

2.5 Bedeutung einzelner Aminosäurereste für die Enzymaktivität

Um zu verstehen, welche Bedeutung einzelne Aminosäurereste im aktiven Zentrum der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum* bei der Katalyse haben, sollten die Konsequenzen von insgesamt elf Aminosäuresubstitutionen an den vier verschiedenen Positionen Tyr21, Asn99, Tyr123 und Tyr257 studiert werden. Dazu wurde(n) zunächst die für einen

Aminosäureaustausch notwendige(n) Punktmutation(en) mit Hilfe der PCR durch ortsgerichtete Mutagenese („*site-directed mutagenesis*“) in das *hisC*-Gen auf dem pJM*hisC*-Plasmid eingeführt. Nach erfolgreicher Sequenzierung der mutierten Gene wurden diese in *E. coli* heterolog exprimiert und die resultierenden Strep-Tag II[®]-Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Sowohl das Substratspektrum als auch die spezifischen Aktivitäten der verschiedenen HisC-Varianten (HisC-Muteine) wurden dann in Enzymtests mit dem Aminodonor L-Glutaminsäure bestimmt. Ein Überblick über die Ergebnisse ist in Tabelle 17 dargestellt.

Tab. 17: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten der elf HisC-Muteine im Vergleich zum Wildtyp-HisC-Protein (die Zahlenwerte geben die spezifischen Aktivitäten in $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1} \text{ an}$)

HisC-Variante	Gebildete Aminosäure*					
	L-Glu**	L-Leu	L-Ile	L-Val	L-Phe	L-Tyr
wt	2,8	1,4	---	---	1,6	0,5
Y21F	0,8	1,2	---	---	0,7	0,3
Y21K	0,3	0,2	---	---	0,3	---
Y21E	0,3	0,2	---	---	0,2	0,2
N99D	1,6	0,7	---	---	1,5	0,3
N99F	---	---	---	---	---	---
N99G	---	---	---	---	---	---
N99K	---	---	---	---	---	---
Y123F	0,1	---	---	---	0,8	0,9
Y257F	1,0	0,7	---	---	1,8	0,3
Y257K	---	---	---	---	---	---
Y257E	0,1	---	---	---	---	---

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen

** In Abhängigkeit von L-Histidinol-phosphat (umgekehrte Reaktionsrichtung)

Über zwei H-Brücken trägt die Hydroxylgruppe von Tyr21 zur Stabilisierung des Substrats L-Histidinol-phosphat bei. Eine dieser H-Brücken steht mit der Phosphorylgruppe (s. Abb. 17), die andere mit Histidinol in Kontakt. Wurde das L-Tyrosin in dieser Position gegen L-Phenylalanin ausgetauscht (Y21F), war die Aktivität mit L-Histidinol-phosphat um das 3,5-fache reduziert ($0,8$ statt $2,8 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$), was die Bedeutung dieses H-Brücken-Netzwerks unterstreicht. Dieses Netzwerk schien hingegen für die Akzeptanz der kleinen und hydrophoben L-Leucinvorstufe nicht so wichtig zu sein, da die spezifische Aktivität für dessen Umsetzung kaum verändert war ($1,2$ statt $1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Diese Beobachtung ließ sich anhand des Strukturmodells erklären, nachdem L-Leucin in das aktive Zentrum modelliert worden war (Abbildung 18).

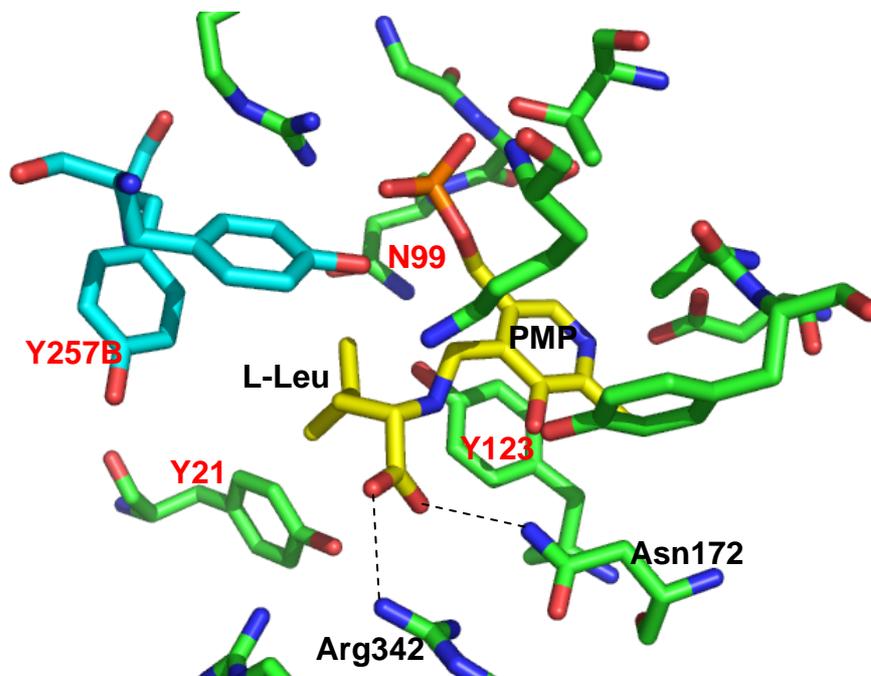


Abb. 18: L-Leucin als externes Aldimin im aktiven Zentrum der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *C. glutamicum*
Die jeweils unabhängig ausgetauschten Aminosäurereste sind im Einbuchstabencode angegeben und rot hervorgehoben

Die Carboxylgruppe von L-Leucin oder der L-Leucinvorstufe 2-Keto-iso-capronsäure wird im aktiven Zentrum über zwei H-Brücken zu Arg342 und Asn172 stabilisiert und braucht keinen weiteren Liganden für seine Fixierung. Außerdem ist der aromatische Ring von Tyr21/Phe21 etwa 4 \AA von der

hydrophoben Seitenkette von L-Leucin entfernt und kann auch nicht über hydrophobe Wechselwirkung zu dessen Stabilisierung beitragen.

Der Austausch gegen L-Lysin oder L-Glutaminsäure (Y21K und Y21E) in dieser Position zeigte, dass beide H-Brücken zwischen Tyr21 und L-Histidinolphosphat für die Katalyse von Bedeutung sind. Obwohl beide geladenen Aminosäurereste noch eine H-Brückenverbindung zum Substrat bilden können, war die Aktivität gegenüber Y21F noch einmal um etwa das Dreifache reduziert ($0,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). Dieser Effekt kann aber auch darauf zurückgeführt werden, dass sowohl L-Lysin als auch L-Glutaminsäure als nicht-aromatische Aminosäuren nicht mehr in der Lage sind, L-Histidinolphosphat im aktiven Zentrum gegen das umgebende Lösungsmittel abzuschirmen. Die sehr geringen Aktivitäten der Y21K- und Y21E-Mutanten mit den drei hydrophoben Substraten liegen wahrscheinlich in einer reduzierten Zugangsmöglichkeit zum aktiven Zentrum begründet. Die drei Vorstufen können wahrscheinlich nur schwer die geladenen L-Lysin- oder L-Glutaminsäurekette an Position 21 am Zugang passieren.

Asn99 ist sowohl mit dem Cofaktor als auch mit dem Substrat L-Histidinolphosphat über H-Brücken in Kontakt (s. Abb. 16). Diese Aminosäure wurde gegen vier verschiedene andere Aminosäuren ausgetauscht (N99D, N99F, N99G, N99K). Nur mit dem HisC-N99D-Mutein waren noch Transaminierungsaktivitäten messbar. Die spezifische Aktivität für die Umsetzung von L-Histidinolphosphat war im Vergleich zum Wildtyp-Enzym von 2,8 auf $1,6 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ reduziert. Erstaunlich war die fast unveränderte Transaminaseaktivität des N99D-Muteins mit den entsprechenden α -Ketosäurevorstufen von L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Dies deutet darauf hin, dass Asn99 für die Stabilisierung aromatischer Substrate im aktiven Zentrum nicht wichtig ist. Interessanterweise verfügen die HisC-Sequenzen von *E. coli* und *T. maritima* natürlicherweise über einen L-Asparaginsäurerest an dieser Position (Sivaraman *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2004).

Wie schon beschrieben, wird der Pyridinring des Cofaktors im aktiven Zentrum unter anderem über aromatische Wechselwirkungen mit Tyr123 fixiert

(s. Abb. 16). Sequenzvergleiche zeigten, dass diese Interaktion für eine HisC-Aktivität essentiell ist, da eine aromatische Aminosäure, meistens L-Tyrosin, an dieser Position konserviert ist. Ausnahmen stellen die Aminosäuresequenzen von *Z. mobilis* und *B. subtilis* dar, in denen L-Phenylalanin an dieser Position lokalisiert ist. Nach Sivaraman *et al.* (2001) trägt das L-Phenylalanin zur beobachteten breiteren Substratspezifität für aromatische Aminosäuren dieser beiden Enzyme bei (Gu *et al.*, 1995; Weigent und Nester, 1976). Die Analyse des HisC-Y123F-Muteins aus *C. glutamicum* unterstützt diese Vermutung, da die Aktivität mit Phenylpyruvat im Vergleich zum Wildtyp-Enzym kaum verändert und die Aktivität mit 4-Hydroxy-phenylpyruvat mit 0,9 gegenüber 0,5 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ fast verdoppelt war.

Ein L-Tyrosin ist in den meisten HisC-Sequenzen an Position 257 konserviert und schirmt den Eingang zum aktiven Zentrum ab. Wurde dieses L-Tyrosin durch L-Phenylalanin (Y257F) ersetzt, so sank die spezifische Aktivität für die Umsetzung des hydrophilen Substrates L-Histidinol-phosphat um etwa das Dreifache von 2,8 auf 1,0 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ ab. Gleichzeitig stieg die Aktivität für die Bildung der hydrophoben Aminosäure L-Phenylalanin von 1,5 auf 1,8 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ an. Der Grund dafür ist wahrscheinlich, dass das Fehlen der terminalen Hydroxylgruppe bei Phe257 gegenüber Tyr257 den Zugang hydrophiler Substrate zum aktiven Zentrum erschwert. Gleichzeitig führt aber die Abwesenheit der Hydroxylgruppe dazu, dass Phe257 den hydrophoben Phenolring des Substrates L-Phenylalanin stabilisieren kann (Abbildung 19). Der Austausch gegen die beiden geladenen Aminosäuren L-Lysin oder L-Glutaminsäure hatte den Verlust jeglicher HisC-Aktivität zur Folge.

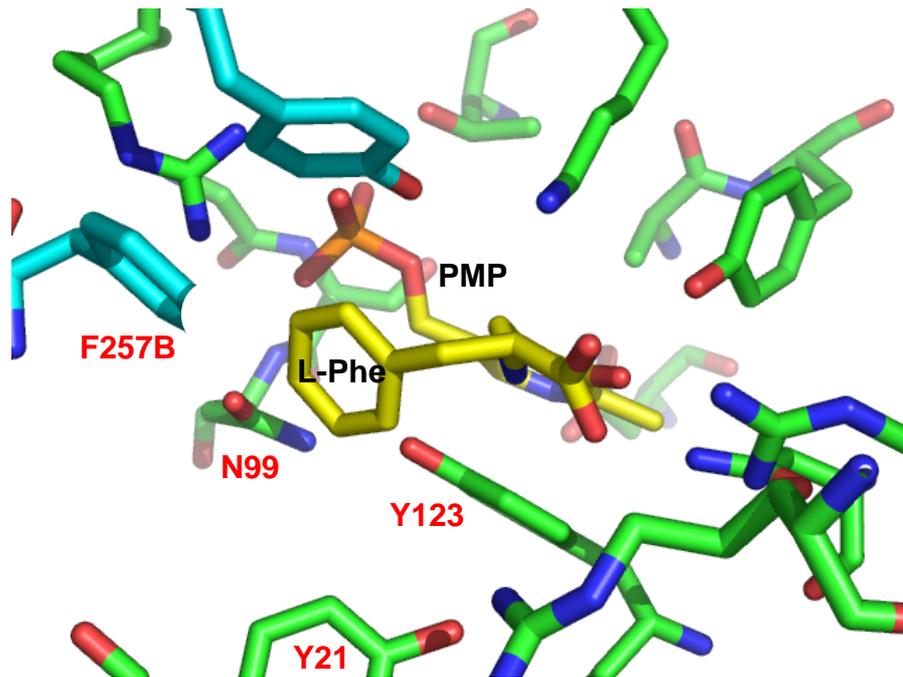


Abb. 19: L-Phenylalanin als externes Aldimin im aktiven Zentrum der L-Histidinol-phosphat Transaminase HisC aus *C. glutamicum*. Die mutierten Aminosäuren sind im Ein-Buchstabencode angegeben und rot hervorgehoben.

Trotz des sehr genauen Strukturmodells für HisC aus *C. glutamicum* konnte nicht geklärt werden, warum dieses Enzym zwar die Transaminierung der L-Leucin-Vorstufe 2-Keto-iso-capronsäure, nicht aber die Umsetzung der sehr ähnlichen L-Valin- und L-Isoleucinvorstufen 2-Keto-valeriansäure und 3-Methyl-2-keto-valeriansäure katalysieren kann. Es gibt keine spezifischen hydrophoben Kontakte zwischen der hydrophoben Seitenkette von L-Leucin und Aminosäureresten des aktiven Zentrums. Auch die Analyse der elf HisC-Varianten konnte keinen Aufschluss über die molekulare Grundlage dieser Substratspezifität geben, noch konnte eine der HisC-Varianten Transaminierungsreaktionen mit der L-Valin- oder L-Isoleucinvorstufe katalysieren.

3. Gerichtete Evolution von AroT zu erhöhter Aktivität für die Bildung von L-Leucin

Um zu testen, inwieweit ein *in vivo*-Selektionssystem in *C. glutamicum* dazu geeignet ist die Enzymaktivität von Transaminasen zu modifizieren, sollten AroT und HisC durch eine gerichtete Enzymevolution zu einer erhöhten Transaminierung von 2-Keto-iso-capronsäure hin verändert werden. Durch Deletion des *ilvE*-Gens, das für die Transaminase der verzweigtkettigen Aminosäuren kodiert, konnte *C. glutamicum* nicht mehr ohne Supplementation von L-Leucin auf dem Minimalmedium CGXII wachsen (s. Abb. 3). Die *in vitro* gemessenen Enzymaktivitäten von AroT und HisC reichen für die Bildung dieser Aminosäure also nicht aus, um den Effekt der *ilvE*-Deletion *in vivo* komplementieren zu können.

3.1 Entwicklung eines Selektionssystems für eine gerichtete Enzymevolution von AroT und HisC

Die L-Leucin-Auxotrophie von *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ ermöglichte eine Selektion auf Komplementation dieses Leu⁻-Phänotyps ohne Entwicklung eines aufwendigen Testverfahrens, in dem viele tausend AroT oder HisC-Varianten einzeln auf eine erhöhte L-Leucinbildung hin getestet werden müssen. Die willkürliche Mutation der offenen Leseraster von *aroT* und *hisC* sollte durch die Anwendung einer fehlerhaften Polymerasekettenreaktion („*error-prone*“-PCR) durchgeführt werden. Nach Integration der PCR-Produkte in einen Selektionsvektor sollten die Ligationsprodukte in die *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ -Mutante transformiert und die Zellen auf Selektionsmedium überführt werden. Die Transaminasen, die aufgrund einer oder mehrerer Mutationen eine erhöhte Aktivität für die L-Leucinsynthese aufweisen, sollten die $\Delta ilvE$ -Mutante L-Leucin-prototroph machen. Diese Klone könnten dann aufgrund des wiederhergestellten Wachstums auf CGXII-Minimalmedium leicht identifiziert werden. Solch ein System zur gerichteten Enzymevolution wird auch als

„*life or death*“-Selektionsverfahren bezeichnet (Turner, 2003; Arnold und Georgia, 2003).

Damit dieses System funktionierte, musste aber zuerst sichergestellt werden, dass die plasmidkodierte AroT- und HisC-Wildtyp-Enzyme nicht schon alleine durch eine Erhöhung der jeweiligen Gendosis zur Komplementation der L-Leucinauxotrophie führten. Es wurde das Plasmid pBHK18 ausgewählt, da dieses sehr kleine Vektor (3337 bp) über das pNG2-Replicon verfügt, das die Kopienzahl des Plasmids in *C. glutamicum* auf 3-5 limitiert (Kirchner und Tauch, 2003). Außerdem sollte die Genexpression der beiden Transaminase-Gene durch ihre natürlichen Promotorregionen kontrolliert werden. Grund dafür ist, dass es auch durch einen starken Plasmid-Promotor letztlich zu einer erhöhten Enzymmenge in der Zelle kommen könnte, die zur Komplementation des Leu⁻-Phänotyps führen würde. Die natürlichen Promotorbereiche von *aroT* bzw. *hisC* waren also vor das jeweilige offene Leseraster zu klonieren, durften aber nicht durch die *error-prone*-PCR mutiert werden. Bei der Analyse der Promotorbereiche der beiden Gene wurde deutlich, dass für die Klonierung von *aroT* mit allen regulatorischen Elementen ein 300 bp großer, stromaufwärts gelegener Bereich ausreichend war. Das Gen *hisC* hingegen ist in einem Operon mit dem stromaufwärts lokalisierten Gen *hisD* organisiert, das für die Histidinol-dehydrogenase kodiert. Deshalb musste *hisD* und ein etwa 300 bp großer Promotorbereich vor dem Transkriptionsstart dieses Gens mit *hisC* zusammen kloniert werden. Ausgehend von genomischer DNA des *C. glutamicum* ATCC 13032-Wildtyps wurden die offenen Leseraster von *aroT* und *hisD/hisC* inklusive des jeweils 300 bp langen, stromaufwärts gelegenen Promotorbereichs mit den Primerpaaren EvKI_aroT_for/EvKI/Mu_aroT_rev bzw. EvKI_hisC_for/EvKI/Mu_hisC_rev amplifiziert. Restriktionskarten der Gene *aroT* und *hisCD* mit schematischer Darstellung der für die Klonierung und spätere *error-prone*-PCR benötigten Primer sind in Abbildung 20 dargestellt.

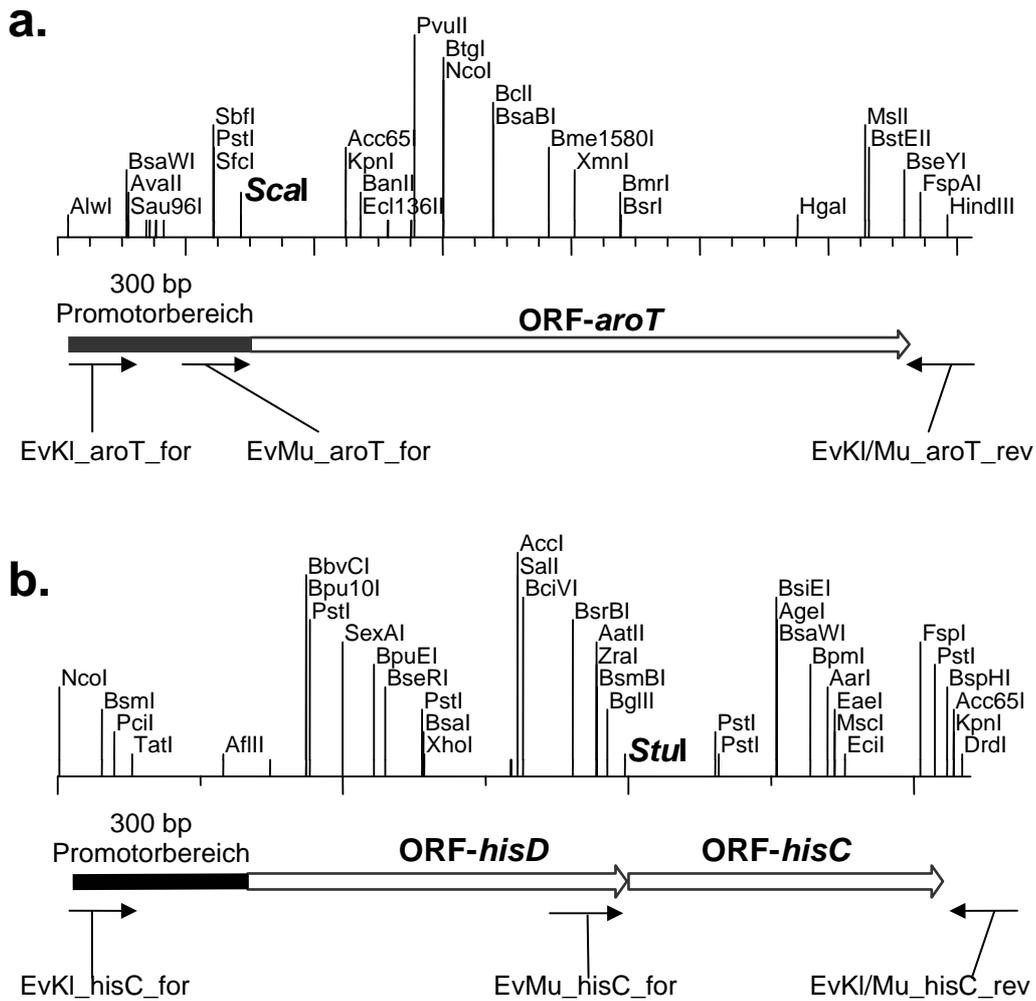


Abb. 20: Restriktionskarten von *aroT* (a.) und *hisCD* (b.) mit schematischer Darstellung aller verwendeten PCR-Primer (Die für die Integration der mutierten ORFs benötigten Restriktionsschnittstellen *Scal* (*aroT*) und *Stul* (*hisC*) zwischen Promotorbereich und ORF sind jeweils hervorgehoben)

Nach Verdau der PCR-Produkte mit *SmaI* und *XbaI*, deren Erkennungssequenzen in die Primer integriert waren, wurden die Restriktionsprodukte in den zuvor mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnittenen pBHK18-Vektor ligiert. Nach Transformation in *E. coli* DH5 α wurden die so entstandenen Plasmide pBHK-*aroT* und pBHK-*hisCD* zuerst einer Restriktionsanalyse unterworfen und anschließend die fehlerfreie Sequenz des jeweiligen Inserts durch Sequenzierung bestätigt. Nach Transformation der Vektoren in *C. glutamicum* Δ *ilvE* und Ausstreichen der Stämme auf CGXII-Minimalmedium + 1mM L-Ile + Kan¹⁵ konnten nach etwa 90-stündiger Inkubation bei 30 °C kleine, kaum sichtbare Kolonien auf den Selektionsplatten identifiziert werden. Auf Vergleichsplatten mit einem *C. glutamicum* Δ *ilvE*-Stamm, der lediglich das

pBHK18-Leerplasmid trug, waren keine Kolonien sichtbar. Die leicht erhöhte Gendosis durch 3-5 pBHK18-Kopien pro Zelle reichte also aus, um den Leu⁻-Phänotyp zumindest teilweise zu komplementieren. Wurde dem Medium von *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT* und *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*hisCD* direkt 1 mM L-Leucin zugegeben, konnten schon nach etwa 20 Stunden gleich große Kolonien identifiziert werden. Bei einem Screening auf erfolgreiche Mutationen waren also die Klone interessant, die nach weniger als 90 Stunden auf den Selektionsplatten identifiziert werden konnten.

Als Matrizen-DNA für die *error-prone*-PCR (epPCR) diente die Plasmid-DNA von pBHK-*aroT* und pBHK-*hisCD*. Um Mutationen in den Promotorbereichen (und auch *hisD*) zu verhindern, konnten lediglich die *reverse*-Primer eingesetzt werden, die schon bei der Konstruktion der beiden Plasmide Verwendung fanden. Deshalb wurde jeweils ein neuer *forward*-Primer (EvMu_aroT_for bzw. EvMu-hisCD_for) synthetisiert, der zusammen mit dem *reverse*-Primer die Amplifikation des jeweiligen offenen Leserasters ohne Promotorbereich erlaubte (Abbildung 20). Zur Integration der mutierten offenen Leseraster hinter den Promotorbereich diente bei *aroT* eine *Scal*-Schnittstelle, die sich lediglich neun Nukleotide vor dem *aroT*-START-Codon befand. Diese Restriktionsschnittstelle wurde auch in den EvMu_aroT_for-Primer integriert, um eine gerichtete Klonierung zu ermöglichen. Zwischen *hisD* und *hisC*, nur sieben Nukleotide vor dem *hisC*-START-Codon, wurde eine *StuI*-Schnittstelle gefunden, die in derselben Weise für die Integration von *hisC* hinter dem unmutierten *hisD*-Gen genutzt werden konnte.

