



Flavoenzyme und ein FMN-Riboswitch aus *Escherichia coli*  
sind Zielmoleküle für das Riboflavinanalogon Roseoflavin aus  
*Streptomyces davawensis*

Zur Erlangung des Grades eines  
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN  
(Dr. rer. nat.)

Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
Karlsruhe Institut für Technologie (KIT) - Universitätsbereich

genehmigte  
DISSERTATION  
von  
Simone Nicole Langer  
aus  
Friedrichshafen

Dekan: Prof. Dr. Martin Bastmeyer

Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Mack

Tag der mündlichen Prüfung: 19.07.13



---

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Zusammenfassung.....	1
2 Einleitung.....	3
2.1 Flavine und Flavoenzyme .....	3
2.1.1 Struktur und Redoxchemie der Flavine/Flavoenzyme.....	3
2.1.2 Biosynthese der Flavine .....	5
2.1.3 Mikrobielle Transportsysteme für Flavine .....	8
2.2 Das Flavinanalogon Roseoflavin .....	9
2.2.1 Flavoenzyme als Zielstruktur für Roseoflavin .....	10
2.2.2 FMN Riboswitches als Zielstruktur für Roseoflavin.....	12
2.3 Ziel der Arbeit .....	14
3 Material .....	17
3.1 Laborgeräte, Chromatographie-Säulen und Verbrauchsmaterial.....	17
3.1.1 Laborgeräte .....	17
3.1.2 Chromatographie-Säulen und Säulenmaterial.....	18
3.1.3 Verbrauchsmaterial.....	18
3.2 Chemikalien, Enzyme, Komplettsysteme, Marker und Ladepuffer.....	19
3.2.1 Chemikalien .....	19
3.2.2 Enzyme .....	19
3.2.3 Komplettsysteme, Größenmarker und Ladepuffer.....	20
3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	21
3.3.1 Bakterienstämme .....	21
3.3.2 Plasmide .....	21
3.3.3 Oligonukleotide .....	22
3.4 Programme und Datenbanken .....	23
4 Methoden.....	24
4.1 Mikrobiologische Methoden .....	24
4.1.1 Kultivierung und Dauerkulturen von Mikroorganismen.....	24
4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen .....	25
4.2 Molekularbiologische Methoden .....	25
4.2.1 Isolierung genomischer DNA.....	25
4.2.2 Polymerasekettenreaktion.....	25
4.2.3 DNA-Gelelektrophorese .....	26
4.2.4 Restriktionsverdau .....	26
4.2.5 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen.....	27
4.2.6 Ligation .....	27
4.2.7 Transformation von <i>E. coli</i> .....	28
4.2.8 Plasmid-Minipräparation .....	28
4.3 Biochemische Methoden.....	29
4.3.1 Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i> .....	29

---

4.3.2	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie (Gravity Flow).....	29
4.3.3	Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie (Äkta-System).....	30
4.3.4	Größenausschlusschromatographie (SEC).....	30
4.3.5	Aufkonzentrieren von Proteinproben.....	31
4.3.6	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	31
4.3.7	Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE und Western-Blot.....	32
4.3.8	Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF MS/MS.....	32
4.3.9	HPLC-Analyse von Flavinen.....	34
4.3.10	Aktivitätsbestimmung von RibF.....	34
4.3.11	Aktivitätsbestimmung von AzoR.....	35
4.3.12	Gekoppelter <i>in vitro</i> Transkriptions/Translations-Test.....	36
4.3.13	<i>In vivo</i> Riboswitch-Testsystem.....	37
5	Ergebnisse.....	39
5.1	Validierung der Stämme <i>E. coli</i> CpXFMN und CpXFAD zur <i>in vivo</i> Synthese von Flavoholoenzymen.....	39
5.2	Nachweis von RoFMN und RoFAD in <i>E. coli</i> CpXFMN und CpXFAD.....	42
5.2.1	Nachweis von RoFMN und RoFAD im Cytoplasmaas.....	42
5.2.2	Nachweis von RoFMN und RoFAD im löslichen Protein.....	44
5.3	Charakterisierung der Riboflavinkinase/FAD-Synthetase RibF aus <i>E. coli</i> .....	46
5.4	Reinigung von 38 Flavoenzymen aus RoF/RF-behandelten <i>E. coli</i> -Kulturen und Analyse der Cofaktoren.....	51
5.5	Charakterisierung des Flavoproteins Azobenzolreduktase aus <i>E. coli</i> .....	66
5.6	Charakterisierung des Riboswitches <i>sroG</i> aus <i>E. coli</i> .....	75
6	Diskussion.....	79
6.1	Bildung von FMN/FAD-Analoga in rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämmen.....	80
6.2	Flavoenzyme aus <i>E. coli</i> binden die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD.....	83
6.3	AzoR mit dem Cofaktoranalogen RoFMN ist weniger aktiv.....	87
6.4	Der FMN-Riboswitch <i>sroG</i> aus <i>E. coli</i> reguliert die Riboflavin-biosynthese und reagiert auf RoFMN.....	91
7	Literaturverzeichnis.....	96
8	Anhang.....	103
9	Curriculum vitae.....	109
10	Danksagung.....	110

---

## Abkürzungsverzeichnis

RF	Riboflavin
DTT	Dithiothreitol
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavin-5'-mononukleotid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (englisch: high performance liquid chromatography)
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (englisch: Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese (englisch: polyacrylamide gel electrophoresis)
RBS	Ribosomalen Bindestelle
RoF	Roseoflavin
RoFAD	Roseoflavinadenindinukleotid
RoFMN	Roseoflavin-5'-mononukleotid
SDS	Natriumdodecylsulfat (englisch: sodium dodecyl sulfate)
TK/TL	Transkription/Translation
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer (englisch: time of flight mass spectrometry)

## 1 Zusammenfassung

Das Gram-positive Bodenbakterium *Streptomyces davawensis* ist neben *Streptomyces cinnabarinus* der einzig bekannte Produzent des antibiotisch wirksamen Riboflavinanalogons Roseoflavin. Im Cytoplasma von Zielzellen wird Roseoflavin durch Flavokinasen/FAD-Synthetasen zu Roseoflavin-5'-monophosphat (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) umgesetzt. Als mögliche Zielmoleküle für Roseoflavin gelten Flavoenzyme und FMN-Riboswitches. Die letztgenannten Zielstrukturen wurden bereits gut untersucht. Systematische Analysen im Hinblick auf Flavoproteine fehlen jedoch. Daher sollte in dieser Arbeit anhand der Bindung der Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD an Flavoenzyme aus *Escherichia coli* gezeigt werden, dass Flavoenzyme prinzipiell als Zielmoleküle für das Riboflavinanalogon Roseoflavin in Frage kommen. Das Gesamtprotein eines rekombinanten, roseoflavinsensitiven *E. coli*-Stammes wurde isoliert und dessen Flavingehalt wurde mittels HPLC analysiert. Die Zellen enthielten FMN und FAD, wenn sie in der Gegenwart von Riboflavin kultiviert wurden. Die Zellen, die mit Roseoflavin kultiviert wurden, enthielten zusätzlich RoFMN. RoFAD konnte nicht nachgewiesen werden. Die putative Flavokinase/FAD-Synthetase RibF aus *E. coli* wurde überproduziert, gereinigt und biochemisch analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass RibF Riboflavin zu FMN und FAD sowie Roseoflavin zu RoFMN und RoFAD umsetzt.