Zur Erstellung von Bibliotheken zufällig mutierter („*random mutagenesis*“) *aroT*- und *hisC*-Varianten wurden jeweils mehrere *error-prone*-PCRs durchgeführt, die PCR-Produkte geschnitten und in die mit den jeweils gleichen Enzymen verdauten pBHK18-Vektoren ligiert. Da die Transformationseffizienz von *C. glutamicum* wesentlich geringer ist als die von *E. coli*, wurden die Ligationsprodukte stets in *E. coli* zwischenkloniert. Dadurch wurde der Verlust von *aroT* und *hisC*-Varianten, die bei der Elektroporation nicht in eine Bakterienzelle gelangten und somit unwiderruflich verloren waren, minimiert. Um diese Zwischenklonierung so effektiv wie möglich zu machen, wurden

elektrokompetente Electrocomp™ GeneHogs® *E. coli*-Zellen verwendet, deren Transformationseffizienz mit 1×10^6 Kolonien pro fmol eingesetztes Plasmid besonders hoch ist. Nach der Plasmidisolierung aus diesen *E. coli*-Zellen wurden die Vektoren mittels Elektroporation nach *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ transformiert. Diese Zellen wurden anschließend auf Selektionsplatten mit GXII-Minimalmedium + 1mM L-Ile + Kan¹⁵ ausgestrichen, um die AroT- und HisC-Varianten auf eine Komplementation des Leu⁻-Phänotyps hin testen zu können.

3.2 Charakterisierung einer AroT-Variante mit erhöhter L-Leucinaktivität

In den Versuchen zur gerichteten Enzymevolution mit dieser „*life or death*“-Selektion wurden insgesamt ca. 700.000 HisC- und ca. 500.000 AroT-Klone in *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ getestet. Dabei wurde eine AroT-Variante nach einer Mutations-Selektionsrunde identifiziert, die auf nur mit L-Isoleucin supplementiertem CGIII-Minimalmedium schneller wuchs als der Kontrollstamm. Die Sequenzierung dieses Klons zeigte, dass das *aroT*-Leseraster drei Punktmutationen beinhaltete. Bei zwei dieser Mutationen handelte es sich um T → C-Transitionen an Position 78 und 898 der Nukleinsäuresequenz. Beide Transitionen erwiesen sich als stille Mutationen ohne Konsequenzen für die AroT-Aminosäuresequenz. Bei der dritten Mutation handelte es sich um eine A → T-Transversion an Position 160, die einen Aminosäureaustausch von L-Methionin zu L-Leucin an Position 54 der Aminosäuresequenz zur Folge hatte.

Um auszuschließen, dass noch andere Mutationen, die zufällig und ungewollt entweder im Plasmid pBHK-*aroT*-M54L oder im Genom von *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ auftraten und eine Komplementation des Leu⁻-Phänotyps bewirken konnten, wurde die A → T-Transversion mittels ortsgerichteter Mutagenese erneut in die Sequenz von *aroT* auf dem Plasmid pBHK-*aroT* eingeführt. Nach Transformation in *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ zeigte sich auf den Agarplatten wieder der gleiche Wachstumsunterschied zum *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK18-*aroT*-Vergleichsstamm.

Für eine erste Charakterisierung dieser Mutante wurde das Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT* und *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT*-M54L über 72 Stunden im flüssigen Selektionsmedium CGXII + 1 mM L-Ile + Kan¹⁵ verglichen (Abbildung 21).

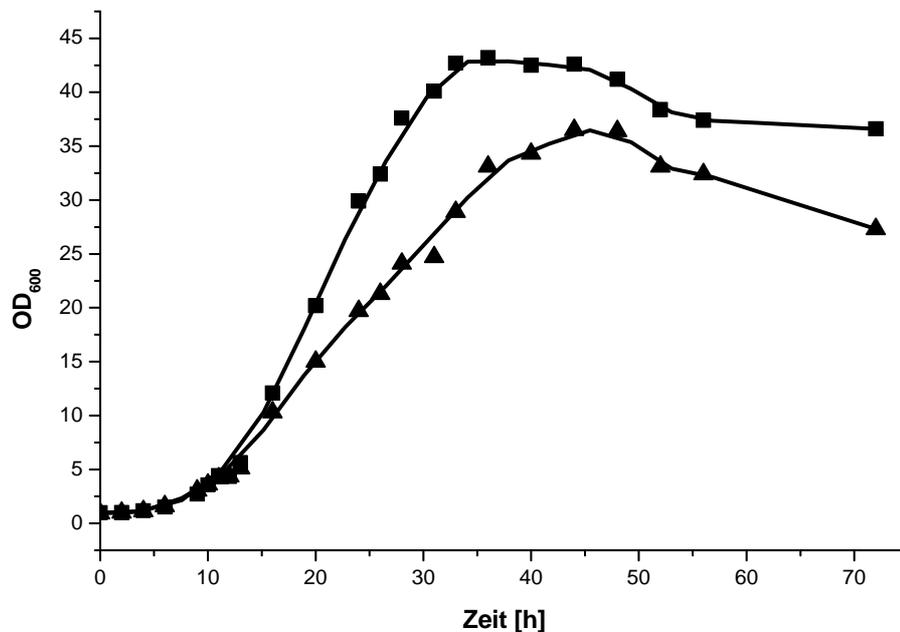


Abb. 21: Wachstum von *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT* (▲) und *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT*-M54L (■) in CGXII-Medium + 1 mM L-Ile + Kan¹⁵

Dabei zeigte sich, dass die Mutante auch in Flüssigmedium besser wachsen kann als der Vergleichsstamm. Während *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ pBHK-*aroT*-M54L nach etwa 36 Stunden eine maximale optische Dichte von 44 erreichte, wuchs der Stamm ohne Mutation nur bis zu einer optischen Dichte von 36, die erst nach 48 Stunden Inkubation erreicht wurde.

Um zu überprüfen, inwieweit dieser einzige Aminosäureaustausch die katalytischen Parameter von AroT veränderte, wurde die A → T-Transversion an Position 160 der Nukleinsäuresequenz mittels ortsgerichteter Mutagenese in die *aroT*-Sequenz auf dem pJMaro*T*-Expressionsplasmid eingeführt. Zusätzlich zu dieser Mutagenese wurde L-Methionin an Position 54 auch noch gegen die beiden verzweigtkettigen Aminosäuren L-Isoleucin und L-Valin ausgetauscht. Damit sollte überprüft werden, ob diese beiden Aminosäuren einen ähnlichen

Effekt auf die katalytischen Eigenschaften von AroT haben. Nach erfolgreicher Überprüfung der Mutationen durch Sequenzierung wurden die *aroT*-Varianten und das *aroT*-Wildtyp-Gen heterolog in *E. coli* exprimiert und die daraus resultierenden Strep-Tag II®-Proteine mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt. Mit diesen Enzymen wurden im Anschluss daran Enzymtests zur Bestimmung einiger katalytischer Parameter durchgeführt. Ein Vergleich der drei AroT-Varianten mit der Wildtyp-Transaminase im Bezug auf das Substratspektrum und den dazugehörigen spezifischen Aktivitäten ist in Tabelle 18 dargestellt.

Tab. 18: Substratspektrum und spezifische Aktivitäten von AroT und drei AroT-Muteinen (Angabe der spezifischen Aktivitäten in [$\mu\text{mol Aminosäure min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$])

gebildetes Produkt	AroT ^{wt*}	AroT ^{M54L*}	AroT ^{M54I*}	AroT ^{M54V*}
L-Leucin	1,3	2,7	1,3	2,3
L-Isoleucin	---	---	---	---
L-Valin	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
L-Phenylalanin	13,6	9,2	9	6,6
L-Tyrosin	8,8	7,6	7,3	5,8

* Jeder Wert entspricht dem Durchschnitt von mindestens zwei unabhängigen Messungen.

Durch den Austausch von L-Methionin gegen L-Leucin (AroT^{M54L}) konnte die spezifische Aktivität für die Bildung von L-Leucin gegenüber dem Wildtyp-Enzym (AroT^{wt}) von 1,3 auf 2,7 $\mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ verdoppelt werden. Gleichzeitig sank aber die Aktivität für die Bildung der beiden aromatischen Aminosäuren. Wurde L-Methionin durch L-Isoleucin ersetzt (AroT^{M54I}), so war die Aktivität für die Synthese von L-Phenylalanin und L-Tyrosin genauso verringert wie bei AroT^{M54L}. Die Aktivität für die L-Leucinbildung blieb bei AroT^{M54} jedoch gegenüber AroT^{wt} unverändert ($1,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$). War bei AroT an Position 54 der Aminosäuresequenz ein L-Valin lokalisiert (AroT^{M54V}), so wurde die spezifische Aktivität für die Synthese von L-Leucin von 1,3 auf 2,3 $\mu\text{mol Aminosäure min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ gesteigert. Den Zugewinn

büßte diese Enzymvariante aber auch durch einen Aktivitätsverlust bei der Bildung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin ein, der gegenüber AroT^{M54L} und AroT^{M54I} noch weiter erhöht war (6,6 bzw. 5,8 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹). Mit keiner der vier AroT-Varianten konnte eine Aktivität für die Bildung von L-Isoleucin gemessen werden. Die Umsetzung von 2-Keto-iso-valeriansäure zu L-Valin war zwar bei allen Enzymen messbar, lag aber nur knapp über der Nachweisgrenze der HPLC (ca. 5 μM) und konnte daher nicht quantifiziert werden (< 0,1 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein)⁻¹).

Für eine weitere Charakterisierung von AroT^{wt} und AroT^{M54L} wurde sowohl die Michaelis-Menten-Konstante (K_M -Wert) für die L-Leucinvorstufe 2-Keto-iso-capronsäure als auch die molekulare Aktivität (k_{cat} -Wert) und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) für die Umsetzung von 2-Keto-iso-capronsäure zu L-Leucin bestimmt (Tabelle 19).

Tab. 19: Katalytische Parameter für die Transaminase AroT aus *C. glutamicum* und das durch gerichtete Enzymevolution identifizierte AroT^{M54L}-Mutein

		AroT ^{wt}	AroT ^{M54L}
K_M	[mM]	167,2 ± 18,7	78,2 ± 8,4
k_{cat}	[s ⁻¹]	5,33	4,61
k_{cat} / K_M	[M ⁻¹ s ⁻¹]	31	59

Wie die Ergebnisse zeigten, hat sich der K_M -Wert von AroT für 2-Keto-iso-capronsäure durch die Mutation halbiert (78,2 mM statt 167,2 mM). Gleichzeitig ist die katalytische Effizienz von 31 auf 59 M⁻¹ s⁻¹ angestiegen. Diese generell hohen K_M -Werte und niedrigen katalytischen Effizienzen zeigten aber, dass es sich bei der L-Leucinsynthese durch AroT um eine Nebenaktivität des Enzyms handelt. Für die Berechnung der jeweiligen Wechselzahl wurden die nach der Michaelis-Menten-Gleichung mit *Microcal Origin* ermittelten Substrataffinitäten und maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten zugrunde gelegt, die aufgrund der nicht ausreichenden Substratlöslichkeit experimentell nicht belegt werden konnten. Da die theoretisch ermittelte maximale Reaktionsgeschwindigkeit für

AroT^{wt} höher war als für AroT^{M54L}, ergab sich auch eine größere Wechselzahl. Aus der größeren Affinität von AroT^{M54L} zu 2-Keto-iso-capronsäure resultierte allerdings für diese mutierte AroT-Transaminase eine höhere katalytische Effizienz im Vergleich zum Wildtyp-Enzym.

Um verstehen zu können, warum der Austausch von L-Methionin gegen L-Leucin an Position 54 der Aminosäuresequenz die katalytische Effizienz für die L-Leucinsynthese verbesserte, musste die Mutation in einem Strukturmodell dieser Transaminase lokalisiert und interpretiert werden. Da aber eine röntgenkristallographische Analyse des AroT-Proteins nicht gelang, wurde ein Modell anhand einer ähnlichen, bereits bekannten Struktur *in silico* berechnet. Das Programm *SWISS-Model* (Biozentrum der Universität Basel und Schweizerisches Institut für Bioinformatik, Basel; <http://swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html>) sucht dabei zuerst nach einer homologen Aminosäuresequenz, von der schon ein Strukturmodell erstellt worden ist. Auf Basis dieser Proteinstruktur und ausgehend von den identischen Aminosäuresequenzbereichen wird dann schrittweise ein Modell für das Protein ermittelt. Obwohl solche berechneten Proteinstrukturen im Vergleich zu experimentell erstellten Strukturmodellen wesentlich ungenauer sind, können sie helfen, eine Mutation zu lokalisieren und erste Hinweise auf deren Auswirkungen auf die Proteinstruktur und -aktivität zu liefern. Beim Erstellen der AroT-Struktur diente das Modell der L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *T. maritima* als Vorlage (PDB-Eintrag 1UU1; Fernandez *et al.*, 2004). Aufgrund der hohen Sequenzidentität zu AroT (30 %) ist das dazugehörige Gen *aroT* aus *C. glutamicum* zuerst auch fälschlicherweise als *hisC* annotiert worden. HisC aus *T. maritima* wurde auch, wie schon beschrieben, für das „*molecular replacement*“ im Rahmen der Berechnung des Strukturmodells für HisC aus *C. glutamicum* eingesetzt. Ein Modell für ein AroT-Monomer aus *C. glutamicum* ist in Abbildung 22 dargestellt. Anhand des Modells konnte die Position von Met54 genau lokalisiert werden. L-Methionin ist die letzte Aminosäure einer 12 Aminosäuren langen Schleife vor α -Helix α 3. Die Transaminase AroT aus *C. glutamicum* gehört wie HisC und HisC aus *T. maritima* strukturell zu den Klasse Ib-Transaminasen, deren Konformation sich typischerweise während der Katalyse kaum ändert (Hirotsu *et al.*, 2005).

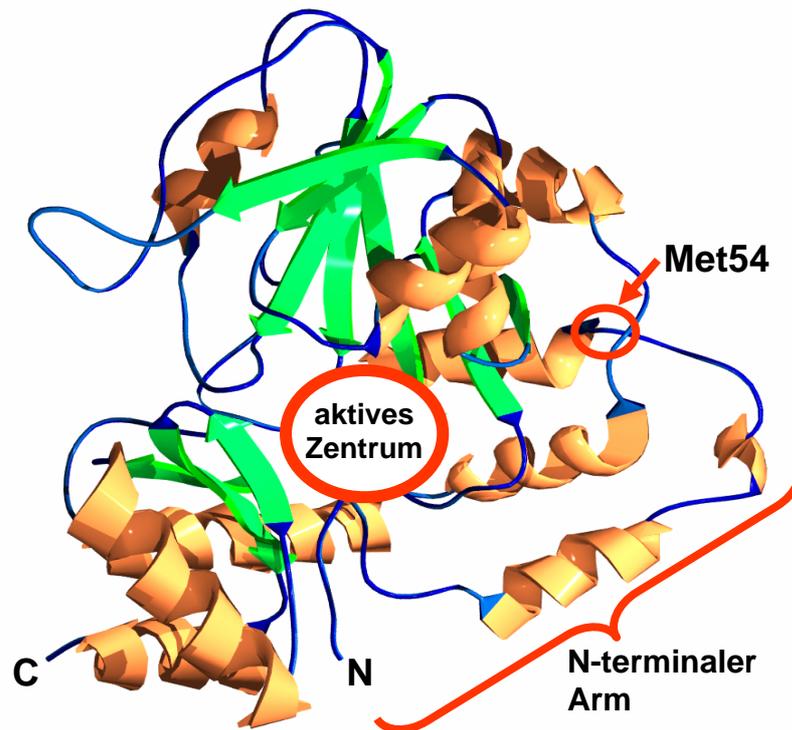


Abb. 22: Mit *SWISS-Model* erstelltes Strukturmodell eines AroT-Monomers aus *C. glutamicum*. Met54 ist rot umkreist, und die ungefähre Position des aktiven Zentrums und der N-terminale Arm sind schematisch hervorgehoben.

Lediglich der N-terminale Arm, der das aktive Zentrum abschirmt ohne aber direkt mit Aminosäureresten desselben zu interagieren, ändert seine Lage während der Katalyse. Für die AroT^{M54L}-Mutante wäre eine Konformationsänderung des N-terminalen Arms denkbar. Met54 würde wie ein Scharnier wirken, das den Arm in eine andere Konformation zwingt. Der Versuch, mit Hilfe von *Swiss Model* auch ein AroT^{M54L} Strukturmodell zu erstellen, war nicht erfolgreich. Obwohl die Aminosäuresequenz von AroT^{M54L} nur in einer Position von der Wildtypsequenz abweicht, scheiterte das Programm gerade an der Modellierung des N-terminalen Arms. Die durch Leu54 bewirkte Konformationsänderung war wahrscheinlich so groß, dass das gesamte Modell unterhalb der minimal erlaubten Zuverlässigkeit lag und deshalb durch *SWISS-Model* verworfen wurde.

Ein Alignment verschiedener, zu AroT homologer Aminosäuresequenzen zeigte, dass das L-Methionin an dieser Position nicht konserviert ist (ohne

Abbildung). Während alle *Corynebacterianae* über L-Methionin verfügen, ist diese Aminosäure in den Sequenzen der nah verwandten *Mycobacterium*-Spezies durch L-Asparaginsäure ersetzt. Die AroT-Sequenzen von *Z. mobilis* und *T. maritima* haben ein L-Serin, die von *B. subtilis* und *Pseudomonas aeruginosa* sogar nur ein L-Glycin an dieser Position. Diese große Diversität ist aber auch nicht überraschend, da keine Aminosäure des N-terminalen Armes konserviert und seine Konformation generell sehr flexibel ist. Lediglich die grundlegende Aufgabe, das aktive Zentrum gegenüber der wässrigen Umgebung abzuschirmen, wird durch die N-terminalen Arme aller Transaminasen der Klasse Ib erfüllt (Hirotsu *et al.*, 2005).

4. Verbesserung der mikrobiellen L-Valinproduktion mit *C. glutamicum*

Da Transaminasen an der Biosynthese der Aminosäure L-Valin beteiligt sind, sollte die Frage geklärt werden, inwieweit ein entsprechender *C. glutamicum*-Produktionsstamm durch Veränderung von Transaminase-Aktivitäten verbessert werden kann. Seit einigen Jahren steht der als VAL1 bezeichnete Stamm *C. glutamicum* 13032 $\Delta ilvA \Delta panBC$ pJC1*ilvBNCD* für die mikrobielle Produktion von L-Valin zur Verfügung (Radmacher *et al.*, 2002). Im Verlaufe der L-Valinbildung mit diesem Stamm ist die Akkumulation des Nebenprodukts L-Alanin im Kulturüberstand ein großes Problem (Information AMINO GmbH). Dies liegt in der strukturellen Ähnlichkeit der beiden Aminosäuren begründet, die die Aufreinigung von L-Valin im Anschluss an die Fermentation sehr aufwendig und kostenintensiv macht. Da L-Alanin in nur einem transaminase-katalysierten Schritt aus der L-Valinvorstufe Pyruvat gebildet wird, lag es nahe, die Bildung dieses Nebenproduktes durch Deletion einzelner oder mehrerer Transaminase-Gene zu verringern.

4.1 Deletion von *avtA* und *alaT* in VAL1 und Experimente zur Produktbildung

Bei der Charakterisierung der Transaminasen aus *C. glutamicum* erwiesen sich die Transaminase C (AvtA) und die L-Alanin-Transaminase (AlaT) als die beiden einzigen Enzyme, die *in vivo* an der Synthese von L-Alanin beteiligt sind. Um zu überprüfen, inwieweit sich der Verlust der Enzymaktivitäten von AvtA und AlaT auf die L-Valin und L-Alaninbildung mit VAL1 auswirkt, wurden die entsprechenden Gene jeweils einzeln und gemeinsam in VAL1 deletiert. Die so konstruierten Stämme *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panBC \underline{\Delta alaT}$ pJC1*ilvBNCD* (VAL1 $\Delta alaT$), *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panBC \underline{\Delta avtA}$ pJC1*ilvBNCD* (VAL1 $\Delta avtA$) und *C. glutamicum* $\Delta ilvA \Delta panBC \underline{\Delta alaT} \underline{\Delta avtA}$ pJC1*ilvBNCD* (VAL1 $\Delta alaT \Delta avtA$) wurden in Schüttelkolben auf CGXII-Minimalmedium bezüglich des Wachstums sowie der L-Alanin- und L-Valinbildung mit dem Ausgangsstamm verglichen (Abbildungen 23 bis 25). Die durch die genetischen Veränderungen bedingte L-Isoleucin- und D-Pantothensäureauxotrophie von VAL1 wurde durch Zugabe von 3,4 mM L-Isoleucin und 3 μ M D-Pantothensäure supplementiert.

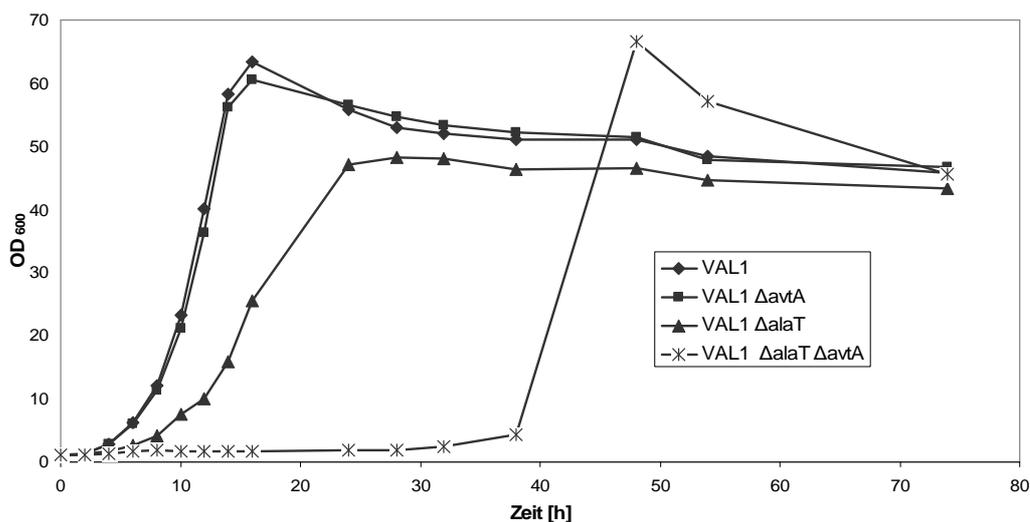


Abb. 23: Wachstum von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$, *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ und *C. glutamicum* $\Delta alaT \Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in Minimalmedium im Schüttelkolben

Die $\Delta alaT$ -Mutante erreichte erst nach 28 Stunden die maximale optische Dichte von 48. Für die $\Delta alaT \Delta avtA$ -Doppelmutante, die im genetischen Hintergrund des Wildtyps L-Alanin-auxotroph ist, war erst nach 36 Stunden ein Wachstum photometrisch nachweisbar. Das dann exponentiell erfolgende Wachstum war überraschend. Eine Kontroll-PCR bestätigte aber die Identität der Doppelmutante, und auch eine Kontamination der Kultur konnte ausgeschlossen werden. Wurde die VAL1 $\Delta alaT \Delta avtA$ -Mutante aus dieser exponentiellen Phase auf neues CGXII-Minimalmedium überimpft, war erneut eine, nun allerdings auf etwa 16 Stunden verkürzte, Phase ohne erkennbares Wachstum zu beobachten. Möglicherweise ist eine spezielle Suppressor-mutante entstanden, die z. B. einer chromosomal kodierten Transaminase eine begrenzte L-Alaninbildung ermöglicht.

Wie der Vergleich der L-Alaninkonzentration aller vier VAL1-Stämme zeigte, bildeten alle drei Stämme mit modifizierter Transaminase-Aktivität weniger L-Alanin (Abbildung 24).

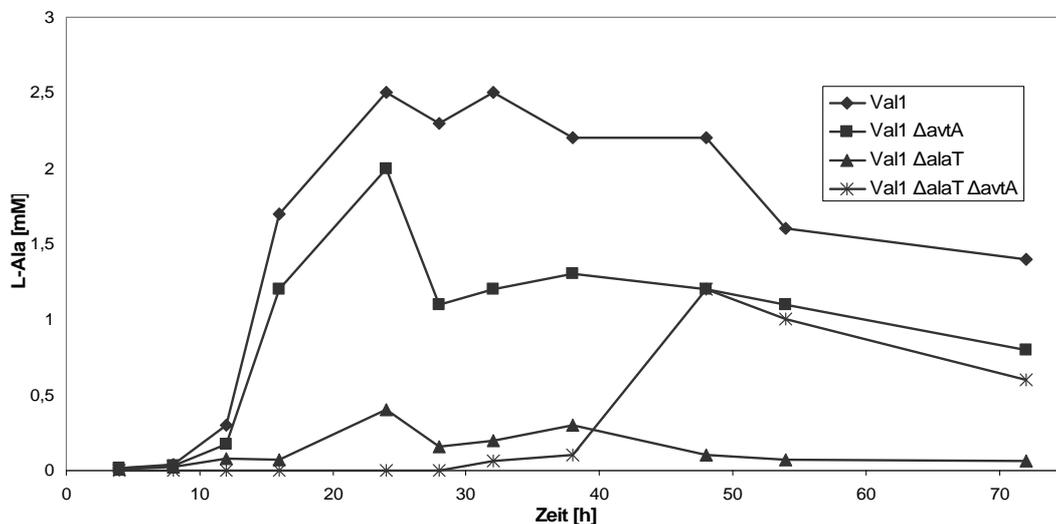


Abb. 24: L-Alaninbildung von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$, *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ und *C. glutamicum* $\Delta alaT \Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in Minimalmedium im Schüttelkolben

Während VAL1 maximal 2,5 mM L-Alanin akkumulierte, war für VAL1 $\Delta avtA$ maximal 2 mM und für VAL1 $\Delta alaT$ lediglich 0,4 mM dieser Aminosäure nachweisbar. Im Falle von VAL1 $\Delta alaT$ konnte die Bildung des Nebenproduktes also um etwa 80 % reduziert werden.

Beim Vergleich der L-Valinakkumulation im Kulturüberstand fiel sofort auf, dass alle drei neu konstruierten VAL1-Stämme mehr L-Valin als der Vergleichstamm bilden konnten (Abbildung 25).

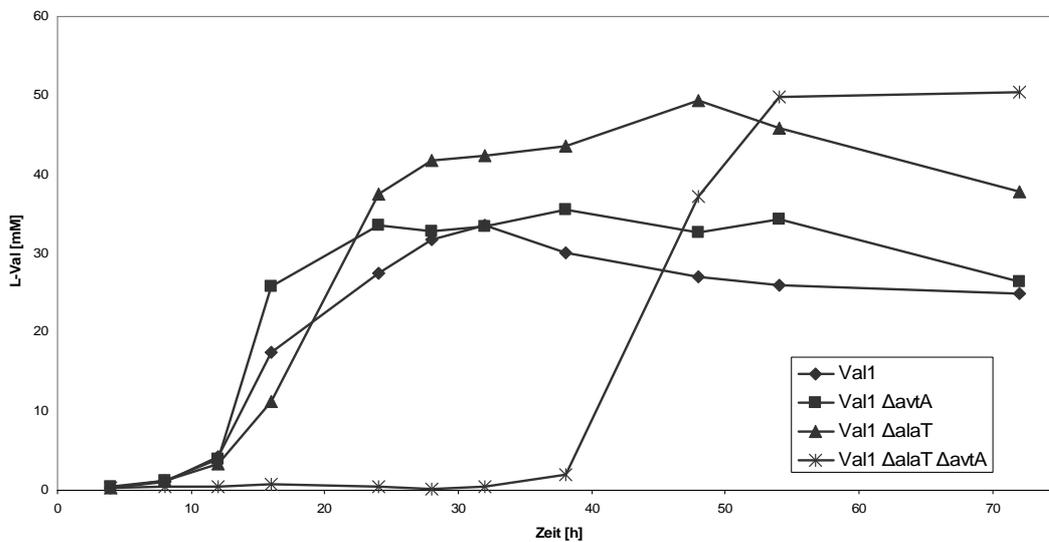


Abb. 25: L-Valinbildung von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$, *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ und *C. glutamicum* $\Delta alaT \Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in Minimalmedium im Schüttelkolben

Der Stamm VAL1 $\Delta avtA$ akkumulierte L-Valin bis zu einer Konzentration von 35,5 mM und VAL1 $\Delta alaT$ bis zu 49,4 mM in das Medium, während im Kulturüberstand von VAL1 nur 33,6 mM dieser Aminosäure nachgewiesen werden konnten. Im Fall von VAL1 $\Delta alaT$ war diese Steigerung um etwa 40 % sogar noch erstaunlicher, wenn man das schlechtere Wachstum im Vergleich zu VAL1 und VAL1 $\Delta avtA$ berücksichtigt. Die L-Valinkonzentration im Medium der VAL1 $\Delta alaT \Delta avtA$ -Mutante stieg parallel zum Wachstum des Stammes an und erreichte mit 50,5 mM ungefähr die gleiche Endkonzentration wie VAL1 $\Delta alaT$. Die Reduktion der Nebenproduktbildung war also stets mit einem

Anstieg der Produktkonzentration verbunden, da vermutlich weniger Pyruvat zu L-Alanin transaminiert wurde und stattdessen zu L-Valin umgesetzt werden konnte.

4.2 Kultivierung der VAL1-Stämme unter *batch*-Bedingungen

Um zu überprüfen, inwieweit sich die in den Schüttelkolbenexperimenten beobachtete Reduktion der L-Alaninbildung bei gleichzeitig erhöhter L-Valinakkumulation auf eine *batch*-Fermentation übertragen lässt, wurden die Stämme VAL1, VAL1 $\Delta avtA$ und zwei unabhängig voneinander konstruierte VAL1 $\Delta alaT$ -Klone in einer „SIXFORS-Vario“-Anlage kultiviert. Für die Fermentationen fand das gleiche CGXII-Medium wie bei den Schüttelkolbenexperimenten Verwendung. Aufgrund der automatischen pH-Kontrolle konnte aber auf Zugabe von 3-(*N*-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) verzichtet werden. Vor Fermentationsbeginn wurden die Bioreaktoren, die bereits mit 1250 ml ungepuffertem CGXII-Minimalmedium ohne Glucose und den übrigen Medienzusätzen befüllt waren, mit Sensoren, Elektroden, Zufuhrstrecken und erforderlichen Anschlüssen autoklaviert. Nach dem Abkühlen der Fermenter auf Raumtemperatur, wurde den Rührkesseln 225 g einer 10 %igen Glucoselösung mit Spurensalzen, Biotin, CaCl₂, L-Isoleucin (Endkonzentration 3,4 mM), Pantothenat (Endkonzentration 3 μ M) und Kanamycin (Endkonzentration 25 mg/l) über eine sterile Verbindung zugeführt. Das vorgelegte Fermentationsmedium wurde mit 3 % (v/v) Vorkultur beimpft.

Beim Vergleich des Wachstums der drei VAL1-Stämme war kein größerer Unterschied zu den Schüttelkolbenexperimenten erkennbar (Abbildung 26).

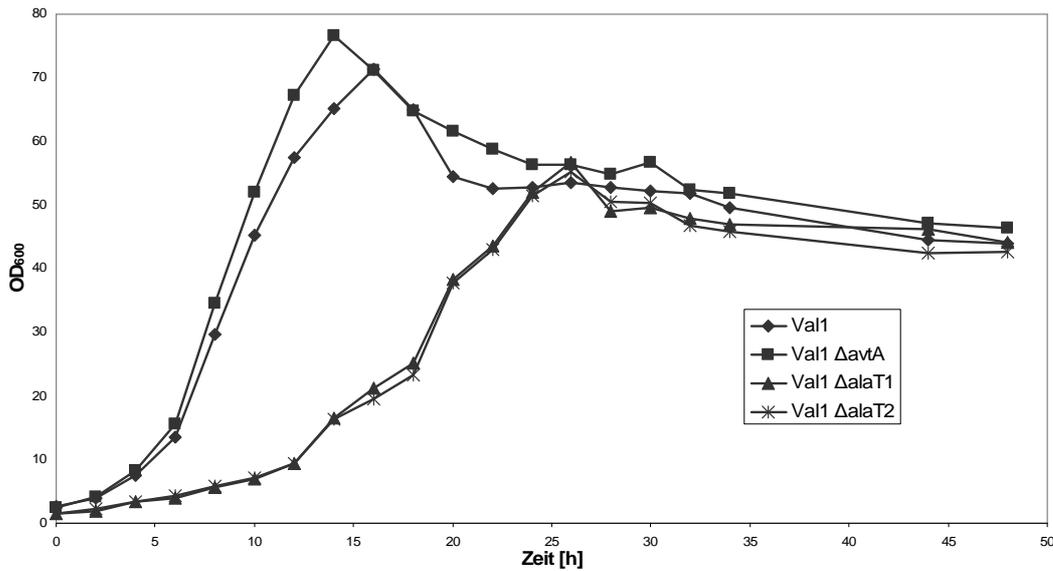


Abb. 26: Wachstum von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$ und *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in einer *batch*-Fermentation

Die beiden Stämme VAL1 und VAL1 $\Delta avtA$ wuchsen mit fast gleicher Geschwindigkeit bis zu einer maximalen optische Dichte von 76,6 bzw. 72,2, die sie nach 14 bzw. 16 Stunden erlangten. Beide VAL1 $\Delta alaT$ -Klone wuchsen erneut schlechter als diese beiden Vergleichsstämme und erreichten erst nach 26 Stunden eine optische Dichte von 56,8 bzw. 55,2. Alle Zelldichten waren höher als im Schüttelkolben, was auf die bessere Begasung und die allgemein stabileren Kultivierungsbedingungen zurückzuführen war.

Nicht nur das Wachstum, sondern auch die ermittelten L-Valinkonzentrationen im Kulturüberstand waren bei VAL1 $\Delta avtA$ gegenüber der Kontrolle leicht erhöht (Abbildung 27).

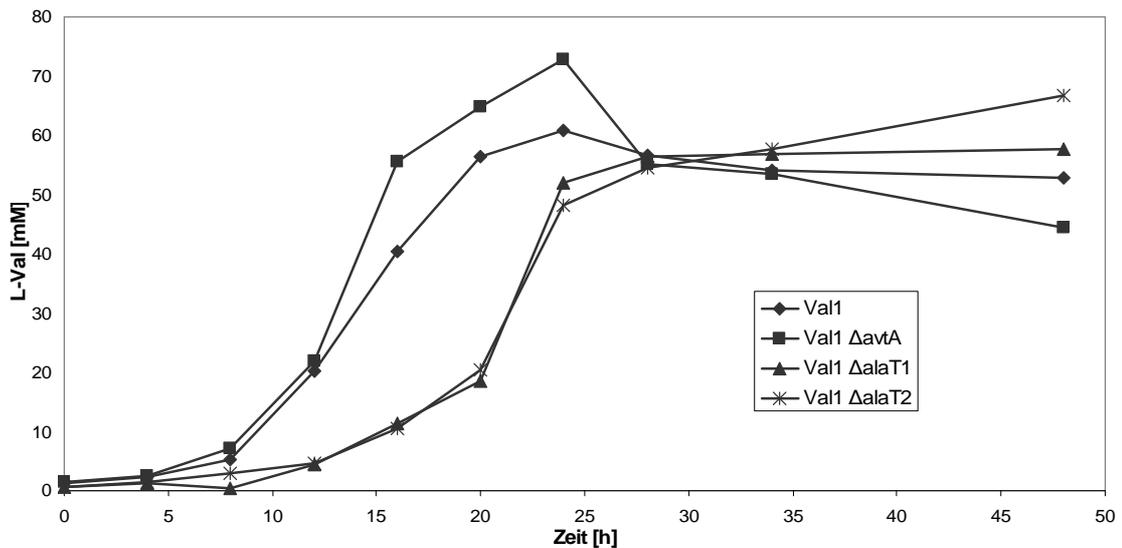


Abb. 27: L-Valinbildung von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$ und *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in einer *batch*-Fermentation

Nach 24 Stunden Fermentation hatte der Stamm VAL1 $\Delta avtA$ L-Valin bis zu einer Konzentration von 72,9 mM akkumuliert. Zum selben Zeitpunkt erreichte auch der VAL1-Vergleichsstamm sein Produktionsmaximum, das jedoch nur bei 60,8 mM L-Valin lag. Der Verlust der Transaminase C-Aktivität führte also zu einer um etwa 20 % erhöhten Produktbildung. War das Gen *alaT* im VAL1-Hintergrund deletiert, so konnte trotz einem im Vergleich zum Ausgangsstamm schlechteren Wachstum nach 48 Stunden eine L-Valinkonzentration von 66,7 bzw. 57,6 mM erreicht werden. Mit diesen Konzentrationen lagen beide Klone, unter dem Ergebnis der Schüttelkolbenexperimente, bei denen eine um 40 % erhöhte L-Valinkonzentration gemessen werden konnte.

Beim Vergleich der L-Alaninbildung (Abbildung 28) hatte die Deletion der beiden Transaminase-Gene denselben Effekt wie bei dem zuvor durchgeführten Schüttelkolbenexperiment. Auch unter Fermentationsbedingungen akkumulierte VAL1 ohne Deletion das meiste L-Alanin (1,23 mM). Beim VAL1 $\Delta avtA$ -Stamm war die Konzentration dieses Nebenproduktes um 20 % auf 0,98 mM reduziert. Dies entsprach genau dem Ergebnis der Schüttelkolbenexperimente, bei dem ebenfalls durch Verlust der Transaminase C-Aktivität eine Reduktion um 20 % erreicht werden konnte (2 statt 2,5 mM).

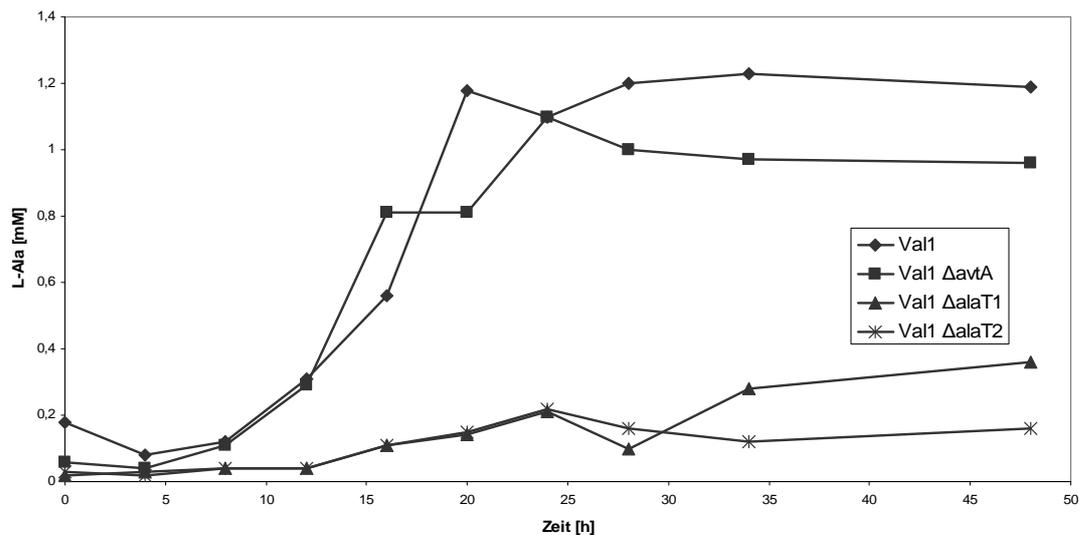


Abb. 28: L-Alaninbildung von *C. glutamicum* VAL1 $\Delta alaT$ und *C. glutamicum* VAL1 $\Delta avtA$ verglichen mit dem Ausgangsstamm *C. glutamicum* VAL1 in einer *batch*-Fermentation

Durch Deletion des Gens für die L-Alanin-Transaminase war kaum noch L-Alanin im Kulturüberstand nachweisbar. Die beiden Klone akkumulierten maximal 0,36 bzw. 0,22 mM des Nebenproduktes und damit durchschnittlich 75 % weniger L-Alanin. Da das bei der Fermentation verwendete CGXII-Minimalmedium gegenüber dem Schüttelkolbenexperiment kaum verändert worden war, besteht durchaus die Möglichkeit, die Wachstums- und Aminosäureproduktionsbedingungen der VAL1-Stämme durch eine Modifizierung des Mediums noch weiter zu verbessern.

Wie die Ergebnisse des *batch*-Fermentationsversuches zeigten, konnte durch Deletion von *avtA*, besonders aber durch den Verlust der *alaT*-Aktivität, die Nebenproduktbildung sehr effektiv verringert werden. Gleichzeitig war die L-Valinkonzentration unter Berücksichtigung des schlechteren Wachstums der $\Delta alaT$ -Mutante bei beiden Transaminase-Mutanten leicht erhöht.

IV. DISKUSSION

1. Identifizierung und Charakterisierung der Transaminasen aus *C. glutamicum*

Obwohl *C. glutamicum* schon seit fünfzig Jahren für die mikrobielle Produktion von Aminosäuren eingesetzt wird (Leuchtenberger *et al.*, 2005), war bislang relativ wenig über die an den jeweiligen Biosynthesewegen beteiligten Transaminasen bekannt. Grund dafür ist, dass es in Prokaryonten generell sehr viele dieser Enzyme gibt, die sich in ihrer Sequenz und Struktur sehr ähnlich sind und deren Substratspektren sich zudem noch überlappen (Jensen und Calhoun, 1981; Christen und Metzler 1985). Während in *E. coli* sechzehn Transaminasen bekannt sind („Cluster of Orthologous Genes“-Database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>), wurden in *C. glutamicum* erst sechs Gene beschrieben, die für diese Enzyme kodieren. Erst mit neuesten bioinformatischen Methoden konnten in einer genomweite Suche nach weiteren Transaminasen in *C. glutamicum* noch vierzehn weitere Gene identifiziert werden, die Transaminase-Motive aufweisen (McHardy *et al.*, 2003).

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Identifizierung der Transaminasen aus *C. glutamicum* konnte den Genprodukten von fünf dieser vierzehn Gene eindeutig eine Transaminase-Funktion zugeordnet werden. So gelang es anhand eines systematischen *in vitro*-Aktivitäts-Screenings *avtA* als Transaminase-Gen zu identifizieren, was alleine durch die Suche nach Sequenzhomologien zu gleichen Genen aus anderen Organismen nicht möglich gewesen wäre. Die durch dieses Gen kodierte Transaminase AvtA, die in *E. coli* auch als Transaminase C bezeichnet wird (Whalen und Berg, 1982), zeichnet sich dadurch aus, dass sie als einzige Transaminase *in vivo* lediglich L-Alanin und nicht L-Glutaminsäure als Aminodonor nutzen kann. Aufgrund dieser besonderen Eigenschaft wurde diese Transaminase-Aktivität auch erstmals in Rohextrakten von *C. glutamicum* durch Leyval *et al.* (2003) beschrieben. Eine Zuordnung zu einem Gen stand für

diese Aktivität aber noch aus. Die Transaminase C zeigte bei *in vitro*-Tests Enzymaktivitäten für die Bildung der drei verzweigtkettigen Aminosäuren, wobei die spezifische Aktivität für die Synthese von L-Valin mit $18,2 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ am höchsten war. (Ein Vergleich mit Literaturwerten anderer AvtA-Enzyme ist nicht möglich, da eine derartige Transaminase zum ersten Mal in Enzymtests untersucht worden ist.) AvtA ist auch *in vivo* an der Synthese von L-Valin beteiligt, da eine Mutante ohne IlvE-Aktivität in einer *avtA*-Deletionsmutante eine L-Valin-Auxotrophie zeigte. Für die anderen beiden verzweigtkettigen Aminosäuren L-Leucin und L-Isoleucin war schon die Deletion von *ilvE* alleine ausreichend, damit *C. glutamicum* nur noch durch Supplementation dieser beiden Substanzen wachsen konnte.

Die schon bekannte Transaminase IlvE (Radmacher *et al.*, 2002) zeigte erwartungsgemäß hohe spezifische Aktivitäten für die Umsetzung aller drei α -Ketosäuren zu den entsprechenden verzweigtkettigen Aminosäuren. Für IlvE aus *E. coli* konnte für die Bildung von L-Isoleucin mit $30 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ die höchste spezifische Aktivität nachgewiesen werden (Lee-Peng *et al.*, 1979). Die Aktivitäten für die L-Leucin- und L-Valin-Bildung waren im Vergleich dazu etwas geringer ($27,7$ bzw. $20,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$) (Lee-Peng *et al.*, 1979). Die etwas höheren Werte sind allerdings auf veränderte Enzymtestbedingungen zurückzuführen.

Während in *C. glutamicum* nur IlvE und AvtA die drei verzweigtkettigen Aminosäuren synthetisieren können, ist in *E. coli* zusätzlich noch die Transaminase TyrB an der L-Leucin-Bildung beteiligt (Gelfand und Steinberg, 1977). TyrB katalysiert in diesem Organismus die Aminierung der L-Leucin-vorstufe 2-Keto-iso-capronsäure mit einer Aktivität von $3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ (Powell und Morrison, 1978a). In *C. glutamicum* hingegen gibt es kein homologes Gen zu *tyrB*. Das im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Gen *aroT*, dessen Genprodukt eine mit TyrB vergleichbare Funktion ausübt, ist durch eine spezifische Aktivität von $1,3 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ mit 2-Keto-iso-capronsäure charakterisiert. Diese Aktivität von AroT reicht aber *in vivo* nicht aus, um die L-Leucin-Auxotrophie der *C. glutamicum* $\Delta ilvE$ -Mutante auf Minimalmedium zu komplementieren. Dafür ist AroT aber genau wie TyrB in *E. coli* bei der

Synthese der aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin und L-Tyrosin involviert. Zusätzlich trägt *IlvE*, genau wie in *E. coli* (Gelfand und Steinberg, 1977), zur Biosynthese dieser beiden Aminosäuren bei. Eine $\Delta\text{aroT}\Delta\text{ilvE}$ -Doppelmutante ist auf Minimalmedium nur L-Phenylalanin- und nicht L-Tyrosin-auxotroph. Da *C. glutamicum* keine Phenylalanin-4-monooxygenase besitzt wie *Pseudomonas sp.*, die in einem Schritt L-Phenylalanin zu L-Tyrosin hydroxyliert (Letendre *et al.*, 1975), muss also noch eine dritte unbekanntete Transaminase an der Bildung von L-Tyrosin beteiligt sein.

Die Deletion des *alaT*-Gens im *C. glutamicum*-Wildtyp resultierte in einem verzögerten Wachstum, das aber durch Zugabe von L-Alanin supplementiert werden konnte. Die Enzymtests mit diesem Enzym zeigten schließlich eine Aktivität für die Bildung dieser Aminosäure in Abhängigkeit von L-Glutaminsäure, L-Asparagin und α -Aminobuttersäure. Die spezifische Aktivität für die L-Alaninbildung mit L-Glutaminsäure war mit $26,6 \mu\text{mol L-Alanin min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ mit Abstand am größten und stellte gleichzeitig die höchste spezifische Aktivität dar, die *in vitro* mit einer Transaminase aus *C. glutamicum* ermittelt werden konnte. Obwohl eine AlaT-Aktivität in *E. coli*-Rohextrakten nachgewiesen worden ist (Wang *et al.*, 1987b), wurde erst vor einigen Jahren mit der L-Alanin-Transaminase des Archaeobakteriums *Pyrococcus furiosus* eine prokaryotische L-Alanin-Transaminase erstmals eingehender charakterisiert (Ward *et al.*, 2000). Dieses Enzym besitzt eine wesentlich höhere spezifische Aktivität von $158 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ als AlaT aus *C. glutamicum*. Ein möglicher Grund dafür ist, dass in *P. furiosus* in Abwesenheit eines terminalen Elektronenakzeptors Pyruvat nicht mehr zu Acetyl-CoA oxidiert werden kann und deshalb zu L-Alanin transaminiert werden muss (Kengen und Stams, 1994). Wie Enzymtests mit allen potentiellen Transaminasen zeigten, kann neben AlaT nur noch *AvtA* in *C. glutamicum* eine Transaminierungsreaktion mit den Substraten L-Alanin oder Pyruvat katalysieren. Dies konnte *in vivo* durch die L-Alanin-Auxotrophie einer $\Delta\text{alaT}\Delta\text{avtA}$ -Doppelmutante bestätigt werden.