Darüber hinaus wurden 38 His<sub>6</sub>-markierte *E. coli*-Flavoenzyme in Gegenwart von Riboflavin bzw. Roseoflavin in *E. coli* überproduziert und gereinigt. Alle Flavoenzyme enthielten FMN und/oder FAD, wenn sie in Gegenwart von Riboflavin synthetisiert wurden. In Gegenwart von Roseoflavin enthielten 37 von 38 Flavoenzymen zusätzlich RoFMN und/oder RoFAD.

Weiterhin wurde die FMN-abhängige Azobenzolreduktase AzoR (EC 1.7.1.6) aus *E. coli* als Modellenzym auf RoFMN-Bindung und Aktivität hin analysiert. *In vivo*- und *in vitro*-Experimente zeigten, dass RoFMN sogar mit höherer Affinität ( $K_d = 2 \mu\text{M}$ ) an AzoR bindet als FMN ( $K_d = 10 \mu\text{M}$ ). Die enzymatische Aktivität von AzoR-RoFMN ist jedoch um 70 % reduziert. Durch Strukturanalysen von AzoR-RoFMN konnte gezeigt werden, dass die Gesamtstruktur des Enzyms sowie dessen Dimerisierung durch RoFMN nicht beeinträchtigt wurden. Die Messung des Redoxpotentials von AzoR-RoFMN (-223 mV) ergab eine

Veränderung von 80 mV gegenüber AzoR-FMN (-145 mV). Das pH-Optimum von AzoR verschob sich durch die Bindung von RoFMN von pH 6,3 auf pH 6,9.

Darüber hinaus wurde der FMN-Riboswitch *sroG* vor dem Gen *ribB* (3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat synthase) aus *E. coli* als mögliche Zielstruktur von RoFMN untersucht. Die Deletion von *ribB* führte zu einer 3-fach höheren Riboflavinkonzentration im Medium. Mittels *in vitro*-Transkription/Translation konnte gezeigt werden, dass sowohl FMN als auch RoFMN in der Lage sind, die Expression des Reportergens in Abhängigkeit von der Flavin-konzentration um bis zu 40 % zu reduzieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Roseoflavin *in vivo* zu den Cofaktoren RoFMN und RoFAD umgesetzt wird und dass die Cofaktoranaloga *in vivo* an Flavoenzyme in *E. coli* binden. Die exemplarisch untersuchte FMN-abhängige Azobenzolreduktase AzoR konnte RoFMN binden und war in dieser Form deutlich weniger aktiv. Die Experimente deuten darauf hin, dass die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften von RoFMN für die reduzierte Aktivität von AzoR verantwortlich sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der FMN-Riboswitch aus *E. coli* Teil der Regulation der Riboflavinbiosynthese ist und ebenfalls ein Zielmolekül für Roseoflavin darstellt. Es hat sich herausgestellt, dass Roseoflavin ein vielseitiges Antibiotikum ist, das mit Flavoenzymen und FMN-Riboswitches mehrere Zielmoleküle in einer Zelle besitzt.

## 2 Einleitung

Riboflavin (7,8-Dimethyl-10-(1'-D-ribityl)-isoalloxazin) wurde 1879 als gelbes Pigment in Milch entdeckt und aus diesem Grund ursprünglich Lactoflavin genannt. Die chemische Struktur wurde in den 1930er Jahren durch Paul Karrer und Richard Kuhn aufgeklärt. In diesem Zusammenhang erhielten sie 1937 bzw. 1938 den Nobelpreis. Heutzutage wird Riboflavin in Tierfutter, als Lebensmittelzusatz (E101) sowie als Nahrungsergänzungsmittel (Vitamin B<sub>2</sub>) eingesetzt. Industriell wird Riboflavin biotechnologisch durch die Verwendung von Mikroorganismen (u.a. *Bacillus subtilis*, *Ashbya gossypii*, *Candida famata*) hergestellt (Stahmann et al., 2000).

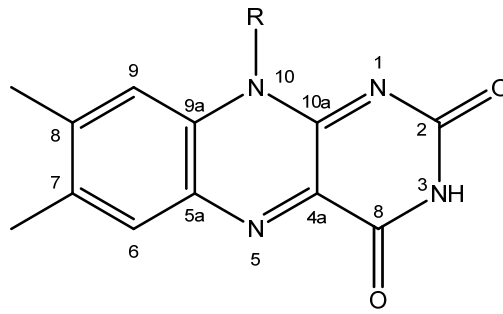
Riboflavin kann von Pflanzen und den meisten Mikroorganismen synthetisiert werden. Ausnahmen sind u.a. *Corynebacterium pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, Mycoplasmen, Spirocheten, Rickettsien, Protisten und einige Milchsäurebakterien. Diese Organismen, alle Tiere und der Mensch müssen Riboflavin aus ihrer Umwelt bzw. durch ihre Nahrung aufnehmen. Hierfür stehen ihnen verschiedene Transportsysteme zur Verfügung. In den Zellen dient Riboflavin als Ausgangssubstrat für die Synthese von Riboflavin-5-monophosphat (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD), die als Cofaktoren in Flavoenzymen verwendet werden. Flavoenzyme sind Redoxproteine, die eine Vielzahl biologischer Reaktionen katalysieren (Vitreschak et al. 2002).

### 2.1 Flavine und Flavoenzyme

#### 2.1.1 Struktur und Redoxchemie der Flavine/Flavoenzyme

Als Flavoenzyme werden Enzyme bezeichnet, die Flavine als Cofaktor verwenden. Etwa 0,1-3,5 % aller Proteine in einer Zelle gehören zu den Flavoenzymen (Macheroux et al. 2011). Die Grundstruktur der Flavine besteht aus einem trizyklischen Isoalloxazinringssystem und einem Ribitylrest (Abbildung 2.1). Der Isoalloxazinring ist zum einen der Chromophorteil des Flavins und verleiht ihm seine intensive Farbe, zum anderen ist er auch für die katalytischen Fähigkeiten der Flavine verantwortlich. Die Seitenketten dienen hauptsächlich der Verankerung des Cofaktors im aktiven Zentrum des Proteins (Ghisla & Massey, 1989).





**Abbildung 2.1: Grundstruktur der Flavine.**

Flavine bestehen aus einem trizyklischen Isoalloxazinring und einem Ribitylrest am N(10)-Atom. Das Ringsystem kann am N(1) und N(5) reduziert werden und verleiht den Flavinen ihre katalytischen Fähigkeiten.

Das bekannteste Flavin ist Riboflavin, welches auch als Vitamin B<sub>2</sub> bekannt ist. Es ist ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung. Riboflavin selbst kommt in den Zellen jedoch sehr selten vor und wird sehr schnell und effizient zu den Cofaktoren Riboflavin-5-monophosphat (FMN) phosphoryliert und weiter zu Flavinadenindinukleotid (FAD) adenyliert (Walsh, 1980). Flavine können sowohl ein- als auch zwei-Elektronentransferreaktionen eingehen, worauf ihre vielseitigen Einsatzmöglichkeiten im Metabolismus einer Zelle beruhen. Werden Flavine reduziert, nehmen sie bis zu zwei Elektronen und Protonen auf, die an Position N(1) und N(5) gebunden werden. Daraus ergeben sich die drei möglichen Redoxzustände des Flavins: Oxidierte Form, Semiquinon (ein Elektron reduziert) und Quinon (zwei Elektronen reduziert) (Ghisla & Massey, 1989).

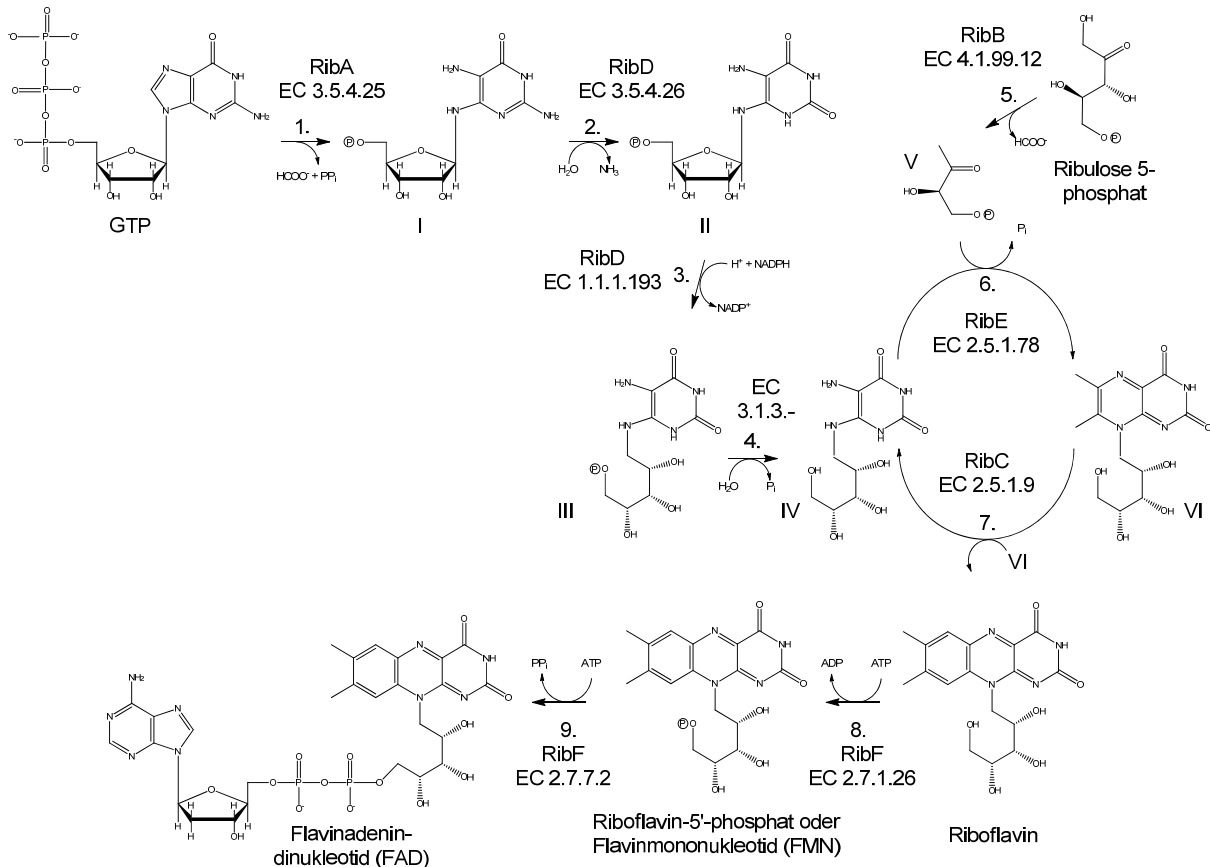
Das Redoxpotential für freie reduzierte Flavine liegt bei -200 mV. Dieser Wert kann durch die Proteinbindung jedoch erheblich beeinflusst werden und schwankt zwischen -400 und 60 mV. Dabei spielen u.a. die Art der Bindung (kovalent oder nicht kovalent) und die Hydrophobizität der Flavinbindetasche eine Rolle (Fraaije & Mattevi, 2000). Die Cofaktoren FMN und FAD sind meist fest, jedoch nur in etwa 10 % der Fälle kovalent an Enzyme gebunden. Kovalente Bindungen von FMN erfolgen entweder über C(8a) an N(3) eines Histidins oder über C(6) des Isoalloxazinrings an einen Cystein-Schwefel. Die kovalente Bindung von FAD erfolgt dagegen immer über C(8a) an N(1) oder N(3) eines Histidins, einen Cystein-Schwefel, eine Tyrosin-Hydroxyl- oder Aspartat-Carboxylgruppe. In wenigen Fällen sind die Cofaktoren bivalent an das Enzym (Macheroux et al. 2011). Durch die feste Bindung des Cofaktors an das Enzym muss dessen Regeneration am Enzym stattfinden. Daher besteht die Reaktion eines Flavoenzymes stets aus einer reduktiven und einer oxidativen Halbreaktion. Im Gegensatz dazu werden andere Elektronenüberträger wie beispielsweise NADH nicht am Enzym regeneriert, sondern von einem zweiten Enzym reoxidiert (Ghisla & Massey, 1989).

In der Zelle dienen Flavine als Mediator zwischen obligaten zwei-Elektronenüberträgern (z.B. Nikotinamide) und obligaten ein-Elektronenüberträgern (z.B. Eisen-Schwefel-Cluster oder Hämgruppen). Ein Beispiel hierfür ist die NADPH-Cytochrom-P450-reduktase, die zwei Elektronen von NADPH aufnimmt und sie einzeln an das Hämenzym Cytochrom-P450 abgibt (Miura, 2001). Zudem sind Flavine, im Gegensatz zu anderen Elektronenüberträgern, durch die relative Stabilität des Semiquinons zu einer Reaktion mit molekularem Sauerstoff fähig (Walsh, 1980). Flavine katalysieren jedoch nicht nur Redoxreaktionen, sondern sind auch in der Lage Photonen zu übertragen und spielen beispielsweise in der lichtabhängigen DNA-Reparatur eine Rolle (Miura, 2001). In Pflanzen nutzen die LOV-Domänen der Phototropin-Photorezeptoren FMN als Cofaktor und regulieren blaulichtinduziert das Öffnen der Stomata, die Chloroplastenlokalisation und den Phototropismus (Fischer & Bacher, 2008).