Neben der L-Asparaginsäure-Transaminase *AspC* wurde auch noch die L-Histidinol-phosphat-Transaminase *HisC* identifiziert. Die Deletion des korrespondierenden Gens *hisC*, dass in einem Operon mit Genen des

L-Histidin-Biosynthesewegs organisiert ist, resultierte in einer L-Histidin-Auxotrophie. Im Gegensatz zu vielen anderen Transaminasen, deren Aktivitätsverlust sich aufgrund überlappender Substratspezifitäten mit anderen Enzymen ausgleichen lässt, ist die HisC-Aktivität in allen bisher studierten Organismen, wie z. B. *Bacillus subtilis* (Weigent und Nester, 1976), *S. coelicolor* (Limauro *et al.*, 1990) oder *E. coli* (Garrick-Silversmith und Hartman, 1970), für die L-Histidin-Synthese essentiell. Die kinetischen Parameter von HisC aus *C. glutamicum* sind denen von *Thermotoga maritima* sehr ähnlich (Fernandez *et al.*, 2004). So ist z. B. der ermittelte K_M -Wert für das Substrat L-Histidinolphosphat mit 0,89 mM bzw. 0,8 mM fast identisch. Größere Unterschiede gibt es allerdings zu HisC aus *Zymomonas mobilis*, für das ein K_M -Wert von lediglich 0,17 mM für dieses Substrat ermittelt wurde (Gu *et al.*, 1995). In *B. subtilis* ist HisC außerdem an der L-Phenylalanin- und L-Tyrosin-Synthese beteiligt (Nester und Montoya, 1976). Entsprechende Enzymtests mit HisC aus *C. glutamicum* zeigten, dass auch diese Transaminase mit geringer spezifischer Aktivität die beiden Aminosäuren *in vitro* synthetisieren kann. Der ausgesprochen hohe K_M -Wert von 106 mM, der zumindest für die L-Phenylalanin-Vorstufe Phenylpyruvat bestimmt wurde, macht deutlich, dass es sich bei dieser Umsetzung wohl eher um eine Nebenaktivität von HisC handelt. Aufgrund der geringen Aktivität mit den beiden aromatischen Aminosäuren ist es weiterhin fraglich, ob HisC neben IlvE und AroT zur *in vivo*-Synthese von L-Tyrosin beitragen kann. Aufschluss darüber könnten Untersuchungen mit einer entsprechenden Triple-Deletionsmutante liefern.

Die drei durch *NCgl1022*, *NCgl1184* und *sufS* kodierten Proteine, deren gelbgrüne Farbe auf dem gebundenem Co-Faktor PLP beruht, zeigten in den *in vitro*-Enzymtests keinerlei Transaminase-Aktivität. Ihrem genomischen Kontext nach handelt es sich eher um Cystein-Desulfurasen [E.C. 2.8.1.7], die eine β -Eliminierung zur Spaltung von L-Cystein zu L-Alanin und Schwefel in Form eines Enzym-Cysteinyl-persulfid-Intermediates katalysieren. Der so mobilisierte Schwefel dient dann dem Aufbau von Fe-S-Clustern und der Synthese schwefelhaltiger prosthetischer Gruppen wie z. B. Thiaminpyrophosphat und Liponsäure (Mihara und Esaki, 2002). Zumindest für *NCgl1022* und *SufS* konnte diese Vermutung durch Enzymtests bestätigt werden. Die sehr geringen

spezifischen Aktivitäten von 0,04 bzw. 0,35 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$ sind mit der Aktivität der Cystein-Desulfurase IscS aus *E. coli* (0,008 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein) $^{-1}$) durchaus vergleichbar (Outten *et al.*, 2003). Zusammen mit der Cystathionin- β -lyase MetC (Rossol und Pühler, 1992; E.C. 4.4.1.8) und der Glutamat-1-semialdehyd-2,1-aminomutase HemL (McHardy *et al.*, 2003; E.C. 5.4.3.8), die auch im Rahmen der Hidden-Markov-Modell-Analyse als potentielle Transaminasen aus dem Genom von *C. glutamicum* identifiziert wurden, konnte für fünf Enzyme keine Transaminase-Aktivität nachgewiesen werden.

Insgesamt sind elf Transaminasen aus *C. glutamicum* beschrieben. Einen Überblick zu diesen Enzymen gibt Tabelle 20.

Tab. 20: Übersicht der Transaminasen aus *C. glutamicum*

NCgl-Nummer	Gen	Enzym	Klasse*	Funktion
NCgl0215	<i>aroT</i>	Transaminase für aromatische Aminosäuren	I	Synthese aromatischer AS
NCgl0237	<i>aspT</i>	L-Asparaginsäure-Transaminase	I	L-Asparaginsäure-Synthese
NCgl0753	<i>pdxR</i>	Pyridoxamin-phosphat-Transaminase	I	PLP-Synthese
NCgl0794	<i>serC</i>	Phosphoserin-Transaminase	-	L-Serin-Synthese
NCgl1058	<i>dapC</i>	<i>N</i> -Succinyl-L,L- α,ϵ -diaminopimelinsäure-Transaminase.	I	L-Lysin-Synthese
NCgl1343	<i>argD</i>	<i>N</i> -Acetylorithine-Transaminase	II	L-Arginin-Synthese
NCgl2020	<i>hisC</i>	Histidinol-phosphat-Transaminase	I	L-Histidin-Synthese
NCgl2123	<i>ilvE</i>	Transaminase für verzweigt-kettige Aminosäuren	III	Synthese verzweigt-kettiger Aminosäuren
NCgl2510	<i>avtA</i>	Alanin-Valin-Transaminase	I	Synthese von L-Alanin und L-Valin
NCgl2515	<i>bioA</i>	7,8-diamino-pelargon-säure-Transaminase	II	Biotin-Synthese
NCgl2747	<i>alaT</i>	L-Alanin-Transaminase	I	L-Alanin-Synthese

* Klasseneinteilung nach Mehta *et al.*, 1993

Die Tatsache, dass mehreren dieser Enzyme wie z. B. AvtA und AroT erst anhand von Enzymtests und *in vivo*-Deletionsanalysen die richtige Funktion zugeordnet werden konnte, verdeutlicht die Grenzen einer allein auf Sequenzvergleichen basierenden Annotation von Transaminase-Genen (Jensen und Calhoun, 1981; Christen und Metzler, 1985). Darüber hinaus konnten die Identitäten der Transaminasen aufgeklärt werden, die an der Synthese von L-Leucin, L-Isoleucin, L-Valin, L-Phenylalanin, L-Histidin und L-Alanin beteiligt sind. Da schon bekannt war, dass SerC essentiell für die L-Serin-Synthese (Peters-Wendisch *et al.*, 2005) und die ArgD-Aktivität unentbehrlich für die L-Arginin-Synthese (Sakanyan *et al.*, 1996) ist, bleibt noch die Frage offen, welche Transaminasen neben IlvE und AroT an der L-Tyrosinbildung, und neben ArgD und DapC an der L-Lysinsynthese beteiligt sind. An der Synthese der übrigen Aminosäuren sind in Bakterien keine weiteren Transaminasen beteiligt (Christen und Metzler, 1985). Ein ähnlich komplettes Bild über alle Transaminierungsaktivitäten in einem Organismus ist bisher bestenfalls nur für *E. coli* bekannt (Jensen und Calhoun, 1981).

2. Proteinstrukturmodell für die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *Corynebacterium glutamicum*

Die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC ist nicht nur essentiell für die L-Histidin-Synthese, sondern sie besitzt zumindest *in vitro* genau wie HisC aus *Z. mobilis* (Gu *et al.*, 1995) die Fähigkeit ganz spezifisch 2-Keto-iso-capronsäure zu L-Leucin zu transaminieren. Die spezifische Aktivität für die L-Leucin-Bildung beträgt $1,4 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$, während HisC aus *Z. mobilis* diese Reaktion in umgekehrter Richtung mit einer spezifischen Aktivität von nur $0,06 \mu\text{mol min}^{-1} (\text{mg Protein})^{-1}$ katalysiert (Gu *et al.*, 1995). Um einen Einblick in das aktive Zentrum von HisC zu erhalten und mehr über die Bedeutung einzelner Aminosäurereste bei der Reaktion zu erfahren, wurde das Protein zunächst unter drei verschiedenen Bedingungen kristallisiert. Anhand der aufgenommenen Röntgenbeugungsmuster der drei Kristalle wurden dann erstmals Proteinstrukturmodelle für eine Transaminase aus *C. glutamicum*

erstellt. Insgesamt konnten 364 von 366 Aminosäurebausteinen von HisC modelliert werden. Lediglich die beiden N-terminale Aminosäuren fehlten. Diese Komplexität unterscheidet die Modelle ganz klar von den bereits berechneten Strukturen von HisC aus *E. coli* und *T. maritima*, in denen 17 bzw. 7 Aminosäuren aufgrund unzureichender Elektronendichtekarten bei der Modellierung unberücksichtigt bleiben mussten (Fernandez *et al.*, 2004).

Für die Kristallisation von Apo-HisC wurde HisC als Fusionsprotein mit einem C-terminalen *Strep*-Tag II[®] eingesetzt, der an der Packung der Proteine im Kristall partizipierte und so die Proteinstruktur veränderte. Der *Strep*-Tag II[®] für Affinitätschromatographie fiel auch bei der systematischen Untersuchung des Einflusses solcher Tags auf die Kristallisationseigenschaften des Maltodextrin-Bindeproteins negativ auf (Bucher *et al.*, 2002). Andererseits wurden aber schon viele Strukturmodelle veröffentlicht, für die zuvor Proteine mit diesem Tag kristallisiert worden sind (Ostermeier *et al.*, 1996, Breitingen *et al.*, 2001).

Sowohl von der Sequenz als auch der Struktur her ist die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC aus *T. maritima* (Fernandez *et al.*, 2004) das zu HisC aus *C. glutamicum* ähnlichste Enzym. Das um dreißig Aminosäuren längere Protein aus *C. glutamicum* besitzt im Vergleich zum Enzym aus *T. maritima* eine zusätzliche α -Helix (Met150-Glu155) in der PLP-Bindedomäne, die aber für die Katalyse wahrscheinlich ohne Bedeutung ist. Die an der Fixierung des Cofaktors im aktiven Zentrum beteiligten Aminosäurereste von Tyr63, Asn172, Asp197, Tyr200, Lys228 und Arg236 sind in allen Klasse I-Transaminasen konserviert (Sivaraman *et al.*, 2001). Die Aminosäurereste von Tyr21, Tyr123, Arg224, Thr225 und Arg333, die an der Stabilisierung von L-Histidinol-phosphat beteiligt sind, sind nur in L-Histidinol-phosphat-Transaminasen konserviert (Mehta *et al.*, 1989).

Die Charakterisierung von elf verschiedenen HisC-Muteinen mit jeweils einer Mutation an den konservierten Positionen Tyr21 und Tyr123 oder den eher flexiblen Positionen Asn99 und Tyr257 zeigte, dass schon kleinste Veränderungen im umfangreichen H-Brückennetzwerk zu einem drastischen Aktivitätsverlust von HisC führten. Eine Ausnahme bildete der Austausch von Tyr123 gegen Phe123. Durch ein L-Phenylalanin an dieser Position war die

spezifische Aktivität für die Umsetzung von 4-Hydroxy-phenylpyruvat zu L-Tyrosin fast verdoppelt (0,9 gegenüber 0,5 $\mu\text{mol min}^{-1}$ (mg Protein^{-1})). Dadurch konnte die Vermutung von Sivaraman *et al.* (2001) bestätigt werden, nach der Phe123 zur breiteren Substratspezifität für aromatische Aminosäuren beitragen könnte. Dieses ist zuvor für die HisC-Proteine aus *Z. mobilis* und *B. subtilis* beschrieben worden, die ein L-Phenylalanin an dieser Position tragen (Gu *et al.*, 1995; Weigent und Nester, 1976). Warum HisC aus *C. glutamicum* *in vitro* L-Leucin und nicht die strukturell sehr ähnlichen Aminosäuren L-Isoleucin und L-Valin bilden kann bleibt vollkommen unklar. Wie die genaue Modellierung von L-Leucin in das aktive Zentrum mit der Stabilisierung der Carboxylgruppe zeigte, gibt es aufgrund der kleinen Seitenkette dieser Aminosäure keinerlei hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäureresten des aktiven Zentrums, die eine Präferenz für L-Leucin erklären könnten.

3. Gerichtete Enzymevolution von AroT

Durch gerichtete Enzymevolution kann eine Vielzahl katalytischer Eigenschaften von Transaminasen, wie z. B. die Aktivität oder das Substratspektrum verändert werden. So gelang es z. B. die L-Asparaginsäure-Transaminase AspC aus *E. coli* in eine L-Tyrosin-Transaminase umzuwandeln (Rothman und Kirsch, 2003; Rothman *et al.*, 2004). Durch sechs Aminosäureaustausche konnte dieselbe Transaminase auch so verändert werden, dass das Enzym β -verzweigte Aminosäuren umsetzen konnte (Yano *et al.*, 1998).

Genau wie HisC kann auch AroT aus *C. glutamicum* *in vitro* nur L-Leucin als einzige verzweigt-kettige Aminosäure synthetisieren. Eine mittels *error-prone*-PCR geschaffene AroT-Variante konnte die L-Leucin-Auxotrophie einer *C. glutamicum* Δ ilvE-Mutante komplementieren. Lediglich eine einzige Aminosäure-Substitution Met54 \rightarrow Leu54 bewirkte eine Halbierung des K_M -Wertes (167,2 mM gegenüber 78,2 mM) und eine Verdopplung der katalytischen Effizienz ($59 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ gegenüber $31 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) gegenüber dem Wildtyp-Enzym. Anhand eines berechneten Strukturmodells konnte die Mutation am Ende des N-terminalen flexiblen Arms lokalisiert werden, der das aktive Zentrum

gegenüber dem umgebenden Milieu abschirmt. Da die computergestützte Modellierung der AroT^{M54L}-Variante wahrscheinlich aufgrund größerer Konformationsänderungen scheiterte, bleibt die strukturelle Konsequenz des Aminosäureaustauschs vorerst unklar. Trotzdem veranschaulicht die Identifizierung der AroT^{M54L}-Variante den Vorteil einer gerichteten Enzym-evolution gegenüber dem rationalen Proteindesign, wenn ein geeignetes Screening-System verfügbar ist. Die so weit vom aktiven Zentrum entfernte M54L-Mutation hätte schließlich nicht als vorteilhaft erkannt werden können, da detaillierte Kenntnisse über die Struktur-/Funktionsbeziehungen für Modell-Proteine der Klasse der Ib-Transaminasen nicht vorliegen (Oue *et al.*, 1999, Rothman *et al.*, 2004).

Trotz der hohen Zahl getesteter Klone konnte keine HisC –Variante und nur eine AroT – Variante mit erhöhter L-Leucinaktivität identifiziert werden. Dies könnte auf die vielfältigen Einschränkungen der *error-prone*-PCR-Methode zurückzuführen sein. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes resultiert nur etwa ein Drittel aller Punktmutationen letztendlich in einer Aminosäuresubstitution (Jäger *et al.*, 2001). Außerdem ist der Austausch von zwei oder drei direkt benachbarter Basen in einem Codon sehr unwahrscheinlich, wodurch sich die Anzahl der möglichen Aminosäureaustausche noch weiter reduziert. Zusätzlich wird diese Zahl trotz Verwendung optimierter *error-prone*-PCR-Bedingungen dadurch vermindert, dass die *Tag*-Polymerase viel mehr Transitionen (Austausch: Purinbase → Purinbase; Pyrimidinbase → Pyrimidinbase) als Transversionen (Austausch Purinbase → Pyrimidinbase; Pyrimidinbase → Purinbase) verursacht (Leung *et al.*, 1989; Moore und Arnold, 1996). Eine der vielen, wenn auch aufwendigen Methoden, diese Limitierungen der *error-prone*-PCR größtenteils zu umgehen würde die Durchführung einer Sequenz-Sättigungsmutagenese (SeSaM) bieten, mit der eine gegebene Nukleotidsequenz zufälliger mutiert werden kann (Wong *et al.*, 2004).

Um noch andere Mutationen an Position 54 der Aminosäuresequenz von AroT zu identifizieren, die die enzymkinetischen Parameter für die Transaminierung von 2-Keto-iso-capronsäure zu L-Leucin weiter verbessern würden, wäre es möglich eine positionsspezifische Sättigungsmutagenese durchzuführen (Jäger

et al., 2001). Durch diese PCR-Methode könnte das Met54 durch alle proteinogenen Aminosäuren ersetzt werden. Allerdings müsste in diesem Zusammenhang das Selektionssystem verbessert werden, da die Wachstumsunterschiede auf Minimalmedium nur schwer zu erkennen sind.

4. Verbesserung der L-Valinbildung mit *C. glutamicum* durch Deletion der Gene für die Alanin-Transaminase (*alaT*) und die Transaminase C (*avtA*)

Bei der mikrobiellen Bildung von L-Valin mit *C. glutamicum* wird L-Alanin als unerwünschtes und von L-Valin schwer abtrennbares Nebenprodukt gebildet (Radmacher *et al.*, 2002). Durch Deletion von *alaT* und *avtA*, deren Proteine als einzige Pyruvat zu L-Alanin transaminieren können, konnte die Akkumulation von L-Alanin im Kulturüberstand entscheidend verringert werden. In Schüttelkolbenexperimenten wurde die Nebenproduktkonzentration im Vergleich zum Ausgangstamm (2,5 mM) durch Deletion von *avtA* um 20 % (auf 2 mM) und durch Deletion von *alaT* sogar um ca. 80 % (auf 0,4 mM) gesenkt. Gleichzeitig war die L-Valinkonzentration bei beiden Stämmen erhöht, wahrscheinlich weil weniger Pyruvat in Richtung L-Alanin umgesetzt wurde und so für die L-Valinbildung zur Verfügung stand. Dass trotz Verlust der AvtA-Aktivität, die *in vivo* für L-Valinsynthese mitverantwortlich ist, mehr L-Valin gebildet wird, liegt im überlappenden Substratspektrum von IlvE und AvtA begründet. Diese sich überschneidenden Enzymaktivitäten beider Enzyme sind auch schon in *E. coli* und *Salmonella typhimurium* beschrieben worden (Whalen und Berg, 1982; Berg *et al.*, 1983). Die eigentliche Rolle von AvtA ist allerdings noch nicht bekannt oder erkennbar (Whalen und Berg, 1982). Da aber in *E. coli* eine Repression der *avtA*-Expression durch L-Alanin beschrieben wurde (Falkinham 1979; Whalen und Berg, 1982), ist anzunehmen, dass die primäre Rolle von AvtA in der L-Alaninsynthese zu suchen ist (Wang *et al.*, 1987a).

Die Reduktion der Nebenproduktbildung bei gleichzeitig erhöhter L-Valinakkumulation konnte auf eine *batch*-Fermentation im 1,5 L-Maßstab übertragen werden, die einer den industriellen Produktionsbedingungen sehr ähnlichen

Kultivierungsform entspricht. Der Produktionsstamm ohne AvtA sekretierte hierbei 20 % weniger, während der Stamm mit Deletion von *alaT* sogar 75 % weniger L-Alanin in der Fermentationsbrühe akkumulierte. Mit der L-Alanin-Transaminase AlaT in *C. glutamicum* könnte nun erstmals ein solches Enzym eine biotechnologische Anwendung finden.

V. ZUSAMMENFASSUNG

In den Synthesewegen der meisten Aminosäuren katalysieren Transaminasen reversibel den Transfer einer Aminogruppe von einer α -Aminosäure zu einer α -Ketosäure. Diese Enzyme sind untereinander durch hohe Sequenzhomologien, eine sehr ähnliche Struktur und überlappende Substratspezifitäten gekennzeichnet. Ziel der Arbeit war es, detaillierte Kenntnisse zur Funktion und Struktur der Transaminasen in *Corynebacterium glutamicum* mit besonderem Augenmerk auf die an der verzweigt-kettigen Aminosäuresynthese beteiligten Enzyme, zu erarbeiten.

Insgesamt wurden zwanzig Proteine mit Transaminasemotiv isoliert und *in vitro* bezüglich ihres Substratspektrums charakterisiert. Zusätzlich wurde die *in vivo* Funktion durch chromosomale Deletionen untersucht. Auf diese Weise gelang es unter anderem, die L-Alanin-Transaminase AlaT und die für die Lysinbildung wichtige Aspartat-Transaminase AspC zu identifizieren. Darüber hinaus konnte zwei Proteinen eine Funktion als Cystein-Desulfurasen zugeordnet werden, die an der Synthese von FeS-Clustern beteiligt sind.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass die Transaminase für die verzweigt-kettigen Aminosäuren IlvE *in vitro* mit vergleichbarer spezifischer Aktivität von 9,6 - 13,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (Protein)}^{-1}$ die L-Leucin, L-Isoleucin- und L-Valin-Bildung katalysiert. *In vivo* ist das Enzym aber nur für die L-Isoleucin- und L-Leucin-Synthese essentiell. Als weitere Transaminase für die Synthese der verzweigt-kettigen Aminosäuren konnte die Alanin-Valin Transaminase AvtA identifiziert werden. Das Enzym verwendet ausschließlich L-Alanin als Aminodonor und katalysiert mit einer hohen spezifischen Aktivität von 18,2 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (Protein)}^{-1}$ die Bildung von L-Valin. Diese Aktivität ermöglicht in *ilvE*-Deletionsmutanten die L-Valinsynthese.

Die Transaminase AroT katalysiert die Bildung von L-Phenylalanin und L-Tyrosin. Interessanterweise setzt AroT mit weniger als 10 % der spezifischen Aktivität gegenüber Phenylpyruvat auch 2-Keto-isocaproensäure zu L-Leucin um, nicht aber die Vorstufen von L-Isoleucin oder L-Valin. Durch gerichtete Enzymevolution gelang es, ein AroT-Mutein mit der Mutation M54L zu isolieren, welches 2-Keto-isocaproensäure mit nahezu verdoppelter katalytischer Effizienz von 59 $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ umsetzt.

Die L-Histidinol-phosphat-Transaminase HisC wurde kristallisiert, und es wurde ein Strukturmodell bei einer maximalen Auflösung von 1,8 Å bestimmt. Dieses Modell umfasste 364 von 366 Aminosäuren und gab in Verbindung mit Mutationen im aktiven Zentrum Aufschluss über die an der Katalyse beteiligten Aminosäurereste. Während die meisten Mutationen zu einer verminderten Aktivität führten, verdoppelte sich die spezifische Aktivität für die L-Tyrosinbildung von 0,5 auf 0,9 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg (Protein)}^{-1}$ wenn Tyr123 durch Phe ersetzt wurde.

Bei der biotechnologischen Produktion von L-Valin mit *C. glutamicum* wird L-Alanin als Nebenprodukt gebildet. Durch einzelne Deletion der Gene für die Transaminase C (*avtA*) und die L-Alanin-Transaminase (*alaT*) mit L-Alanin-Spezifität konnte in einem L-Valin-Produktionsstamm eine Verringerung der L-Alaninakkumulation bei gleichzeitig erhöhter L-Valinbildung erreicht werden. Bei einer *batch*-Fermentation zeigte sich, dass die L-Alaninkonzentration im Kulturüberstand durch Verlust der AlaT-Aktivität um 75 % reduziert werden konnte.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

- Abe S., Takayama, K. I. and Kinoshita S. (1967).** Taxonomical studies on glutamic acid-producing bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **13**: 279-301
- Alifano P., Fani R., Lio P., Lazcano A., Bazzicalupo M., Carlomagno M. S. and Bruni C. B. (1996).** Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol. Rev.* **60**: 44-69
- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zahng J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic. Acids. Res.* **25**: 3389-3402
- Araki M. Sugimoto M., Yoshihara Y. and Nakamatsu W. (1998).** gDNA encoding aspartate transferase (AAT). *Japanese Patent JP 1998215883-A*, 21
- Arnold F. H. and Georgiou G (2003).** Directed Evolution Library Creation: Methods and Protocols (Humana Press) Totowa
- Barnes W. M. (1994).** PCR amplification of up to 35-kb with high fidelity and high yield from λ bacteriophage template. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2216-2220
- Belitsky B. and Sonenshein A. (2002).** GabR, a member of a novel protein family, regulates the utilization of γ -aminobutyrate in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **45**: 569-583
- Berg C. M., Whalen W. A. and Archambault L. B. (1983).** Role of alanine-valine transaminase in *Salmonella typhimurium* and analysis of an *avtA::Tn5* mutant. *J. Bacteriol.* **155**: 1009-1014
- Bertani G. (1951).** Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **62**: 293-300
- Birnboim H. C. and Doly J. (1979).** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* **7**: 1513-1523
- Blombach B., Schreiner M. E., Holatko J., Bartek T., Oldiges M. and Eikmanns B. J. (2007).** L-valine production with pyruvate dehydrogenase complex-deficient *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 2079-2084

- Botsford J. L. and Harman J. G. (1992).** Cyclic AMP in prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **56**: 100-122
- Braman J., Papworth C. and Greener A (1996).** Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates. *Meth. Mol. Biol.* **57**: 31-44
- Bramucci M. G. and Nagarajan V. (1996).** Direct deletion of cloned DNA in *Bacillus subtilis* based on saccharose-induced lethality. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3948-3953
- Breitinger U., Clausen T., Ehlert S., Huber R., Laber B., Schmidt F., Pohl E. and Messerschmidt A. (2001).** The three-dimensional structure of cystathionine beta-lyase from *Arabidopsis* and its substrate specificity. *Plant Physiol.* **126**: 631-42
- Bucher M. H., Evdokimov A. G. and Waugh D. S. (2002).** Differential effects of short affinity tags on the crystallization of *Pyrococcus furiosus* maltodextrin-binding protein. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 392-7
- Campbell L. L. Jr. (1956).** Transamination of amino acids with glyoxylic acid in bacterial extracts. *J. Bacteriol.* **71**: 81-83
- Chang J. Y. (1985).** Thrombin specificity. Requirement for apolar amino acids adjacent to the thrombin cleavage site of polypeptide substrate. *Eur. J. Biochem.* **151**: 217-24
- Christen P. and Metzler D. E. (1985).** Transaminases. Series: Biochemistry (John Wiley & Sons) New York, Brisbane, Toronto
- Christen P. and Mehta P. K. (2001).** From cofactor to enzymes. The molecular evolution of pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. *Chem. Rec.* **1**: 436-447
- Cohen S. X., Morris R. J., Fernandez F. J., Ben Jelloul M., Kakaris M., Parthasarathy V., Lamzin V. S., Kleywegt G. J. and Perrakis A. (2004).** Towards complete validated models in the next generation of ARP/wARP. *Acta Cryst.* **60**: 2222-2229
- Collaborative Computational Project 4 (1994).** The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr.* **50**: 760–763
- Cox R. J. and Wang P. S. (2001).** Is N-acetylornithine aminotransferase the real N-succinyl-LL-diaminopimelate aminotransferase in *E.coli* and *M. smegmatis*? *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 2006 – 2008
- Cremer J., Eggeling L. and Sahn H. (1990).** Cloning the *dapA dapB* cluster of the lysine-secreting bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **220**: 478-480

- DeLano W. L. (2002).** The PyMOL Molecular Graphics System; DeLano Scientific: San Carlos, CA, Available at <http://www.pymol.org>
- Drenth J. (2006).** Principles of Protein X-Ray Crystallography. (Springer Verlag) Berlin, Hamburg, Heidelberg
- Drewke C., Klein M., Clade D., Arenz A., Müller R. and Leistner E. (1996).** 4-O-Phosphoryl-L-threonine, a substrate of the *pdxC* (*serC*) gene product involved in vitamin B6 biosynthesis. *FEBS Lett.* **390**: 179-182
- Eggeling L., Morbach S. and Sahm H. (1997).** The fruits of molecular physiology: engineering the L-isoleucine biosynthesis pathway in *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **56**: 167-182
- Eggeling L. and Sahm H. (1999).** L-Glutamate and L-Lysine: traditional products with impetuous developments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 146-153
- Ehrenshaft M. and Daub M. (2002).** Isolation of *pdx2*, a novel gene in the pyridoxine biosynthesis pathway of eukaryotes, archaeobacteria, and a subset of eubacteria. *J. Bacteriol.* **183**: 3383-3390
- Eikmanns B. J., Thum-Schmitz N., Eggeling L., Lüdtko K. and Sahm H. (1994).** Nucleotid sequence, expression and transcriptional analysis of *gltA* gene encoding citrate synthase. *Microbiology* **140**: 1817-28
- Emsley P. and Cowtan K. (2004).** Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst.* **60**: 2126-2132
- Falkinham J.O. 3rd (1979).** Identification of a mutation affecting an alanine-alpha-ketoisovalerate transaminase activity in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **176**: 147-149
- Garrick-Silversmith L. and Hartman P. E. (1970).** Histidine-requiring mutants of *Escherichia coli* K12. *Genetics* **66**: 231-244
- Gelfand D. H. and Steinberg R. A. (1977).** *Escherichia coli* mutants deficient in the aspartate and aromatic amino acid aminotransferases. *J. Bacteriol.* **130**: 429-440
- Grant S. G. N., Jessee J., Bloom F. R. and Hanahan D. (1990).** Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 4645-4649
- Gu W., Zhao G., Eddy C. and Jensen R. A. (1995).** Imidazole acetol phosphate aminotransferase in *Zymomonas mobilis*: molecular genetic, biochemical, and evolutionary analyses. *J. Bacteriol.* **177**: 1576-1584

- Falkinham J. O. 3rd (1979).** Identification of a mutation affecting an alanine-alpha-ketoisovalerate transaminase activity in *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **176**: 147-149
- Fernandez F. J., Vega M. C., Lehmann F., Sandmeier E., Gehring H., Christen P. and Wilmanns M. (2004).** Structural studies of the catalytic reaction pathway of a hyperthermophilic histidinol-phosphate aminotransferase. *J. Biol. Chem.* **279**: 21478-21488
- Fuchs T. M., Schneider B., Krumbach K., Eggeling L. and Gross R. (2000).** Characterization of a *Bordetella pertussis* Diaminopimelate (DAP) Biosynthesis Locus Identifies *dapC*, a Novel Gene Coding for an N-Succinyl-L-DAP Aminotransferase. *J. Bacteriol.* **182**: 3626-3631
- Hanahan D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hanahan D. (1985).** Techniques for transformation of *Escherichia coli*. In: *DNA cloning 1*, pp. 109-136, Glover, D.M. (Ed.). IRL Press, Oxford
- Hartmann M., Tauch A., Eggeling L., Bathe B., Mockel B., Puhler A. and Kalinowski J. (2003).** Identification and characterization of the last two unknown genes, *dapC* and *dapF*, in the succinylase branch of the L-lysine biosynthesis of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 199-211
- Hatakeyama K., Kohama K., Vertès A., Kobayashi M., Kurusu Y. and Yukawa H. (1993).** Genomic organisation of the biotin biosynthetic genes of coryneform bacteria: cloning and sequencing of the *bioA-bioD* genes from *Brevibacterium flavum*. *J. DNA Sequencing and Mapping* **4**: 177-184
- Hayashi H., Inoue K., Nagata T., Kuramitsu S. and Kagamiyama H. (1993).** *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase: characterization and comparison with aspartate aminotransferase. *Biochem.* **32**: 12229-12239
- Herrmann K. M. and Somerville R. C. (1983).** Amino acids: Biosynthesis and genetic regulation Addison-Wesley Reading, MA
- Hochuli E. (1989).** Genetically designed affinity chromatography using a novel metal chelate absorbent. *Bio. Act. Mol.* **23**: 217-239
- Hoff K. G., Silberg J. J. and Vickery L. E. (2000).** Interaction of the iron-sulfur cluster assembly protein IscU with the Hsc66/Hsc20 molecular chaperone system of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **14**: 7790-7795
- Hutson S. (2001).** Structure and function of branched chain aminotransferases. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **70**: 175-206
- Jackowski S. and Rock C. O. (1981).** Regulation of coenzyme A biosynthesis. *J. Bacteriol.* **148**: 926-932

- Jaeger K. E., Eggert T., Eipper A. and Reetz M. T. (2001).** Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalysts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 519-530
- Janknecht R., de Martynoff G., Lou J., Hipskind R. A., Nordheim A. and Stunnenberg H G. (1991).** Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 8972-8976
- Jansonius J. N. (1998).** Structure, evolution and action of vitamin B₆-dependent enzymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 759-769
- Jensen R.A. (1976).** Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**: 409-425
- Jensen R. A. and Calhoun D. H. (1981).** Intracellular roles of microbial aminotransferases: overlap enzymes across different biochemical pathways. *Crit. Rev. Microbiol.* **8**: 229-266
- John R. A. (1995).** Pyridoxal phosphate-dependent enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* **1248**: 81-96
- Jones B. M. and Gilligan J. P. (1983).** o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization and reversed-phase-high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids. *J. Chromatography* **266**: 471-482
- Kalinowski J., Bathe B., Bartels D., Bischoff N., Bott M., Burkovski A., Dusch N., Eggeling L., Eikmanns B. J., Gaigalat L., Goesmann A., Hartmann M., Huthmacher K., Kramer R., Linke B., McHardy A. C., Meyer F., Mockel B., Pfefferle W., Puhler A., Rey D. A., Ruckert C., Rupp O., Sahm H., Wendisch V. F., Wiegrabe I. and Tauch A. (2003).** The complete *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032 genome sequence and its impact on the production of L-aspartate-derived amino acids and vitamins. *J. Biotechnol.* **104**: 5-25
- Katsumata R., Ozaki A., Oka T. and Furuya A. (1984).** Protoplast transformation of glutamate-producing bacteria with plasmid DNA. *J. Bacteriol.* **159**: 306-311
- Keilhauer C., Eggeling L. and Sahm H. (1993).** Isoleucine synthesis in *Corynebacterium glutamicum*: molecular analysis of the *ilvB-ilvN-ilvC* operon. *J. Bacteriol.* **175**: 5595-5603
- Kengen S. W. and Stams A. J. (1994).** Formation of L-alanine as a reduced end product in carbohydrate fermentation by the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Arch. Microbiol.* **161**:168–175

- Kim J. W., Kim H. J., Kim, Y., Lee M. S. and Lee H. S. (2001).** Properties of the *Corynebacterium glutamicum metC* gene encoding cystathionine beta-lyase. *Mol. Cells*. **11**: 220-225
- Kinoshita S., Udaka S. and Shimono M. (1957).** Studies in the amino acid fermentation, I. Production of L-glutamic acid by various microorganism. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **3**: 193-205
- Kircher M. and Leuchtenberger W. (1998).** Aminosäuren – ein Beitrag zur Welternährung. *Biologie in unserer Zeit*. **28**: 281-293
- Kirchner O. and Tauch A. (2003).** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**: 287-299
- Lange C., Rittmann D., Wendisch V. F., Bott M. and Sahm H. (2003).** Global expression profiling and physiological characterization of *Corynebacterium glutamicum* grown in the presence of L-valine. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 2521-2532
- Laskowski R. A., MacArthur M. W., Moss D. S. and Thornton J. (1993).** PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**: 282–291
- Ledwidge R. and Blanchard J. S. (1999).** The dual biosynthetic capability of N-acetylornithine aminotransferase in arginine and lysine biosynthesis. *Biochem.* **38**: 3019-3024
- Lee-Peng F. C., Hermodson M. A. and Kohlhaw G. B. (1979).** Transaminase B from *Escherichia coli*: quaternary structure, amino-terminal sequence, substrate specificity, and absence of a separate valine-alpha-ketoglutarate activity. *J. Bacteriol.* **139**: 339-345
- Letendre C. H., Dickens G. and Guroff G. (1975).** Phenylalanine hydroxylase from *Pseudomonas sp.* (ATCC 11299a). Purification, molecular weight, and influence of tyrosine metabolites on activation and hydroxylation. *J. Biol. Chem.* **250**: 6672-6678
- Leuchtenberger W., Huthmacher K. and Drauz K. (2005).** Biotechnological production of amino acids and derivatives: current status and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 1-8
- Leung D. W., Chen E. and Goeddel D. V. (1989).** A method for random mutagenesis of a defined DNA segment using a modified polymerase chain reaction. *Technique* **1**: 11–15

- Leyval D., Uy D., Delaunay S., Goergen J. L. and Engasser J. M. (2003).** Characterisation of the enzyme activities involved in the valine biosynthetic pathway in a valine-producing strain of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnology* **104**: 241-252
- Liebl W., Ehrmann M., Ludwig W. and Schleifer K.H. (1991).** Transfer of *Brevibacterium divaricatum* DSM 20297T, "*Brevibacterium flavum*" DSM 20411, "*Brevibacterium lactofermentum*" DSM 20412 and DSM1412, and *Corynebacterium lilium* DSM 20137T to *Corynebacterium glutamicum* and their distinction by rRNA gene restriction patterns. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 255-260
- Limauro D., Avitabile A., Cappellano M., Puglia A. M. and Bruni C. B. (1990).** Cloning and characterization of the histidine biosynthetic gene cluster of *Streptomyces coelicolor*. *Gene* **90**: 31-41
- Lindroth P. and Mopper K. (1979).** High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with *o*-phthaldialdehyde. *Anal. Chem.* **51**: 1167-1174
- Link A. J., Phillips D. and Church G. M. (1997).** Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization. *J. Bacteriol.* **179**: 6228-6237
- Marienhagen J., Kennerknecht N., Sahn H. and Eggeling L. (2005).** Functional analysis of all aminotransferase proteins inferred from the genome sequence of *Corynebacterium glutamicum*. *J. Bacteriol.* **187**: 7639-7646
- McPherson A. (1999).** Procedures of macromolecular crystallisation. Crystallisation of biological macromolecules. Vol. I, *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, USA*
- Mehta P. K., Hale T. I. and Christen P. (1989).** Evolutionary relationships among aminotransferases. Tyrosine aminotransferase, histidinol-phosphate aminotransferase, and aspartate aminotransferase are homologous proteins. *Eur. J. Biochem.* **186**: 249-253
- Mehta P. K., Hale T.I. and Christen P. (1993).** Aminotransferases: demonstration of homology and division into evolutionary subgroups. *Eur. J. Biochem.* **214**: 549-561
- Menkel E., Thierbach G., Eggeling L. and Sahn H. (1989).** Influence of increased aspartate availability on lysine formation by a recombinant strain of *Corynebacterium glutamicum* and utilization of fumarate. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 684-688

- Mihara H. and Esaki N. (2002).** Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 12-23
- Mizuguchi H., Hayashi H., Miyahara I., Hirotsu K. and Kagamiyama H. (2003).** Characterization of histidinol phosphate aminotransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1647**: 321-324
- Moore J.C. and Arnold F. H. (1996).** Directed evolution of a paranitrobenzyl esterase for aqueous-organic solvents. *Nat. Biotechnol.* **14**: 458–467
- Morbach S., Sahm H. and Eggeling L. (1996).** L-isoleucine production with *Corynebacterium glutamicum*: Further flux increase and limitation of export. *Appl. Environ. Microbio.* **62**: 4345-4351
- Morbach S., Junger C., Sahm H. and Eggeling L. (2000).** Attenuation control of *ilvBNC* in *Corynebacterium glutamicum*: evidence of leader peptide formation without the presence of a ribosome binding site. *J. Biosci. Bioeng.* **90**: 501–507
- Murshudov G., Vagin A. A. and Dodson E. J. (1997).** Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr.* **53**: 240–253
- Nakamura J., Hirano S., Ito H. and Wachi M. (2007).** Mutations of the *Corynebacterium glutamicum* NCgl1221 Gene, Encoding a Mechanosensitive Channel Homolog, Induce L-Glutamic Acid Production. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 4491-4498
- Nelson M. and McClelland M. (1992).** Use of DNA methyltransferase/endonuclease enzyme combinations for megabase mapping of chromosomes. *Methods Enzymol.* **216**: 279-303
- Nester E. W. and Montoya A. L. (1976).** An enzyme common to histidine and aromatic amino acid biosynthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **126**: 699-705
- Ostermeier, C., Harrenga A., Ermler U. and Michel H. (1997).** Structure at 2.7 Å resolution of the *Paracoccus denitrificans* two-subunit cytochrome c oxidase complexed with an antibody FV fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 10547-53
- Oue S., Okamoto A., Yano T. and Kagamiyama H. (1999).** Redesigning the substrate specificity of an enzyme by cumulative effects of the mutations of non-active site residues. *J. Biol. Chem.* **274**: 2344-2349
- Ozaki A., Katsumata R., Oka T. and Furuya A. (1984).** Functional expression of genes of *Escherichia coli* in grampositive *Corynebacterium glutamicum*. *Mol. Gen. Genet.* **96**: 175-178.

- Pascual C., Lawson P. A., Farrow J. A., Gimenez M. N. and Collins M. D. (1995).** Phylogenetic analysis of the genus *Corynebacterium* based on 16S rRNA gene sequences. *Int. Syst. Bacteriol.* **45**: 724-728
- Peters-Wendisch P., Stolz M., Etterich H., Kennerknecht N., Sahm H. and Eggeling L. (2005).** Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for L-serine production. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 7139-7144
- Powell J.T. and Morrison J. F. (1978a).** The purification and properties of the aspartate aminotransferase and aromatic-amino-acid aminotransferase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **87**: 391-400
- Powell J. T. and Morrison J. F. (1978b).** Role of the *Escherichia coli* aromatic amino acid aminotransferase in leucine biosynthesis. *J. Bacteriol.* **136**: 1-4
- Radmacher E., Vaitsikova A., Burger U., Krumbach K., Sahm H. and Eggeling L. (2002).** Linking central metabolism with increased pathway flux: L-valine accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2246-2250
- Rigali S., Derouau, A., Giannotta F. and Dusart J. (2002).** Subdivision of the helix-turn-helix GntR family of bacterial regulators in the FadR, HutC, MocR, and YtrA subfamilies. *J. Biol. Chem.* **277**: 12507-12515
- Rossol I. and Puhler A. (1992).** The *Corynebacterium glutamicum aecD* gene encodes a C-S lyase with alpha, beta-elimination activity that degrades aminoethylcysteine. *J. Bacteriol.* **174**: 2968-2977
- Rothman S. C. and Kirsch J. F. (2003).** How does an enzyme evolved *in vitro* compare to naturally occurring homologs possessing the targeted function? Tyrosine aminotransferase from aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **327**: 593-608
- Rothman S. C., Voorhies M. and Kirsch J. F. (2004).** Directed evolution relieves product inhibition and confers *in vivo* function to a rationally designed tyrosine aminotransferase. *Protein Sci.* **13**: 763-772
- Sahm H. (1995).** Metabolic design in the amino-acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *Folia Microbiol.* **40**: 23-30
- Sahm H. and Eggeling L. (1999).** D-Pantothenate synthesis in *Corynebacterium glutamicum* and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1973-1979
- Sahm H., Eggeling L., Eikmanns B. and Krämer R. (1995).** Metabolic design in amino acid producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol. Rev.* **16**: 243-252.

- Sahm H., Eggeling L. and de Graaf A.A. (2000).** Pathway analysis and metabolic engineering in *Corynebacterium glutamicum*. *Biol. Chem.* **381**: 899-910.
- Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higushi R., Horn G. T., Mullis K. B. and Ehrlich H. A. (1988).** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **23**: 487-491
- Sakanyan V., Petrosyan P., Lecocq M., Boyen A., Legrain C., Demarez M. J., Hallet N., and Glansdorff N. (1996).** Genes and enzymes of the acetyl cycle of arginine biosynthesis in *Corynebacterium glutamicum*: enzyme evolution in the early steps of the arginine pathway. *Microbiol.* **142**: 99–108
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989).** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Sanger F., Nicklen C. and Coulson A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467
- Santamaría R., Gil J. A., Mesas J. M. and Martín J.F. (1984).** Characterization of an endogenous plasmid and development of cloning vectors and a transformation system in *Brevibacterium lactofermentum*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 2237-2246
- Schäfer A., Tauch A., Jäger W., Kalinowski J., Thierbach G. and Pühler A. (1994)** Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* **145**: 69-73
- Schaffer S., Weil B., Nguyen V. D., Dongmann G., Günther K., Nickolaus M., Hermann T. and Bott M. (2001).** A high-resolution reference map for cytoplasmic and membrane-associated proteins of *Corynebacterium glutamicum*. *Electrophoresis* **22**: 4404-22
- Schneider G., Kack H. and Lindqvist Y. (2000).** The manifold of vitamin B6 dependent enzymes. *Struc. Fold. Des.* **8**: R1-6
- Sivaraman J., Li Y., Larocque R., Schrag J. D., Cygler M. and Matte A. (2001).** Crystal structure of histidinol phosphate aminotransferase (HisC) from *Escherichia coli*, and its covalent complex with pyridoxal-5'-phosphate and L-histidinol phosphate. *J. Mol. Biol.* **311**: 761-776
- Skerra A. (1994).** Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* **51**: 131-135

- Smith P. K., Krohn R. I., Hermanson G. T., Mallia A. K., Gartner F. H., Provenzano M. D., Fujimoto E. K., Goeke N. M., Olson B. J. and Klenk D. C. (1985).** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85
- Studier F. W., Rosenberg A. H., Dunn J. J. and Dubendorff J. W. (1990).** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Meth. Enzymol.* **185**: 60-89
- Sugio S., Petsko G. A., Manning J.M., Soda K. and Ringe D. (1995).** Crystal structure of a D-amino acid aminotransferase: how the protein controls stereoselectivity. *Biochemistry* **34**: 9661-9669
- Tauch A., Kirchner O., Löffler B., Gotker S., Puhler A. and Kalinowski J. (2002).** Efficient electrotransformation of *Corynebacterium diphtheriae* with a mini-replicon derived from the *Corynebacterium glutamicum* plasmid pGA1. *Curr. Microbiol.* **45**: 362-367
- Thorne C. B., Gomez C. G. and Housewright R. D. (1955).** Transamination of D-amino acids by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **69**: 357-362
- Tindall K. R. and Kunkel T. A. (1988).** Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27**: 6008-13
- Turner N. J. (2003).** Directed evolution of enzymes for applied biocatalysis. *Trends Biotechnol.* **21**: 474-478
- Vagin A. and Teplyakov A. (1997).** MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**: 1022-1025
- Voss S. and Skerra A. (1997).** Mutagenesis of a flexible loop on streptavidin leads to higher affinity for the *Strep*-tag II peptide and improved performance in recombinant protein purification. *Protein. Eng.* **10**: 975-982
- Wang M. D., Liu L., Wang B. M. and Berg C. M. (1987a).** Cloning and characterization of the *Escherichia coli* K-12 alanine-valine transaminase (*avtA*) gene. *J. Bacteriol.* **169**: 4228-4234
- Wang M. D., Buckley L. and Berg C. M. (1987b).** Cloning of genes that suppress an *Escherichia coli* K-12 alanine auxotroph when present in multicopy plasmids. *J. Bacteriol.* **169**: 5610-5614
- Ward D. E., Kengen S. W., van Der Oost J. and de Vos W. M. (2000).** Purification and characterization of the alanine aminotransferase from the hyperthermophilic Archaeon *Pyrococcus furiosus* and its role in alanine production. *J. Bacteriol.* **182**: 2559-2566

- Weigent D. A. and Nester E. W. (1976).** Purification and properties of two aromatic aminotransferases in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **251**: 6974-6980
- Whalen W. A. and Berg C. M. (1982).** Analysis of an *avtA::Mu d1(Ap lac)* mutant: metabolic role of transaminase C. *J. Bacteriol.* **150**: 739-746
- Wilhelm C., Eggeling L., Nassenstein A., Jehsen C., Eggeling I. and Sahn H. (1989).** Limitations during hydroxybutyrate conversion to isoleucine with *Corynebacterium glutamicum* as analysed by the formation of byproducts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **172**: 458-462
- Wong T. S., Tee K. L., Hauer B. and Schwaneberg U. (2004).** Sequence saturation mutagenesis (SeSaM): a novel method for directed evolution. *Nucleic. Acids. Res.* **32**: 26
- Yano T., Oue S. and Kagamiyama H. (1998).** Directed evolution of an aspartate aminotransferase with new substrate specificities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **95**: 5511-5515
- Zheng L., White R. H., Cash V. L., Jack R. F. and Dean D. R. (1993).** Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **90**: 2754-2758

VII. ANHANG

1. Oligonukleotidsequenzen

Primer zur Isolierung der zwanzig potentiellen Transaminase-Gene aus *C. glutamicum*:

<i>argD</i>	argD-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGAGCACGCTGGAAACTTGGCC-3'
	argD-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTTGCATTGTCTCGGCAATAGCC-3'
<i>ilvE</i>	ilvE-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGTATCTGTCAGGTAGCAGGTGTA-3'
	ilvE-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTGCCAACCAGTGGGTAAAGCC-3'
<i>avtA</i>	orf2841-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGTCTCTTATGAAGCCAAGCACTAG-3'
	orf2841-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTTTTTTTTGTGAATTCTCCGATTTG-3'
<i>alaT</i>	orf234-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGACTACAGACAAGCGCAAAACCT-3'
	orf234-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTCTGCTTGTAAGTGGACAGGAAG-3'
<i>NCgl0780</i>	orf1355-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGAATCCTTTGCGCACCAATCAATG-3'
	orf1355-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTTAGTTTCTTAATCCCCTTGAGAC-3'
<i>aroT</i>	pat-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGATTAGAGCAGATTTGGCAACTATC-3'
	pat-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCCAGCATTGATGGCCTCCC-3'
<i>hisC</i>	orf2225-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGACCAAAATTACTTTGAGCGATTTG-3'
	orf2225-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTCAGGTTGAGCTTGATGATCTCT-3'
<i>hemL</i>	hemL-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGACGCACATGACATCGTCCAATA-3'
	hemL-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTTGATGCCTTCGCTTCTGCTGC-3'
<i>NCgl2355</i>	orf2973-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGGCATTGAAGGGTTACACCAACT-3'
	orf2973-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTGAACAACGCCCCAGCGAAG-3'
<i>NCgl2491</i>	orf2941-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGAGTTCAGTTTCGCTGCAGGATT-3'
	orf2941-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTGTTAGCGTAATGCTCCGCTGC-3'
<i>sufS</i>	orf2451-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGCTGACAAGCTCGAGGCTGAC-3'
	orf2451-rev	5'-TGGTAGGTCTCAGCGCTCTCAACTCCAAAGAATTGCTTGG-3'
<i>serC</i>	orf2851-for	5'-ATGGTAGGTCTCAAATGGCGCTTGAACCACAAATAAAGTC-3'
	orf2851-rev	5'-ATGGTAGGTCTCAGCGCTCCCAGAGCTTTGGTAATCAG-3'

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *Bsa*I für die sich anschließende Klonierung sind jeweils unterstrichen.