### 2.1.2 Biosynthese der Flavine

Riboflavin, auch Vitamin B<sub>2</sub> genannt, ist der direkte Vorläufer der Cofaktoren FMN und FAD. Es muss von Menschen und Tieren mit der Nahrung aufgenommen werden. Pflanzen und viele Mikroorganismen sind jedoch in der Lage, Riboflavin, ausgehend von einem Molekül GTP und zwei Molekülen Ribulose-5-phosphat, selbst zu synthetisieren. In Abbildung 2.2 ist der Biosyntheseweg von Riboflavin dargestellt. Zunächst wird GTP durch die GTP-Cyclohydrolase II unter Abspaltung von Formiat und Phosphat zu 2,5-Diamino-6-ribosylamino-4(3H)-pyrimidindionphosphat (I) umgesetzt. In den nächsten, weniger gut untersuchten Schritten wird durch hydrolytische Abspaltung der 2-Aminogruppe, Reduktion der Ribose-seitenkette und Dephosphorylierung das 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H, 3H)-pyrimidindion (IV) gebildet. Die Reihenfolge von Deaminierung und Reduktion der Seitenkette unterscheidet sich hierbei in unterschiedlichen taxonomischen Gruppen. Durch die anschließende von der 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase katalysierten Kondensation mit 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat (3,4-DHBP) (V) entsteht 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin (VI). 3,4-DHBP wird durch die katalytische Aktivität der 3,4-DHBP-Synthase aus Ribulose-5-phosphat gebildet. Bei *B. subtilis* handelt es sich hierbei um ein bifunktionelles Enzym, welches auch die katalytische Domäne der GTP-Cyclohydrolase II trägt. *E. coli* dagegen besitzt separate Enzyme für beide Reaktionen. Im letzten Syntheseschritt katalysiert die

Riboflavinsynthese eine Dismutation von zwei Molekülen 6,7-Dimethyl-8-ribityllumazin, wobei Riboflavin und 5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1H,3H)-pyrimidindion (IV) entstehen. Letzteres dient wieder als Substrat für die Lumazinsynthese (Fischer & Bacher, 2005). In Tabelle 2.1 sind die Enzyme der Riboflavinbiosynthese sowie der Name der entsprechenden Gene in *E. coli* bzw. *B. subtilis* aufgeführt.



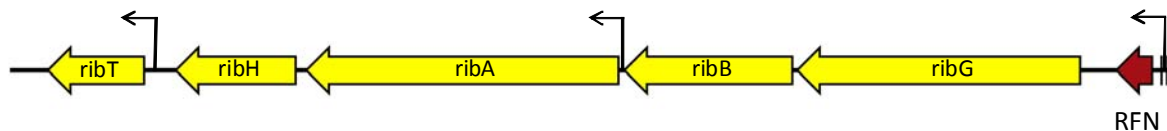
**Abbildung 2.2: Riboflavinbiosynthese.**

Abgebildet ist die Riboflavinbiosynthese unter Angabe der Enzymnamen von *E. coli*. Eine genaue Beschreibung findet sich im Fließtext.

**Tabelle 2.1: Proteine und Gene der Riboflavinbiosynthese.**

Protein	Gen	
	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>
GTP-Cyclohydrolase II	<i>ribA</i>	<i>ribA</i>
Diamino-hydroxy-phosphoribosylamino-pyrimidin-deaminase	<i>ribD (ribG)</i>	<i>ribD</i>
5-Amino-6-(5-phosphoribosylamino)uracil-reduktase	<i>ribD (ribG)</i>	<i>ribD</i>
3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-synthase	<i>ribA</i>	<i>ribB</i>
6,7-Dimethyl-8-ribityllumazinsynthase	<i>ribH</i>	<i>ribE</i>
Riboflavinsynthase	<i>ribE (ribB)</i>	<i>ribC</i>

Die Riboflavinbiosynthesegene sind in *E. coli* über das Genom verteilt, wogegen die Gene *ribGBAHT* in *B. subtilis* in einem Gencluster organisiert sind (Abbildung 2.3) (Kil et al., 1992). Riboflavinbiosynthesegencluster finden sich auch in *Bacillus amyloliquefaciens*, *Actinobacillus pleuropneumoniae* und *Bartonella* Spezies (Fuller & Mulks 1995; Gusarov et al. 1997; Bereswill et al. 1999). In vielen Bakterien wird die Riboflavinbiosynthese über einen FMN-Riboswitch reguliert. Dabei handelt es sich um regulatorische Elemente in der 5'-untranslatierten Region der mRNA. Das Binden eines Metaboliten (FMN) führt zu einer Konformationsänderung, die letztendlich einen Transkriptions- oder Translationsstopp bewirkt (siehe Kapitel 2.2.2).



**Abbildung 2.3: rib-Gencluster in *B. subtilis*.**

Die Gene *ribGBAH* sind in einem Operon angeordnet und stehen auf mRNA-Ebene unter der Kontrolle eines RFN-Elements (Riboswitch). Die Promotoren sind als Pfeile dargestellt. In *E. coli* sind die *rib*-Gene über das Genom verteilt.

Die Synthese der Cofaktoren FMN und FAD aus Riboflavin findet im Cytoplasma schnell und effizient durch die Flavokinase/FAD-Synthetase statt. Je nach Organismus handelt es sich um ein bifunktionelles Enzym oder zwei separate Enzyme. Die Enzyme RibF aus *E. coli* und RibC aus *B. subtilis* sind, wie für Eubakterien typisch, bifunktionelle Flavokinasen/FAD-Synthetasen. *B. subtilis* besitzt mit RibR zusätzlich eine monofunktionale Flavokinase, wie sie vor allem bei Hefen verbreitet ist (Vitreschak et al. 2002; Fischer & Bacher 2005). In Eukaryoten sind ausschließlich monofunktionale Flavokinasen und FAD-Synthetasen bekannt (Abbas & Sibirny, 2011).

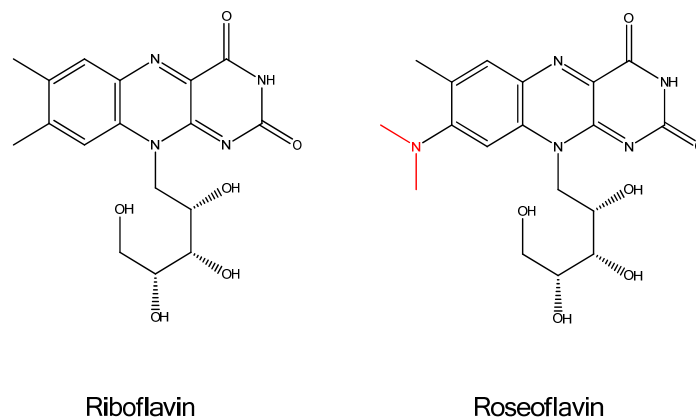
### 2.1.3 Mikrobielle Transportsysteme für Flavine