Primer zur Isolierung der zwanzig potentiellen Transaminase-Gene aus *C. glutamicum* (f):

<i>aspT</i>	orf646-for	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AAATGCCCGAAGACATGACCGACTTC-3'
	orf646-rev	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AGCGCTCTTCTTGC AAAACCGCCATC-3'
<i>bioA</i>	bioA-for	5'-ATGGTAGAAGACAAAATGGAAAACCCCAGCTTGCGCGA-3'
	bioA-rev	5'-ATGGTAGAAGACAAGCGCTTTTCCCTTTAACTGCAGCATGAA-3'
<i>dapC</i>	dapC-for	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AAATAACCTCTCGCACCCCGCTTG-3'
	dapC-rev	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AGCGCTGCTCAGGCGAGAAACAAAGGC-3'
<i>pdxR</i>	pdxR-for	5'-CTTGCCGACCTTCCCATCGC-3'
	pdxR-rev	5'-CCCCAAGCTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT GCCTAGAGACACCGCATCGC-3'
<i>NCgl0462</i>	orf967-for	5'-GACATATTAACCTCGTTGCC-3'
	orf967-rev	5'-CCCCAAGCTTTTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCGCT GCCACCTTCTGGTGC GCGG-3'
<i>NCgl1184</i>	orf1836-for	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AAATGAACACTTTTTATCTGGACCATGCA-3'
	orf1836-rev	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AGCGCTAAAAGCCATTCCCGCAGTACG-3'
<i>NCgl1022</i>	orf1645-for	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AAATGCTCTACCTTGATAATGCAGCCA-3'
	orf1645-rev	5'-ATGGTAG <u>GGTCTC</u> AGCGCTCCCTCTGATTAAGGCGACCG-3'
<i>metC</i>	metC-for	5'-ATGGTAC <u>GTCTC</u> AAATGCGATTTCTGAACTCGAAGAATT-3'
	metC-rev	5'-ATGGTAC <u>GTCTC</u> AGCGCTCAACACGCTGGCGATACGGC-3'

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *BsaI* und *HindIII* (*HindIII* in den Rückwärtsprimern der Gene *pdxR* und *NCgl0462*) für die sich anschließende Klonierung sind jeweils unterstrichen.

Primer zur Konstruktion von Deletionsmutanten in *C. glutamicum*:

<i>avtA</i>	Del_atc_1	5'-CGGGAT <u>CCCTAGCAGT</u> ACTGCTCAACGCAG-3'
	Del_atc_2	5'-CCCATCCACTAACTTAAACATGGCTTCATAAGAGACAAGCCTA-3'
	Del_atc_3	5'-TGTTTAAGTTTAGTGGATGGGGGTGTGCGCAAAT CGGAGAAT-3'
	Del_atc_4	5'-CGGGAT <u>CCGAGGTCGCGGGAGGTC</u> ATGC-3'
<i>alaT</i>	Del_orf234_1	5'-CGGGAT <u>CCCATGCAACCGATCTGGTTTTG</u> TG-3'
	Del_orf234_2	5'-CCCATCCACTAACTTAAACAGCGCTTGTCTGTAGTACCCG-3'
	Del_orf234_3	5'-GGTTTAAGTTTAGTGGATGGGCGCCTGGGTAAC TTCCTGTCC-3'
	Del_orf234_4	5'-CGGGAT <u>CCGATTGATCATGTCGAGGAAAGCC</u> -3'

Die *BamHI*-Schnittstellen sind unterstrichen

Primer zur Konstruktion von Deletionsmutanten in *C. glutamicum* (f):

	Del_pat_1	5'-CGGGATCCACCAAATACTTGACAAGCATGACAA-3'
<i>aroT</i>	Del_pat_2	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACACAAATCTGCTCTAATC ATGATTTAC-3'
	Del_pat_3	5'-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGCTGCTGCCGCGCTGGGAGG-3'
	Del_pat_4	5'-CGGGATCCCACTAACGCCAGCACAATCGCA-3'
	Del_ilvE_1	5'-CAGTAGCGGGATCCAGGAAGTTCCTTATGATGCAGCTT-3'
<i>ilvE</i>	Del_ilvE_2	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACAAATAACAGCAAGTTTCAT GTTGTGG-3'
	Del_ilvE_3	5'-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGGTGGGAGACCCGCATCGTCAAG-3'
	Del_ilvE_4	5'-CAGTAGCGGGATCCCTGGTGGTGTGCGAAAACTCATC-3'
	Del_hisC_1	5'-CAGTAGCGGGATCCGACGACATTTCCGTGGGTATCC-3'
<i>hisC</i>	Del_hisC_2	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACACAAAGTAATTTTGG TCATTTTCTTAG-3'
	Del_hisC_3	5'-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGGACGCAGCTGCAGAGATCATCA-3'
	Del_hisC_4	5'-CAGTAGCGGGATCCACCACGGACTCCACTAATGCCT-3'
	Del_2355_1	5'-CAGTAGCGGGATCCCTGAGATCGAAAGTGCTTGTGCGAC-3'
<i>NCgl2355</i>	Del_2355_2	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACAGTAACCCTTCAATG CCAAACCAG-3'
	Del_2355_3	5'-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGGCTGTGCGAGCTGACC TTCGCT-3'
	Del_2355_4	5'-CAGTAGCGGGATCCGAGCATGCTGGCCAAATGGTTG-3'
	Del_2491_1	5'-CAGTAGCGGGATCCCTCAACGGAATCACCTTTTGGGAC-3'
<i>NCgl2491</i>	Del_2491_2	5'-CCCATCCACTAAACTTAAACATTGTGGTTCA AGCGCCATAACGC-3'
	Del_2491_3	5'-TGTTTAAGTTTGTAGTGGATGGGGAAATCAAGGCGC TGATTACCAA-3'
	Del_2491_4	5'-CAGTAGCGGGATCCGACTGCTTCCAACCAACGAACTC-3'

Die *Bam*HI-Schnittstellen sind unterstrichen

Primer für den Nachweis von Deletionen in *C. glutamicum*:

<i>avtA</i>	Ko_delatc_for	5'-CTCCGGTCTGCTTTACGCAGG-3'
	Ko_delatc_rev	5'-TGTGGGAACGGCCAGCCATGA-3'
<i>alaT</i>	Ko_delorf234_for	5'-CTGGGTATTCGCCACGGACGT-3'
	Ko_delorf234_rev	5'-TCGGCGGTGTCAAAAGCATTGC-3'

Primer für den Nachweis von Deletionen in *C. glutamicum* (f):

<i>aroT</i>	Ko_delpat_for	5'-TGACACGGTTACCCCCATCG-3'
	Ko_delpat_rev	5'-GAGGGGACGGTCAATGACAC-3'
<i>ilvE</i>	Ko_delilvE_for	5'- GACCTCACTCGTGAGTTTCATG -3'
	Ko_delilvE_rev	5'- GAGATCGTGAGCGTCACTCAAC -3'
<i>hisC</i>	Ko_delhisC_for	5'-GCAGCTTGCCAAGGACGTAAAC-3'
	Ko_delhisC_rev	5'-AGATCACGTGGAGGGTGATTTCG -3'
<i>NCgl2355</i>	Ko_del2355_for	5'-GAACTTCTTGCGCTTGTCGACG-3'
	Ko_del2355_rev	5'-GTGGTGAGGTAGTCGATGAGGT-3'
<i>NCgl2491</i>	Ko_del2491_for	5'-ACCGATGAGGGTATCAAACCTCC-3'
	Ko_del2491_rev	5'-AGAAATCTACTACGGCCAGCCA-3'

Primer zur Inaktivierung von *NCgl0780*:

Inak_0780_for: 5'- CAGTAGCGGGATCCAGGTGGAGAACTCGTGGGATGT -3'

Inak_0780_rev: 5'- CAGTAGCGGGATCCCTTCCAACCAGTCACATTGAACG -3'

Die *Bam*HI-Schnittstellen sind unterstrichen

Primer für die Klonierung von *aroT* und *hisC* in pET-Vektoren zur heterologen Expression in *E. coli*:

pET28-aroT_for 5'-GCTACATATGATTAGAGCAGATTTGGCAACT-3'

pET28-aroT_rev 5'-GCTACTCGAGTTACCCAGCATTGATGGCCTCCCAC-3

pET22-aroT_for 5'-GCTACATATGATTAGAGCAGATTTGGCAACT-3'

pET22-aroT_rev 5'-GCTACTCGAGCCCAGCATTGATGGCCTCCCAC-3'

pET28-hisC_for 5'-GCTACATATGACCAAAATTACTTTGAGCGAT-3'

pET28-hisC_rev 5'-GCTACTCGAGTTACAGGTTTACGCTTGATGATCTCTGCA-3'

pET22-hisC_for 5'-GCTACATATGACCAAAATTACTTTGAGCGAT-3'

pET22-hisC_rev 5'-GCTACTCGAGCAGGTTTACGCTTGATGATCTCTGCA-3

Die *Nde*I- und *Xho*I-Schnittstellen im *forward*- bzw. *reverse* Primer sind jeweils unterstrichen

Primer zur Konstruktion der pBHK18-Plasmide mit *aroT* und *hisC* für die gerichtete Enzymervolution:

EvKI_aroT_for	5'-CTAGTCTAT <u>CCCGGGC</u> CTTCTGATCCGTAGTCAGATGC-3'	<i>SmaI</i>
EvMu_aroT_for	5'-GGCCGATAGAA <u>CCGATAT</u> GTTACAG-3'	<i>Scal</i>
EvKI/Mu_aroT_rev	5'-CTAGTCTAT <u>TCTAGAT</u> GCGCACCGCAAACGCCAAAGA-3'	<i>XbaI</i>
EvKI_hisC_for	5'-CTAGTCTAT <u>CCCGGGC</u> CTCCGTCCTCGATTGAGGT-3'	<i>SmaI</i>
EvMu_hisC_for	5'-TGAATAC <u>GATGAGG</u> CTGCTCTGAAG-3'	<i>StuI</i>
EvKI/Mu_hisC_rev	5'-CTAGTCTAT <u>TCTAGAG</u> ACAGTCATGAAAAATTCTTCTCTC-3'	<i>XbaI</i>

Primer für die ortsgerichtete Mutagenese von *hisC* und *aroT*:

<i>hisCY21F</i>	HisC_Y21F_for	5'-CTGCGCGGTGAGCACGCT <u>ITC</u> GGCGCACCCCAGCTCAACGTTG-3'
	HisC_Y21F_rev	5'-CAACGTTGAGCTGGGGTGCGCC <u>GAA</u> AGCGTGCTCACCGCGCAG-3'
<i>hisCY21K</i>	HisC_Y21K_for	5'-CTGCGCGGTGAGCACGCT <u>AAG</u> GGCGCACCCCAGCTCAACGTTG-3'
	HisC_Y21K_rev	5'-CAACGTTGAGCTGGGGTGCGCC <u>CTT</u> AGCGTGCTCACCGCGCAG-3'
<i>hisCY21E</i>	HisC_Y21E_for	5'-CTGCGCGGTGAGCACGCT <u>GAG</u> GGCGCACCCCAGCTCAACGTTG-3'
	HisC_Y21E_rev	5'-CAACGTTGAGCTGGGGTGCGCC <u>CTC</u> AGCGTGCTCACCGCGCAG-3'
<i>hisCN99K</i>	HisC_N99K_for	5'-GGTGCCAATGGTTCC <u>AAG</u> GAAATTCTGCAGCAGC-3'
	HisC_N99K_rev	5'-GCTGCTGCAGAATTTCC <u>CTT</u> GGAACCATTGGCAGCC-3'
<i>hisCN99D</i>	HisC_N99D_for	5'-GGTGCCAATGGTTCC <u>GAT</u> GAAATTCTGCAGCAGC-3'
	HisC_N99D_rev	5'-GCTGCTGCAGAATTTCC <u>ATC</u> GGAACCATTGGCAGCC-3'
<i>hisCN99G</i>	HisC_N99G_for	5'-GGTGCCAATGGTTCC <u>GGT</u> GAAATTCTGCAGCAGC-3'
	HisC_N99G_rev	5'-GCTGCTGCAGAATTTCC <u>ACC</u> GGAACCATTGGCAGCC-3'
<i>hisCN99F</i>	HisC_N99F_for	5'-GTGGGCTGCCAATGGTTCC <u>TTT</u> GAAATTCTGCAGCAGCTGCTG-3'
	HisC_N99F_rev	5'-CAGCAGCTGCTGCAGAATTTCC <u>AAAG</u> GAAACCATTGGCAGCCAC-3'
<i>hisCY123F</i>	HisC_Y123F_for	5'-CGTTGGGATTCCAACCCAGC <u>TTT</u> TCCATGCACCCAATTTTGGC-3'
	HisC_Y123F_rev	5'-GCCAAAATTGGGTGCATGGA <u>AAA</u> GCTGGGTTGGAATCCCAACG-3'

Das zu mutierende Codon ist fett und kursiv hervorgehoben, die nötigen Nukleotidaustausche sind unterstrichen

Primer für die ortsgerechtere Mutagenese von *hisC* und *aroT* (f):

<i>hisCY257F</i>	HisC_Y257F_for	5'-GTGATGCTAGTCCGCCTTCG <u>TTT</u> CATCTTTCAGCGCTGAGCC-3'
	HisC_Y257F_rev	5'-GGCTCAGCGCTGAAAGATG <u>AAA</u> CGGAAGGCGGACTAGCATCAC-3'
<i>hisCY257K</i>	HisC_Y257K_for	5'-GTGATGCTAGTCCGCCTTCG <u>AAAC</u> ATCTTTCAGCGCTGAGCC-3'
	HisC_Y257K_rev	5'-GGCTCAGCGCTGAAAGATG <u>TTT</u> CGGAAGGCGGACTAGCATCAC-3'
<i>hisCY257E</i>	HisC_Y257E_for	5'-GTGATGCTAGTCCGCCTTCG <u>GAAC</u> ATCTTTCAGCGCTGAGCC-3'
	HisC_Y257E_rev	5'-GGCTCAGCGCTGAAAGATG <u>TTC</u> CGGAAGGCGGACTAGCATCAC-3'
<i>aroTM54I</i>	AroT_M54I_for	5'-GGCTAATCGGTACCCGGAT <u>ATC</u> GGTGCGGTTGAGCTCCGTGAG-3'
	AroT_M54I_rev	5'-CTCACGGAGCTCAACCGCACCC <u>GAT</u> ATCCGGGTACCGATTAGCC-3'
<i>aroTM54L</i>	AroT_M54L_for	5'-GGCTAATCGGTACCCGGAT <u>TTC</u> GGTGCGGTTGAGCTCCGTGAG-3'
	AroT_M54L_rev	5'-CTCACGGAGCTCAACCGCACCC <u>CAA</u> ATCCGGGTACCGATTAGCC-3'
<i>aroTM54V</i>	AroT_M54V_for	5'-GGCTAATCGGTACCCGGAT <u>GTT</u> GGTGCGGTTGAGCTCCGTGAG-3'
	AroT_M54V_rev	5'-CTCACGGAGCTCAACCGCACCC <u>AAC</u> ATCCGGGTACCGATTAGCC-3'

Das zu mutierende Codon ist fett und kursiv hervorgehoben, die nötigen Nukleotidaustausche sind unterstrichen