Wie bereits erwähnt sind nicht alle Mikroorganismen in der Lage, Riboflavin selbst zu synthetisieren, wie zum Beispiel Spirochäeten, Mycoplasmen und Rickettsien (Vitreschak et al., 2002). Dies macht entsprechende Transportsysteme notwendig, die sich jedoch nicht ausschließlich in riboflavinauxotrophen Mikroorganismen finden. Da für die Synthese von einem Molekül Riboflavin 25 Moleküle ATP benötigt werden, ist auch für Bakterien, die über Riboflavinbiosynthesegene verfügen, der Import aus der Umwelt interessant. Es werden drei Klassen von Riboflavintransportern unterschieden: Homologe von *ypaA* aus *B. subtilis*, Homologe von *pnuX* (teilweise auch *ribM* genannt) aus *Corynebacterium glutamicum* und Homologe von *impX* aus *Fusobacterium nucleatum*. Letztere Gruppe ist funktionell noch nicht charakterisiert und wurde durch vergleichende Genanalysen identifiziert. Transporter des *impX*-Typs setzen sich aus neun putativen Transmembransegmenten zusammen (Vitreschak et al., 2002). Der Transporter YpaA aus *B. subtilis* gehört zur BART-Superfamilie (Englisch: BART: bile/arsenite/riboflavin transporter) und setzt sich aus fünf Transmembransegmenten zusammen (Mansour et al., 2007). Der Transport findet Carrier-vermittelt statt und zeigt eine hohe Affinität zum Substrat ( $K_m = 5\text{-}20\text{ nM}$ ), wobei der Transport auch entgegen des Konzentrationsgefälles stattfindet. Die Regulation des Transporters erfolgt durch FMN, das an einen Riboswitch bindet und die Translation der mRNA blockiert (Cecchini et al. 1979; Winkler et al. 2002). In *Lactococcus lactis* findet sich mit RibU ein homologer Transporter, der durch einen Riboswitch auf transkriptioneller Ebene reguliert wird und im Gegensatz zu YpaA energieunabhängig durch vereinfachte Diffusion arbeitet. Transporter dieses Typs kommen bei Gram-positiven Bakterien und Archaeen vor. Bei Genomanalysen Gram-negativer Bakterien fanden sich keine Hinweise auf Transporter des *ypaA*-Typs (Burgess et al., 2006). Bei PnuX aus *C. glutamicum* handelt es sich ebenfalls um einen energieunabhängigen Transporter mit einem  $K_m = 11\text{ }\mu\text{M}$  für Riboflavin. Der Transport vermittelt den Fluss von Riboflavin entlang eines Konzentrationsgefälles. Da Riboflavin in der Zelle schnell zu FMN und FAD umgesetzt wird, handelt es sich bei PnuX vermutlich *in vivo* um eine Art Importer (Vogl et al., 2007). PnuX besteht aus sechs Transmembransegmenten und ist ein Homolog zu PnuC aus Enterobakterien. Ein Transporter dieser Gruppe wurde auch in *Streptomyces davawensis* (RibM) beschrieben (Grill et al., 2007). Eukaryotische Riboflavintransporter sind nicht verwandt mit den oben beschriebenen bakteriellen Transportern. Erst

2013 wurde ein weiterer Riboflavintransporter beschrieben. Im Spirochäten *Treponema pallidum* kommt der zur Gruppe der ABC-Transporter (ABC: ATP-binding cassette) gehörende Riboflavintransporter RfuABCD vor. Transporter dieses Typs setzen sich aus einem Ligandenbindepotein (LBP), einer integralen Membranpermease und einer ATPase zusammen. Homologe Proteine finden sich auch in *Treponema denticola* und *Borrelia burgendorferi* (Deka et al., 2013).

## 2.2 Das Flavinanalogon Roseoflavin

Das Gram-positive Bodenbakterium *S. davawensis* wurde 1974 im Rahmen eines Screeningprogramms nach neuen Antibiotika aus einer philippinischen Bodenprobe isoliert und ist neben *Streptomyces cinnabarinus* der einzige bekannte Produzent des Riboflavinanalogons Roseoflavin. Seinen Namen verdankt es der strukturellen Ähnlichkeit zu Riboflavin und seiner roten Farbe. Roseoflavin (8-Dimethylamino-8-demethyl-D-riboflavin) trägt am C8-Atom des Isoalloxazinrings statt einer Methylgruppe eine Dimethylaminogruppe (Abbildung 2.4) (Otani et al. 1974; Jankowitsch et al. 2012).

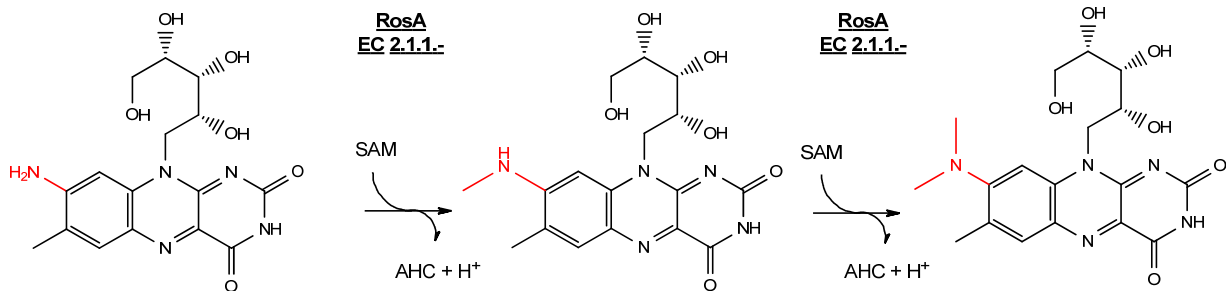


**Abbildung 2.4: Struktur von Riboflavin und Roseoflavin.**

Das Riboflavinanalogon Roseoflavin unterscheidet sich von Riboflavin durch eine Dimethylaminogruppe am C(8)-Atom des Isoalloxazinrings.

Die Biosynthese von Roseoflavin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch Fütterungsexperimente mit radioaktiv markiertem Riboflavin konnte jedoch nachgewiesen werden, dass Roseoflavin aus Riboflavin synthetisiert wird (Matsui et al., 1979). Des Weiteren zeigten Juri et al. (1987), dass aus 8-Aminoriboflavin durch die Übertragung von Methylgruppen

zunächst 8-Methylamino-8-demethyl-D-riboflavin und dann Roseoflavin entsteht. Für diesen letzten Syntheseschritt ist die *N,N*-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin-dimethyltransferase (RosA) verantwortlich, die zwei Methylgruppen von S-Adenosylmethionin auf 8-Amino-riboflavin überträgt (Abbildung 2.5) (Jankowitsch et al., 2011).



**Abbildung 2.5: Letzter Schritt der Roseoflavin-Biosynthese.**

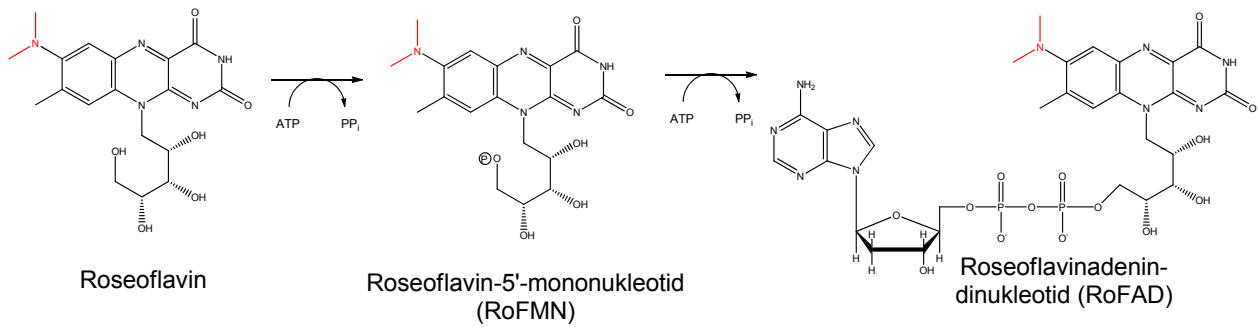
Aus 8-Aminoriboflavin wird durch die Übertragung einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin zunächst 8-Methylamino-8-demethyl-D-riboflavin gebildet. Durch die Übertragung einer weiteren Methylgruppe entsteht Roseoflavin. Die Reaktion wird durch die *N,N*-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin-dimethyltransferase (RosA) katalysiert.

Roseoflavin ist das einzig bekannte Riboflavinanalogon mit antibiotischer Wirkung. Es hemmt das Wachstum von Gram-positiven Bakterien wie *B. subtilis* und *Staphylococcus aureus*, wirkt aber auch gegen Gram-negative Bakterien wie *E. coli*, wenn Roseoflavin durch geeignete Transportsysteme in die Zelle gelangen kann (Grill et al. 2007; Vogl et al. 2007). Des Weiteren wird die Wirksamkeit gegen den Malariaerreger *Plasmodium falciparum* diskutiert (Geary et al., 1985).

Der Wirkungsmechanismus von Roseoflavin ist noch nicht vollständig aufgeklärt (Abbas & Sibirny, 2011). Als mögliche Zielstrukturen kommen Flavoenzyme und FMN-Riboswitches in Frage.

### 2.2.1 Flavoenzyme als Zielstruktur für Roseoflavin

Riboflavin ist der Vorläufer für die Cofaktoren FMN und FAD, die an Enzyme gebunden vielfältige Reaktionen katalysieren können. Da die Riboflavinkinase/FAD-Synthetase z.B. aus *B. subtilis* und *S. davawensis* neben Riboflavin auch Roseoflavin als Substrat nutzen kann, werden vermutlich auch im Cytoplasma die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD gebildet (Abbildung 2.6) (Grill et al., 2008).



**Abbildung 2.6: Bildung der Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD aus Roseoflavin.**

Reaktion von Roseoflavin zu den Cofaktoranaloga Roseoflavin-5'-mononucleotid (RoFMN) und Roseoflavinadenindinucleotid (RoFAD). Die Reaktion wird von der Flavokinase/FAD-Synthetase katalysiert.

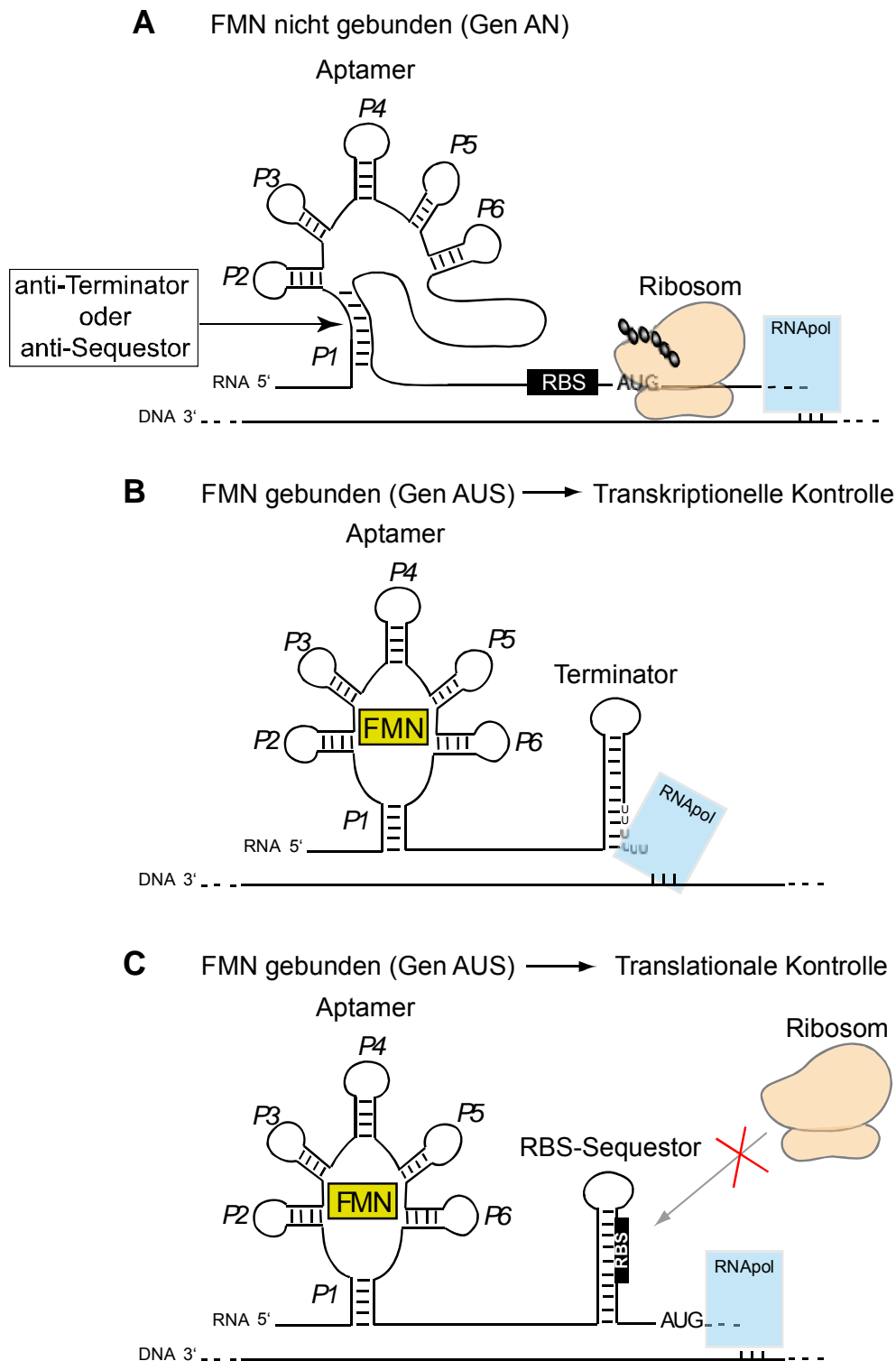
Es wird vermutet, dass die Cofaktoren RoFMN und RoFAD aufgrund ihrer veränderten Struktur inaktiv sind, aber trotzdem von FMN- und FAD-abhängigen Enzymen gebunden werden. Dies würde zu inaktiven Flavoenzymen führen. Beispielsweise konnte für die FAD-abhängige *D*-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.3) aus *Sus scrofa* gezeigt werden, dass sie mit RoFAD als Cofaktor inaktiv ist (Grill et al., 2008).

Flavoenzyme stellen zwischen 0,1 % und 3,5 % aller vorhergesagten Gene einer Zelle dar. Sie sind dabei in einer Vielzahl unterschiedlicher biologischer Prozesse involviert. Die meisten von ihnen (90 %) katalysieren Redoxreaktionen. Flavoenzyme sind aber auch an anderen Vorgängen wie z.B. Phototropismus, DNA-Reparatur und Stickstofffixierung beteiligt. Die Anzahl der Flavoproteine ist für verschiedene Organismen sehr unterschiedlich. So haben beispielsweise *Pyrococcus abyssi*, *Thermotoga maritima* und *Saccharomyces cerevisiae* eine minimale Ausstattung an Flavoenzymen (mit 12, 12 und 48 Einträgen in den Datenbanken). Im Gegensatz dazu besitzen *Mycobacterium tuberculosis*, *Neurospora crassa* und *Streptomyces coelicolor* mit jeweils mehr als 100 Datenbankeinträgen eine relativ große Anzahl an Flavoenzymen. Abhängig von der Lebensweise und dem Habitat benötigen verschiedene Organismen eine unterschiedliche Anzahl an flavinabhängigen Enzymen (Macheroux et al., 2011). Durch ihre weite Verbreitung und ihre wichtige Rolle im Leben einer Zelle stellen Flavoenzyme folglich ein breites Ziel für analoge Cofaktoren wie RoFMN und RoFAD dar. Voraussetzung hierfür ist der Import des Flavinanalogs über Transporter in die Zelle und die Umsetzung zu Cofaktoranaloga durch die Flavokinase/FAD-Synthetase.