2. Restriktionskarten der konstruierten Plasmide

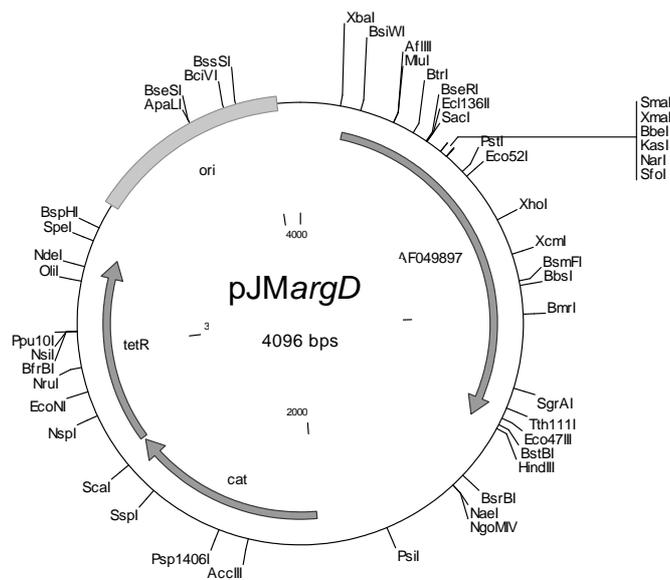


Abb. 29: Expressionsplasmid pJMargD mit dem Gen *argD*

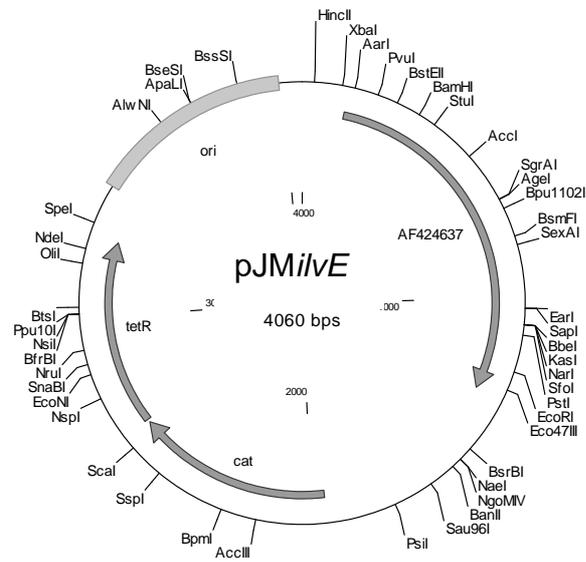


Abb. 30: Expressionsplasmid pJM*ilvE* mit dem Gen *ilvE*

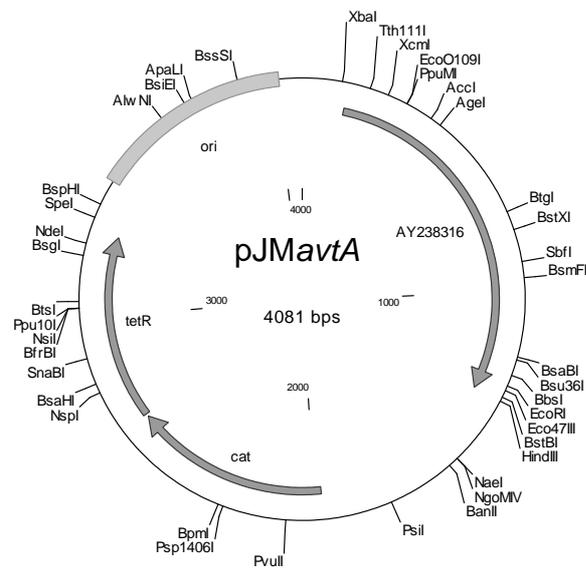


Abb. 31: Expressionsplasmid pJM*avtA* mit dem Gen *avtA*

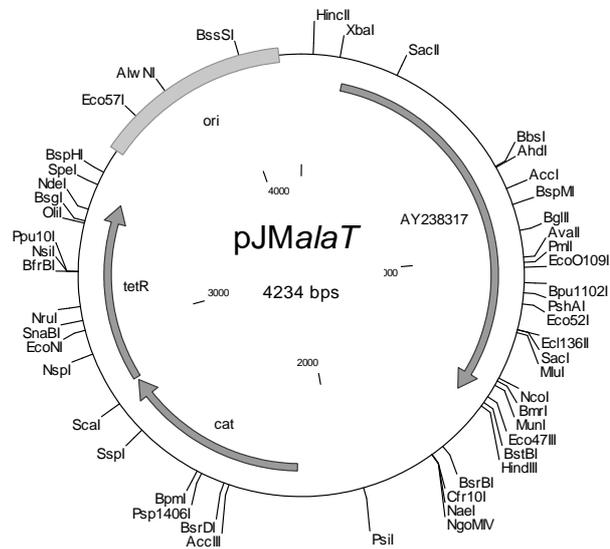


Abb. 32: Expressionsplasmid pJMalaT mit dem Gen *alaT*

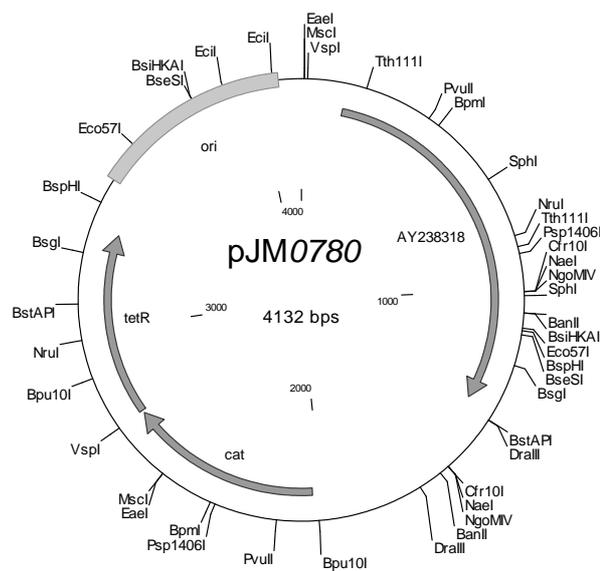


Abb. 33: Expressionsplasmid pJM0780 mit dem Gen *NCgI0780*

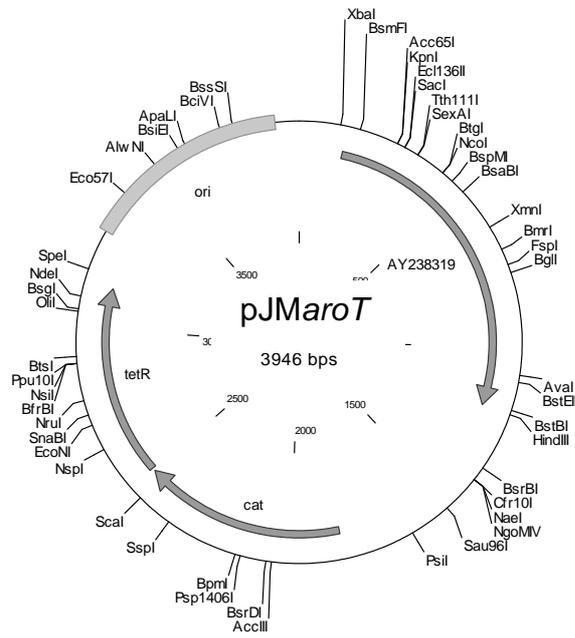


Abb. 34: Expressionsplasmid pJMaroT mit dem Gen *aroT*

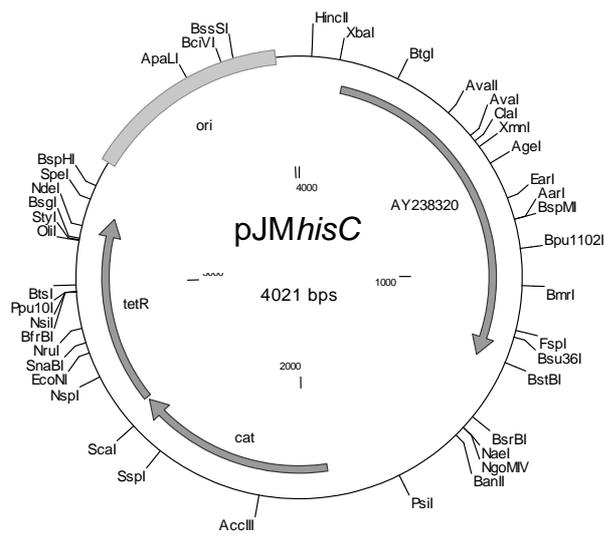


Abb. 35: Expressionsplasmid pJHisC mit dem Gen *hisC*

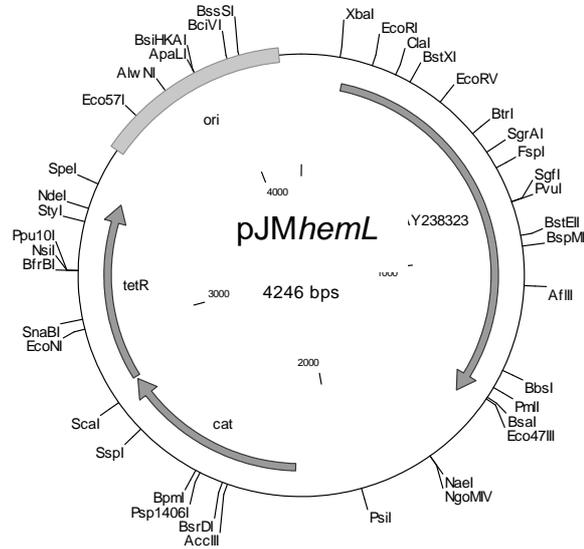


Abb. 36: Expressionsplasmid pJM*hemL* mit dem Gen *hemL*

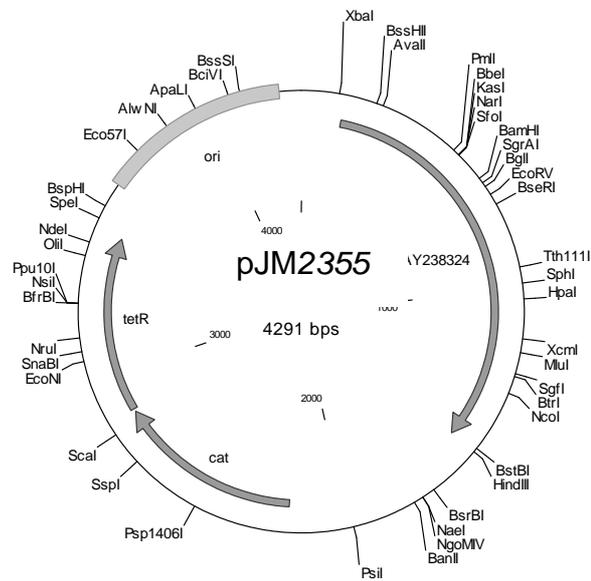


Abb. 37: Expressionsplasmid pJM2355 mit dem Gen *NCgl2355*

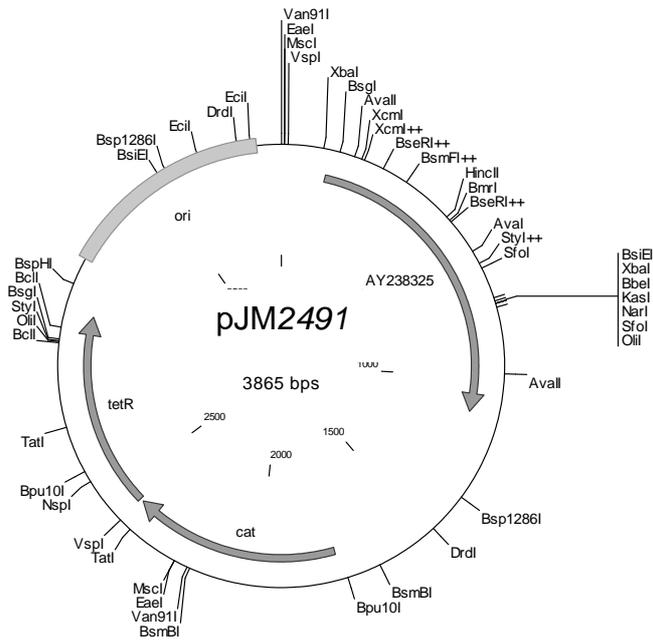


Abb. 38: Expressionsplasmid pJM2491 mit dem Gen *NCgl2491*

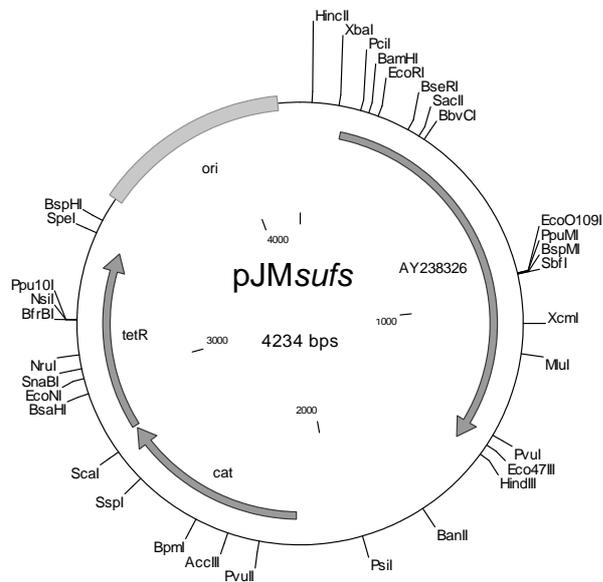


Abb. 39: Expressionsplasmid pJMsfufs mit dem Gen *sfufs*

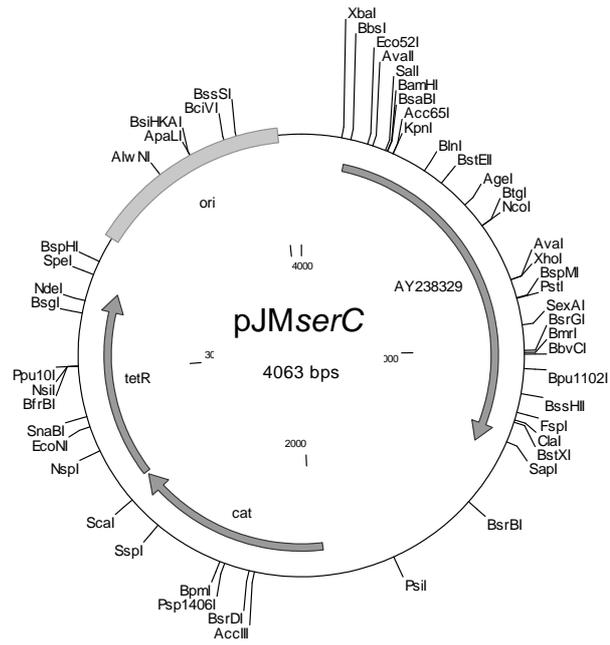


Abb. 40: Expressionsplasmid pJMserC mit dem Gen serC

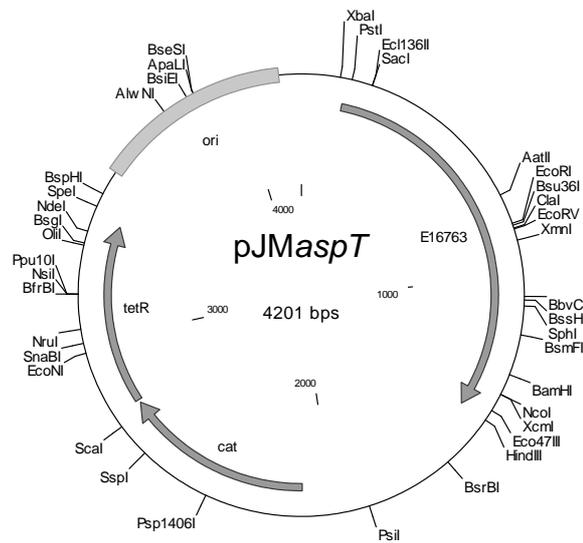


Abb. 41: Expressionsplasmid pJMaspT mit dem Gen aspT

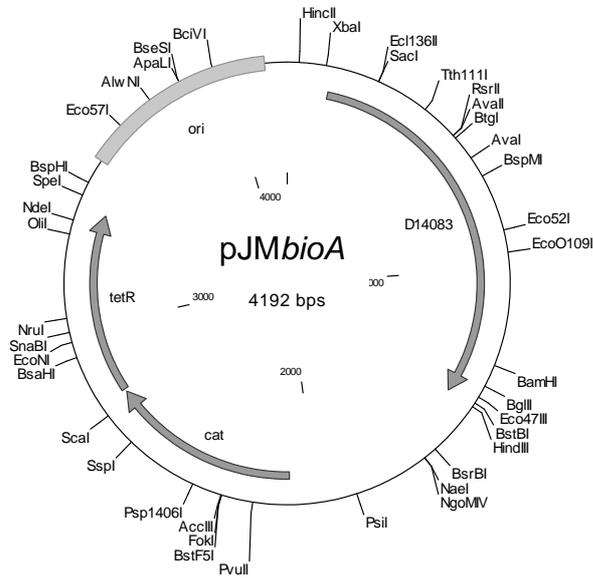


Abb. 42: Expressionsplasmid pJM*bioA* mit dem Gen *bioA*

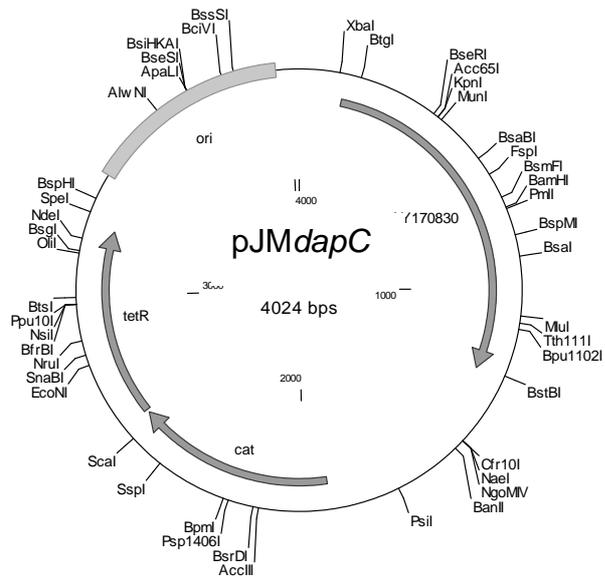


Abb. 43: Expressionsplasmid pJM*dapC* mit dem Gen *dapC*

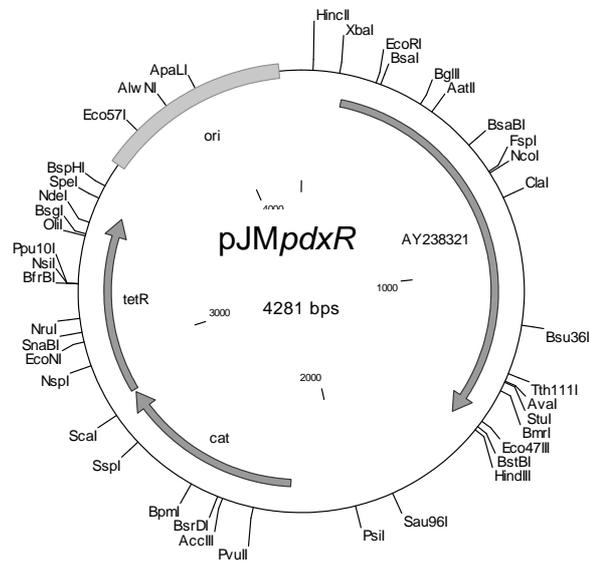


Abb. 44: Expressionsplasmid pJMpdxR mit dem Gen pdxR

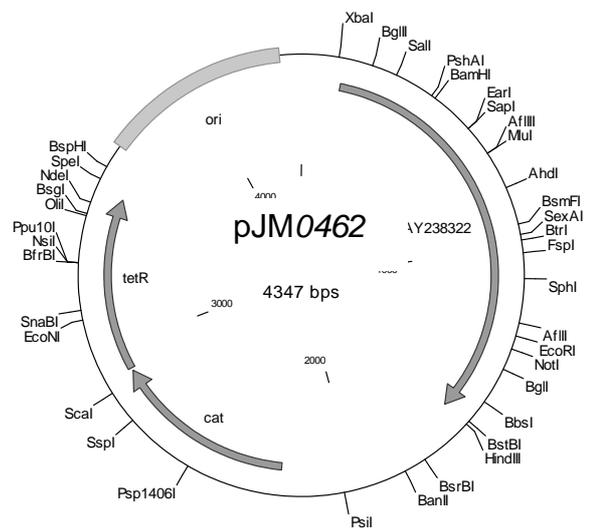


Abb. 45: Expressionsplasmid pJM0462 mit dem Gen NCgI0462

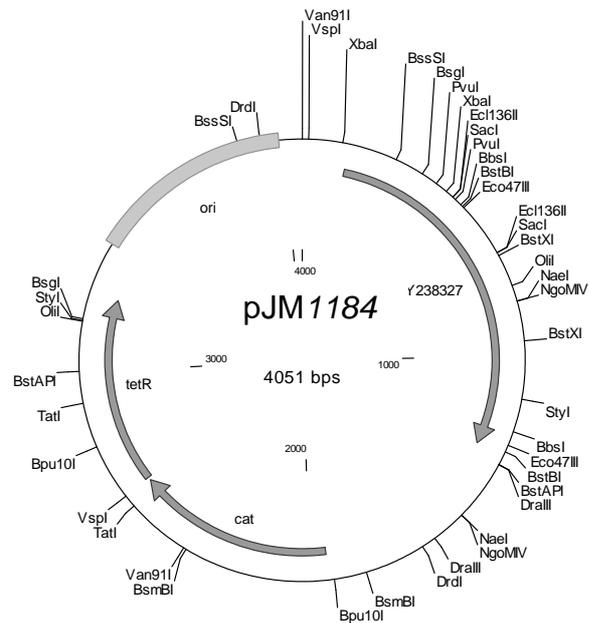


Abb. 46: Expressionsplasmid pJM1184 mit dem Gen *NCgl1184*

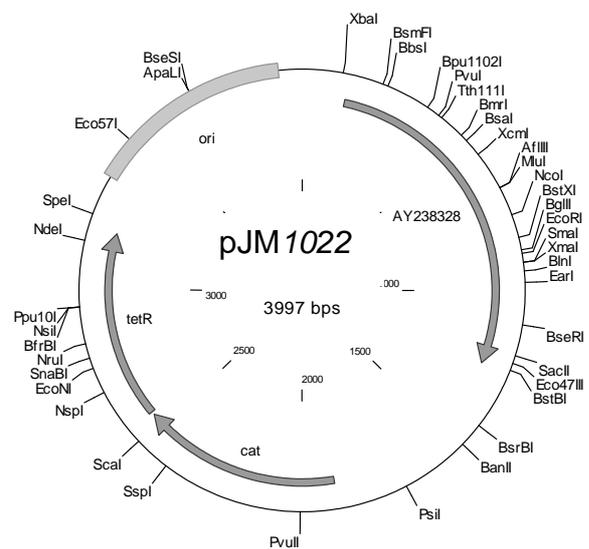


Abb. 47: Expressionsplasmid pJM1022 mit dem Gen *NCgl1022*

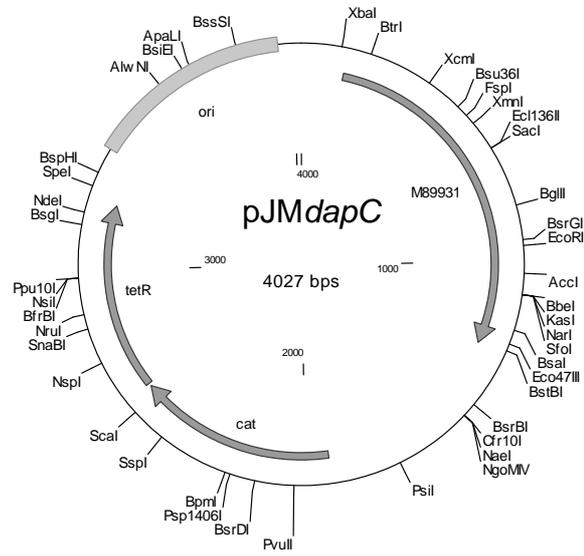


Abb. 48: Expressionsplasmid pJMdapC mit dem Gen *dapC*

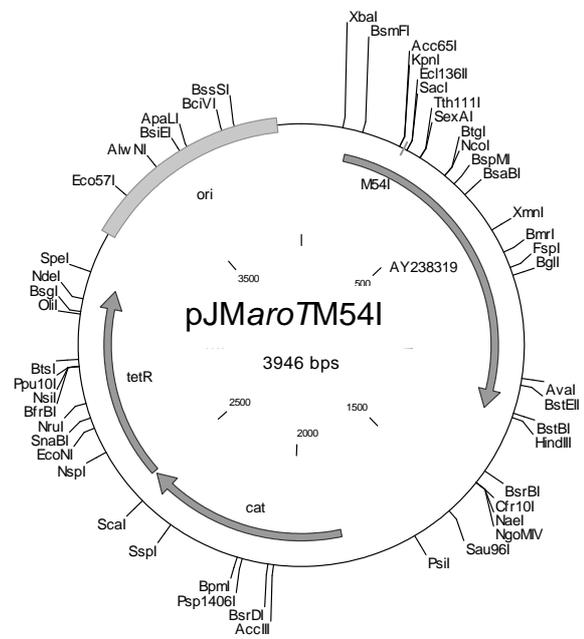


Abb. 49: Expressionsplasmid pJMaroT mit M54I-Substitution

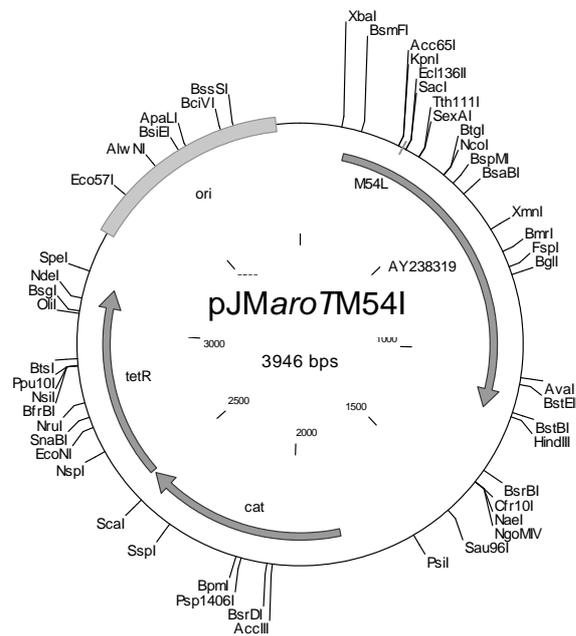


Abb. 50: Expressionsplasmid pJMaroT mit M54L-Substitution

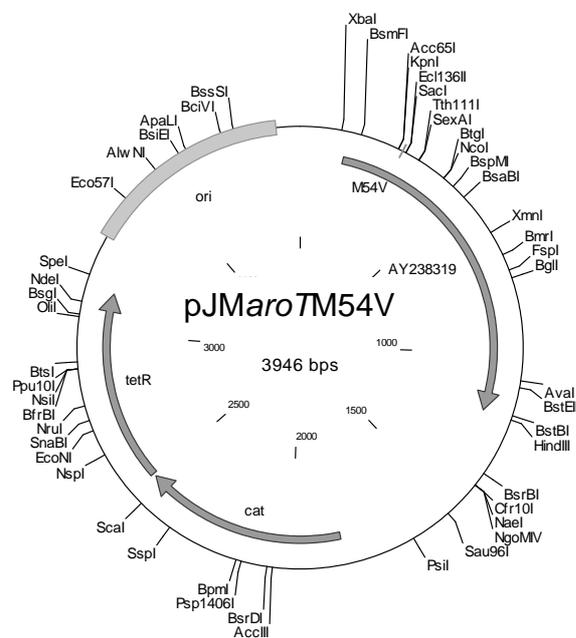


Abb. 51: Expressionsplasmid pJMaroT mit M54V-Substitution

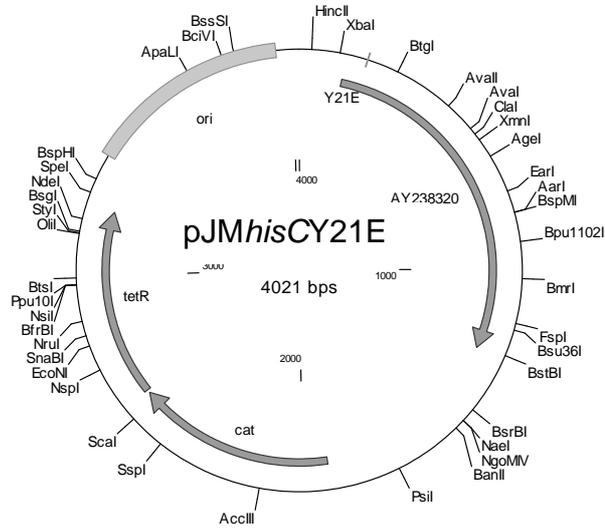


Abb. 52: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y21E-Substitution

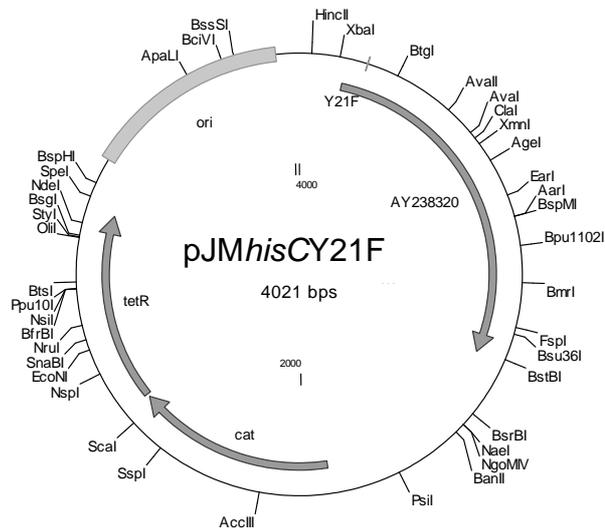


Abb. 53: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y21F-Substitution

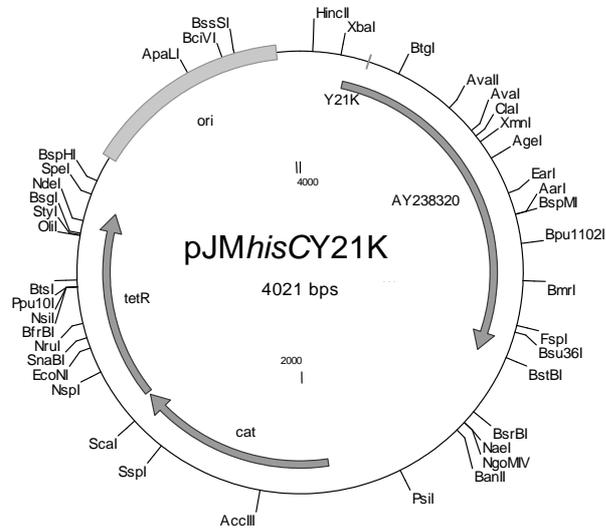


Abb. 54: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y21K-Substitution

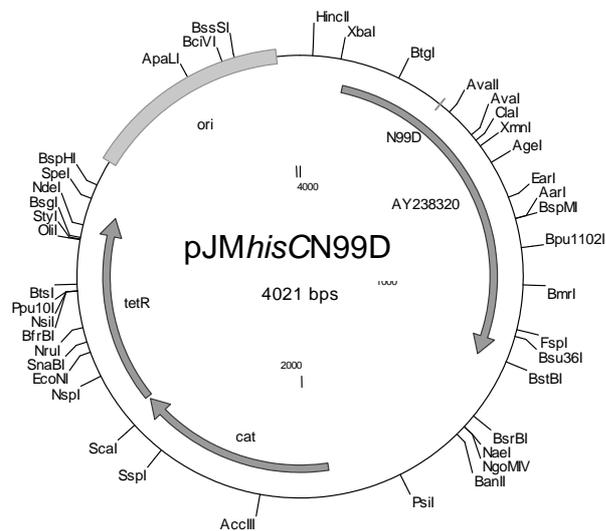


Abb. 55: Expressionsplasmid pJMhisC mit N99D-Substitution

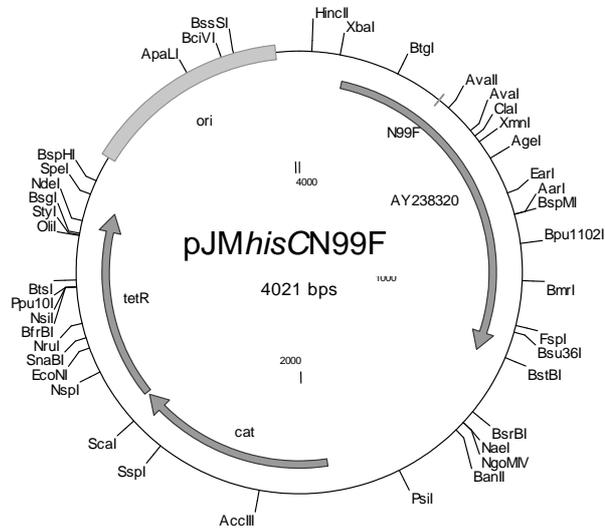


Abb. 56: Expressionsplasmid pJM*hisC* mit N99F-Substitution

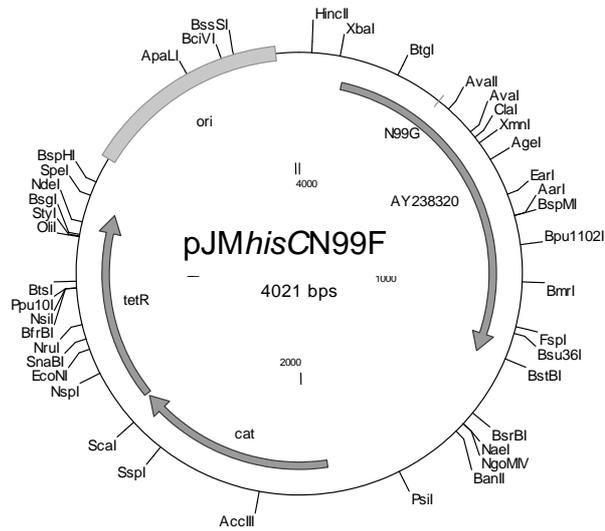


Abb. 57: Expressionsplasmid pJM*hisC* mit N99G-Substitution

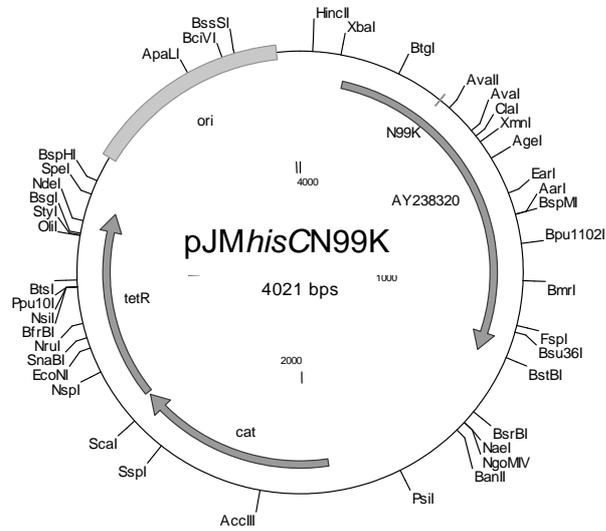


Abb. 58: Expressionsplasmid pJMhisC mit N99K-Substitution

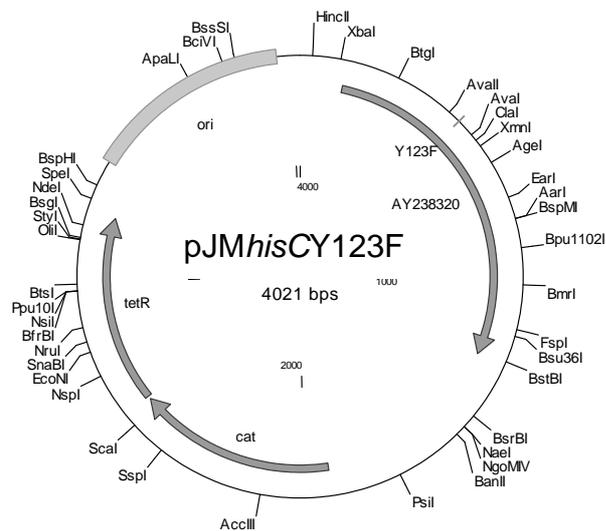


Abb. 59: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y123F-Substitution

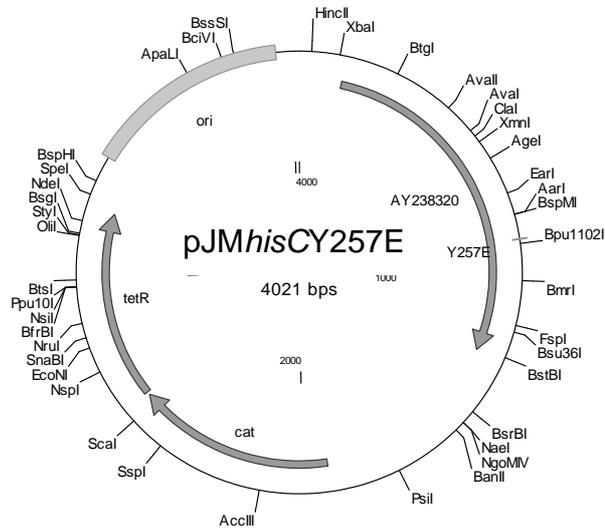


Abb. 60: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y257E-Substitution

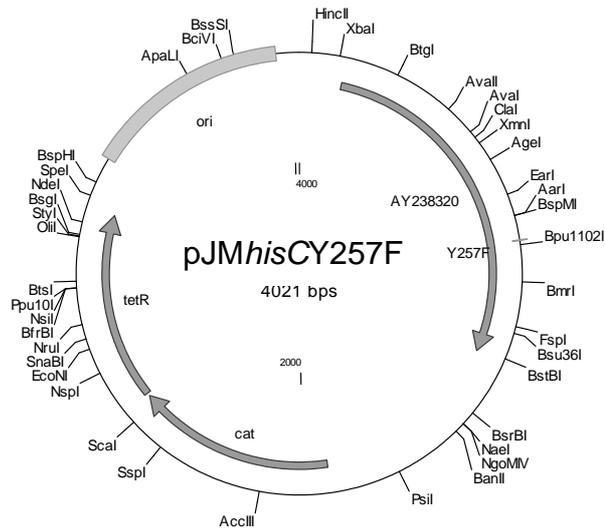


Abb. 61: Expressionsplasmid pJMhisC mit Y257F-Substitution

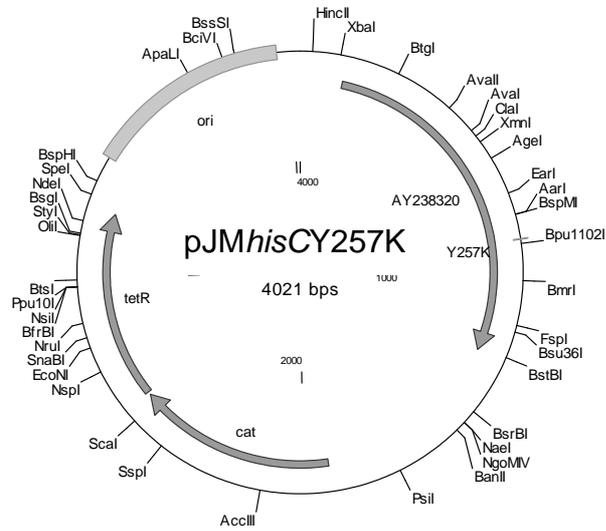