### 2.2.2 FMN Riboswitches als Zielstruktur für Roseoflavin

Ein Riboswitch (RNA-Schalter) ist ein Bereich in der 5'-untranslatierten Region einer mRNA (Messenger-RNA), der die Expression dahinterliegender Gene beeinflusst. Bekannt sind Riboswitches bei Bakterien, Hefen, Pilzen und Pflanzen, nicht jedoch beim Menschen (Blount & Breaker 2006; Bocobza et al. 2007). Der Riboswitch besteht aus zwei Domänen: Das Aptamer, das hochspezifisch Liganden bindet und die Expressionsplattform, deren Struktur sich in Abhängigkeit des Bindestatus der Aptamer-Domäne ändert und dadurch die Expression nachfolgender Gene beeinflusst. Die Liganden sind in der Regel kleine Moleküle wie Nukleotide, Vitamine und Aminosäuren und regulieren Gene, die mit ihrer Bildung oder ihrem Metabolismus in Verbindung stehen. Ein Beispiel ist der FMN-Riboswitch, der in vielen Bakterien ein oder mehrere Gene der Riboflavinbiosynthese reguliert. Die Grundstruktur des Aptamers besteht beim FMN-Riboswitch aus sechs Ringen, deren Sequenz vor allem im Basisbereich der Ringe konserviert ist. Das Aptamer befindet sich im 5'-untranslatierten Bereich der mRNA (Winkler et al. 2002). Im Allgemeinen werden zwei verschiedene Regulationsmechanismen unterschieden: Bei der transkriptionellen Kontrolle führt die Bindung von FMN am Aptamer zur Bildung einer Terminator-Haarnadelstruktur innerhalb der Expressionsplattform-Domäne. Dadurch fällt die RNA-Polymerase von der DNA ab und die mRNA des Folgegens wird nicht synthetisiert. Bei der translationalen Kontrolle bewirkt die Bindung von FMN zur Bildung einer RBS-Sequestor-Struktur (Ribosomal Binding Site) innerhalb der Expressionsplattform-Domäne. Diese maskiert die RBS des Folgegens und verhindert so das Anlagern des Ribosoms und infolgedessen die Translation der mRNA. In beiden Fällen wird kein Protein gebildet und das Gen ist ausgeschaltet. Wenn kein FMN am Aptamer bindet, kann sich die anti-Terminator- bzw. anti-Sequestor-Struktur bilden, was eine Synthese der RNA durch die RNA-Polymerase bzw. das Anlagern des Ribosoms und damit die Translation der mRNA zulässt. In diesem Fall ist das Gen angeschaltet (Abbildung 2.7) (Vitreschak et al. 2002; Serganov et al. 2009).



**Abbildung 2.7: Mechanismus der Genkontrolle durch den FMN-Riboswitch.**

Bei niedrigen FMN-Konzentrationen (A) bindet das Aptamer kein FMN und bildet die anti-Terminator- oder anti-Sequestor-Struktur, wodurch Transkription und Translation stattfinden können. (B) Bei hohen FMN-Konzentrationen bindet das Aptamer FMN und faltet sich in die sogenannte "butterfly-like scaffold"-Struktur. Dies führt zur Bildung einer Terminator-Schleife im Downstream-Bereich, was den Abfall der RNA-Polymerase von der DNA und somit einen Transkriptionsstopp bewirkt. (C) Alternativ kann die Bindung von FMN bei hohen FMN-Konzentrationen auch zur Bildung der RBS-Sequestor-Schleife im Downstream-Bereich bewirken. In diesem Fall kann die Transkription ungehindert erfolgen, die Anlagerung der Ribosomen an die RBS wird jedoch verhindert und es findet keine Translation statt.

Das Gen *ypaA*, welches für einen Flavintransporter in *B. subtilis* codiert, wird von einem FMN-Riboswitch auf translationaler Ebene reguliert, indem der Start der Translation durch Anlagern des Ribosoms verhindert wird. Auch das Gencluster *ribGBAHT* der Riboflavinbiosynthese in *B. subtilis* wird durch einen FMN-Riboswitch reguliert. Hier findet im Gegensatz zu *ypaA* jedoch eine transkriptionelle Regulation statt (Vitreschak et al. 2002; Winkler et al. 2002). Es wird allgemein angenommen, dass die Riboflavinbiosynthese in Gram-positiven Bakterien transkriptionell reguliert wird, wogegen bei den meisten Gram-negativen Bakterien eine translationale Kontrolle vorliegt. Neben den Biosynthesegenen werden auch viele Riboflavintransporter durch Riboswitches reguliert (Vitreschak et al., 2002). Einige Riboswitches binden neben ihrem natürlichen Liganden auch analoge Substanzen. Der Thiaminpyrophosphat-Riboswitch reagiert beispielsweise auch auf Pyrithiaminpyrophosphat, was zu einem reduzierten Wachstum einiger Bakterien- und Pilzspezies führt (Blount & Breaker 2006). Ein weiteres Beispiel ist der Lysin-Riboswitch, der durch die Bindung von Lysinanaloga und die damit verbundene Reduktion der Genexpression das Wachstum einiger Gram-positiven Bakterien hemmt (Blount et al. 2007). In einigen Bakterien wurde gezeigt, dass der FMN-Riboswitch auch auf Roseoflavin bzw. RoFMN reagiert und das Wachstum hemmt (Lee et al. 2009; Ott et al. 2009; Mansjo & Johansson 2011; Pedrolli et al. 2012). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass auch FMN-Riboswitches zu den Zielmolekülen von Roseoflavin zählen.

### 2.3 Ziel der Arbeit

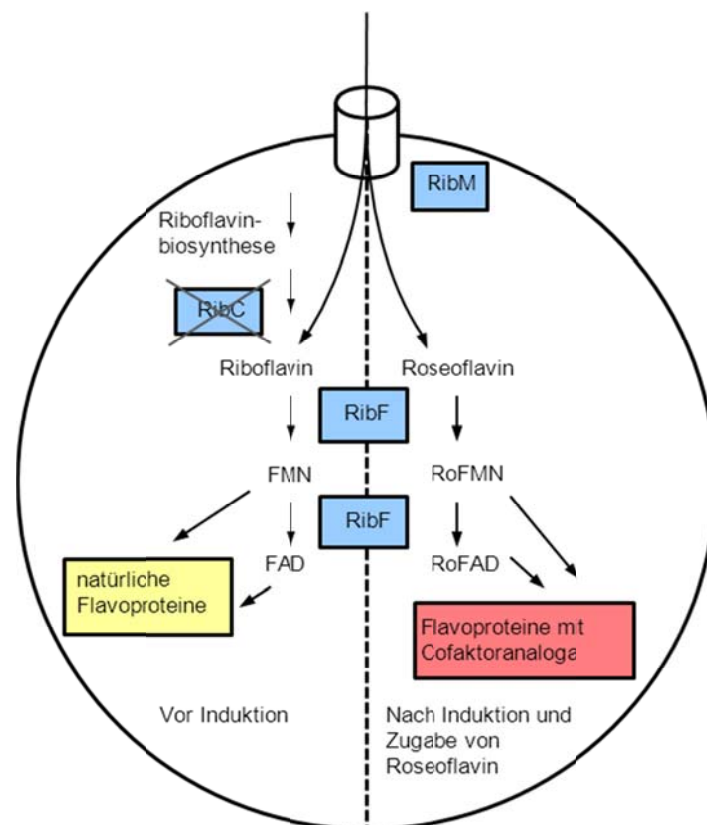
Das Riboflavinanalogon Roseoflavin ist seit 1974 bekannt (Otani et al. 1974). Die Biosynthese sowie der Resistenz- und Wirkungsmechanismus sind jedoch noch nicht vollständig untersucht. Ziel dieser Arbeit ist es, die Zielmoleküle für Roseoflavin im Modellorganismus *E. coli* zu identifizieren. Roseoflavin wird von vielen Bakterien über Riboflavintransporter in die Zelle importiert und dort von Flavokinasen/FAD-Synthetasen zu RoFMN und RoFAD umgesetzt (Grill et al. 2008). Als ein Zielmolekül für Roseoflavin wurden bereits FMN-Riboswitches identifiziert. In *B. subtilis*, *S. coelicolor* und *L. monocytogenes* bindet RoFMN an einen FMN-Riboswitch und reduziert dadurch die Expression der Riboflavinbiosynthese bzw. des Riboflavintransports (Lee et al. 2009; Ott et al. 2009; Mansjo & Johansson 2011; Pedrolli