Abb. 62: Expressionsplasmid pJHisC mit Y257K-Substitution

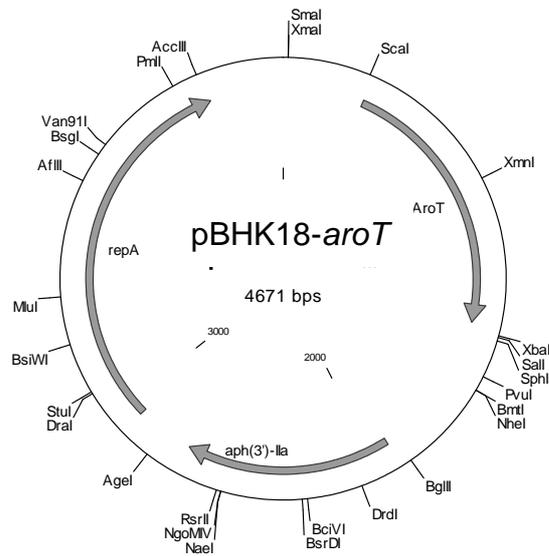


Abb. 63: Low-copy Vektor pBHK18 mit Gen *aroT*

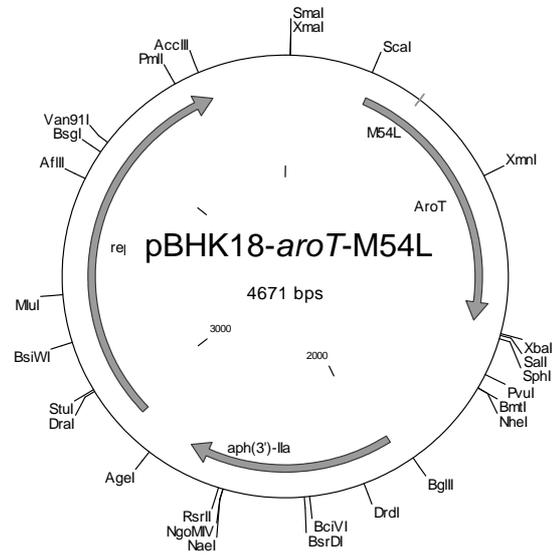


Abb. 64: Low-copy Vektor pBHK18 mit Gen *aroT* und M54L-Substitution

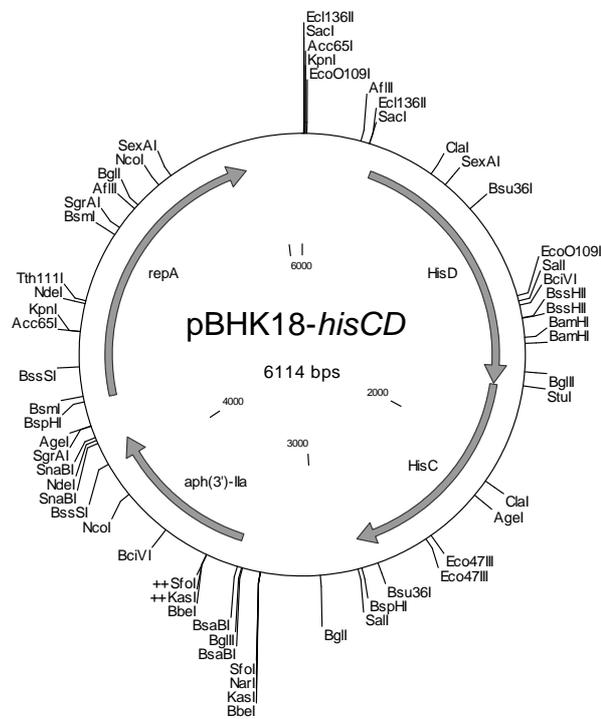


Abb. 65: Low-copy Vektor pBHK18 mit Gen *hisC* und *hisD*

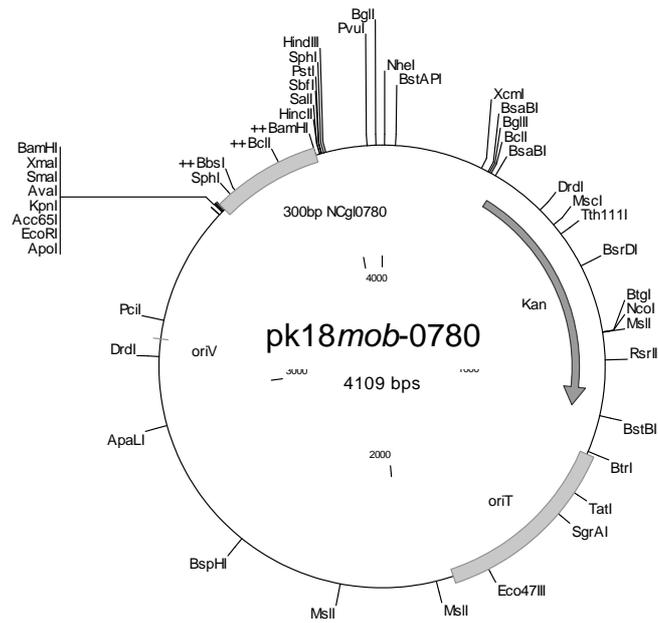


Abb. 70: Vektor *pk18mob* mit einem 300 bp langem internen Fragment von *NCgl0780*

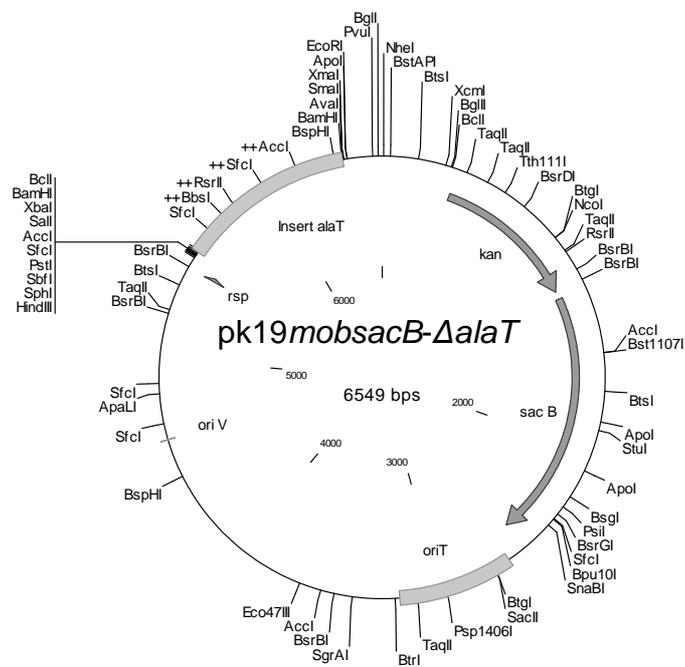


Abb. 71: Vektor *pk19mobsacB-deltaalaT* mit *alaT*-Sequenz. Deletiert ist ein 914 bp langes internes Fragment von *alaT*

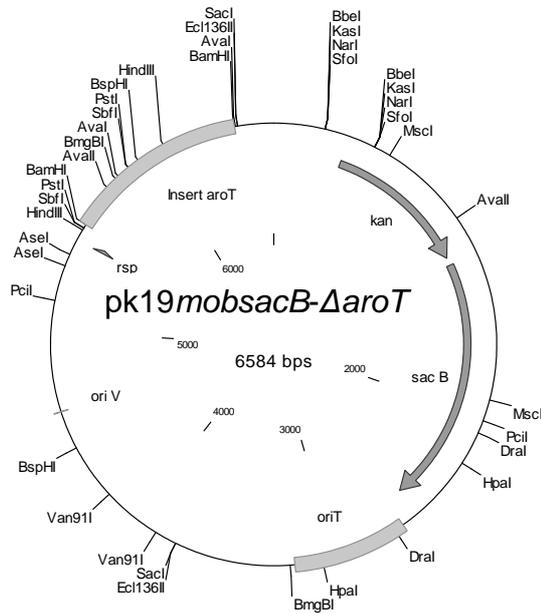


Abb. 72: Vektor *pk19mobsacB-ΔaroT* mit *aroT*-Sequenz. Deletiert ist ein 626 bp langes internes Fragment von *aroT*

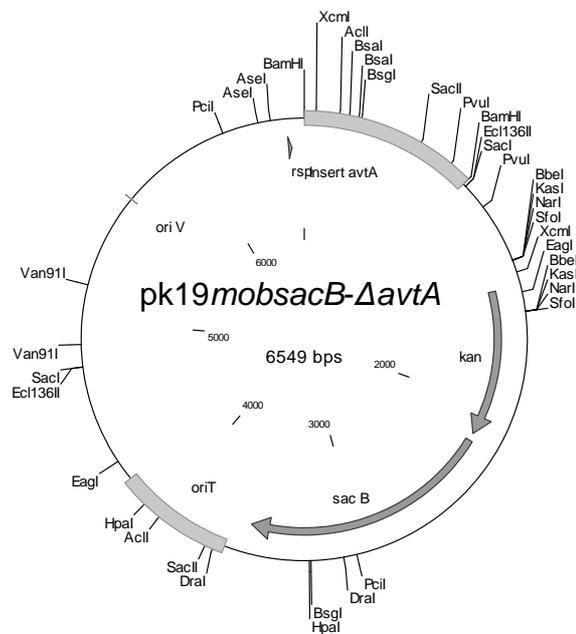


Abb. 73: Vektor *pk19mobsacB-ΔavtA* mit *avtA*-Sequenz. Deletiert ist ein 752 bp langes internes Fragment von *avtA*

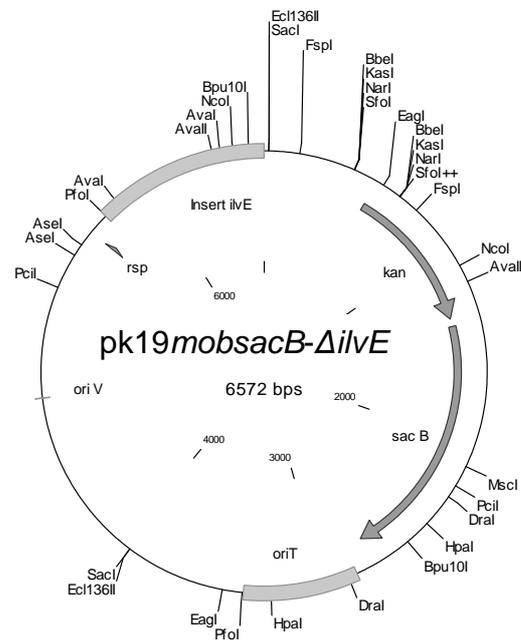


Abb. 74: Vektor *pk19mobsacB-ΔilvE* mit *ilvE*-Sequenz. Deletiert ist ein 769 bp langes internes Fragment von *ilvE*

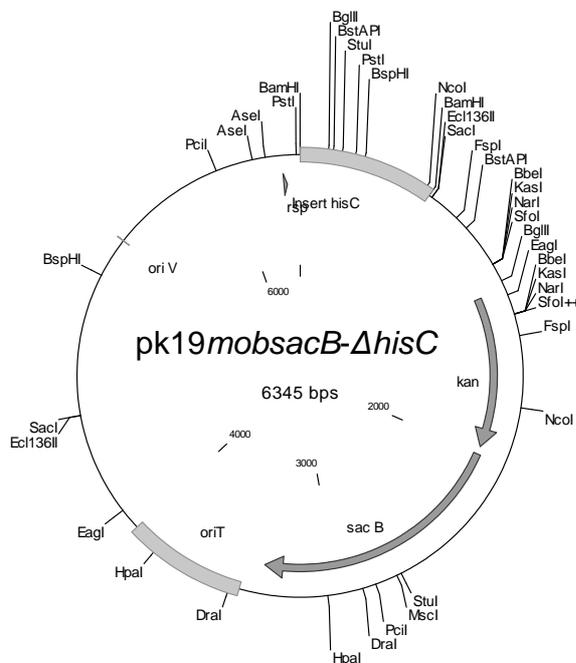


Abb. 75: Vektor *pk19mobsacB-ΔhisC* mit *hisC*-Sequenz. Deletiert ist ein 701 bp langes internes Fragment von *hisC*

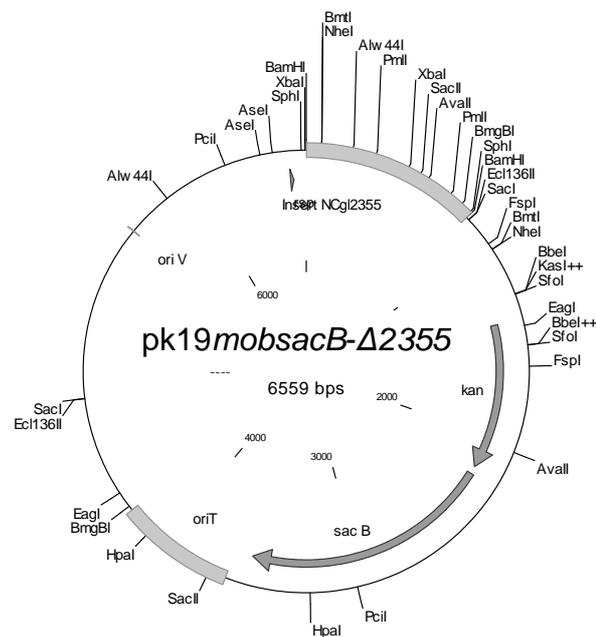


Abb. 76: Vektor *pk19mobsacB-Δ2355* mit *NCgI2355*-Sequenz. Deletiert ist ein 971 bp langes internes Fragment von *NCgI2355*

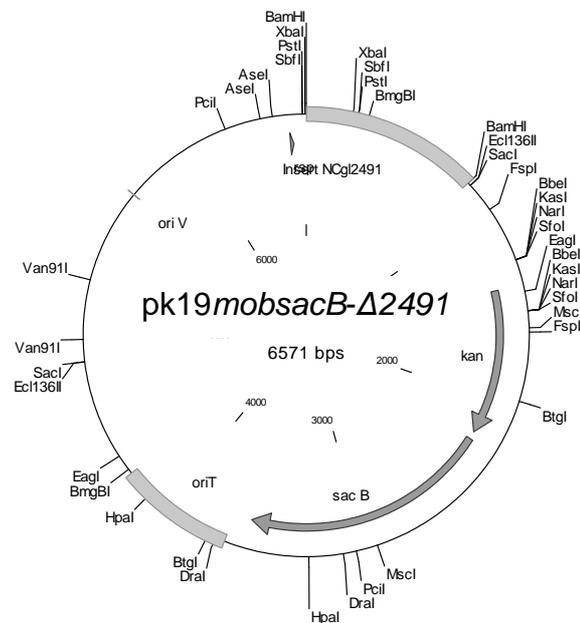


Abb. 77: Vektor *pk19mobsacB-Δ2491* mit *NCgI2491*-Sequenz. Deletiert ist ein 506 bp langes internes Fragment von *NCgI2491*

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Sahm danke ich für die Überlassung des Themas und dem großen Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Jäger danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Eggeling für die engagierte Betreuung, die guten Ratschläge und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Karin Krumbach, Michael Stolz, Roman Netzer, Ramon Diesveld, Jens Schweitzer, Jens Nickel., Laure Botella, Mathias Seidel, Melanie Hoffelder, Helga Etterich und Jan van Ooyen gilt mein Dank für das nette Arbeitsklima und die vielen hilfreichen Tipps.

I would like to thank Prof. Dr. Schneider for the great opportunity to work in his lab at the Karolinska Institutet, Stockholm / Sweden (Sep. `06 – Mar. `07) and Dr. Tatjana Sandalova for the introduction to the fascinating field of structural biology.

Tack så mycket för trevlig tiden: Ylva Lindquist, Eva Lindberg, Ahmad Moshref, Mona Lindgren, Azmiri Sultana, Bernhard Lohkamp, Catrine Berthold, Daniel Ågren, Doreen Dobritzsch, Edvard Wigren, Hanna Koskiniemi, Inari Kursula, Jodie Guy, Magnus Claesson and especially Robert Schnell.

Tobias Bartek und Christiane Rudolf danke ich für die große Hilfe bei der Durchführung der Fermentationsexperimente mit der „*SIXFORS-Vario*“-Anlage.

Allen Mitarbeitern der Institute für Biotechnologie 1 und 2 gilt mein Dank für die freundliche Aufnahme und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Daniela danke ich für liebevolle Unterstützung und für die schöne gemeinsame Zeit, die wir bisher schon hatten.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meiner Familie für die liebevolle Unterstützung bedanken, ohne die ich es sicherlich niemals bis hierher geschafft hätte.

Die vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Außerdem habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den

Jan Marienhagen