et al. 2012). In *S. coelicolor* führt die reduzierte Expression des Riboflavingenclusters *ribBMAH* zu einem reduzierten Level der Riboflavinsynthese (RibB) und infolgedessen zu riboflavinauxotrophen Zellen.

*L. monocytogenes* ist riboflavinauxotroph und auf die Aufnahme von Riboflavin über den Transporter Imo1945 angewiesen, der durch einen Riboswitch kontrolliert wird. Die Zugabe von Roseoflavin führt zu einer Reduktion der Imo1945-Expression und infolgedessen zu riboflavinauxotrophen Zellen (Mansjo & Johansson 2011). In derselben Arbeit wurde ein rekombinanter *L. monocytogenes* Stamm beschrieben, der eine Mutation im Aptamerbereich des FMN-Riboswitches trägt. Diese bewirkt, dass RoFMN nicht mehr binden kann und somit die Expression von *imo1945* nicht beeinflusst. Die Roseoflavinsensitivität konnte so reduziert, aber nicht vollkommen behoben werden (Mansjo & Johansson 2011). Dies führt zu der Annahme, dass es weitere Zielmoleküle für Roseoflavin in *L. monocytogenes* und vermutlich auch in anderen Organismen gibt. Einige Arbeiten berichten von Flavoenzymen, die *in vitro* mit den analogen Cofaktoren RoFMN und RoFAD beladen wurden und danach inaktiv waren (Grill et al. 2008). In der Arbeit von Mathes et al. wurden Slr1694, ein BLUF-Protein (blue-light sensors using FAD) und die FMN-abhängige LOV1-Domäne des Phototropins aus *Chlamydomonas reinhardtii* (LOV: light oxygen voltage) *in vivo* mit Cofaktoranaloga beladen (Mathes et al. 2009). Etwa 0,1-3 % der bakteriellen Proteine sind Flavoproteine und damit potentielle Zielmoleküle für die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD. In dieser Arbeit sollten Flavoenzyme aus *E. coli* rekombinant hergestellt und *in vivo* mit Cofaktor beladen werden, um zu zeigen, dass es sich bei Flavoproteinen um Zielmoleküle für Roseoflavin handelt. Dazu wurden die rekombinante, roseoflavinsensitive Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD verwendet. Dabei handelt es sich um Weiterentwicklungen des Stammes *E. coli* CmpX131, der den Riboflavintransporter PnuX aus *C. glutamicum* exprimiert und durch die Deletion der Riboflavinsynthese riboflavinauxotroph ist, wodurch dieser auf das im Medium angebotene Flavin angewiesen ist (Mathes et al. 2009). *E. coli* CpXFMN trägt eine zusätzliche Kopie der Flavokinase FMN1 aus *Schizosacharomyces pombe* und wurde zur Expression FMN-abhängiger Flavoproteine verwendet. *E. coli* CpXFAD trägt eine zusätzliche Kopie der Flavokinase/FAD-Synthetase RibF aus *E. coli* und wurde zur Expression FAD-abhängiger Flavoproteine verwendet (Mathes et al. unveröffentlicht). Die Plasmide zur Expression von 38 Flavoproteine aus *E. coli* stammen von der ASKA-Library in Japan, die Plasmide mit allen ORFs (open reading frame) aus *E. coli*

anbietet (Kitagawa et al. 2005). Damit lassen sich Proteine mit N-terminalem His<sub>6</sub>-tag produzieren. Die Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN bzw. CpXFAD wurden mit den Plasmiden für diese 38 Flavoproteine transformiert. Anschließend wurden die Proteine in Gegenwart von Riboflavin bzw. Roseoflavin produziert. Die Reinigung der Proteine erfolgte über Affinitätschromatographie und die Analyse der Cofaktoren mittels HPLC.

Darüber hinaus besitzt *E. coli* einen FMN-Riboswitch, der die Expression der 3,4-Dihydroxybutanon-synthase (*ribB*), ein Enzym der Riboflavinbiosynthese, kontrolliert. Dieses zweite Zielmolekül wurde im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls auf seine Reaktion gegenüber Roseoflavin bzw. dem Cofaktoranaloga RoFMN untersucht.



**Abbildung 2.8:** System zur Expression und *in vivo*-Beladung von Flavoproteinen mit Cofaktoranaloga mit *E. coli* CpXFMN und CpXFAD.

*E. coli* CpXFMN und CpXFAD sind durch den Transporter RibM (PnuX) in der Lage, Roseoflavin in die Zelle zu transportieren. Aufgrund der Deletion des Riboflavinsynthasegens *ribC* sind die Stämme riboflavinauxotroph. Durch die Kultivierung der Zellen mit Riboflavin bzw. Roseoflavin werden Flavoproteine mit entsprechenden Cofaktoren gebildet.

## 3 Material

### 3.1 Laborgeräte, Chromatographie-Säulen und Verbrauchsmaterial

#### 3.1.1 Laborgeräte

**Tabelle 3.1: Verwendete Laborgeräte.**

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav® Dampfsterilisator 75 S	H+P Labortechnik, Habermos
Massenspektrometer	Autoflex III Mass Spectrometer	Bruker Daltonics Inc., Billerica, USA
Brutschrank	Modell 600	Memmert GmbH und Co. KG, Büchenbach
Fotodokumentations-system	Molecular Imager® GelDoc™ XR, Quantity One 1D-Analysis Software	Bio-Rad, Münschen
FPLC-System	ÄKTApurifier (P-900, UPC-900)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Heizbad	IKA® HBR4 digital	IKA GmbH, Staufen im Breisgau
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Horizontale Gelelektrophorese	Mini-Sub Cell GT, Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad, München
Inkubationsschüttler	Certomat® IS	Sartorius Stedim GmbH, Göttingen
LC/MS-System	1260/1290 Infinity DAD, FLD/6130 Quadrupole LC/MS AP-ESI	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Lichtmikroskop	BH-2	Olympus Europe, Hamburg
Thermocycler	C1000™ Thermal Cycler, dual 48/48	Bio-Rad, Münschen
Reinstwassererzeugung	Milli-Q® Gradient	Millipore GmbH, Schwalbach
Spannungsquellen	Power Pac 200, Power Pac 300	Bio-Rad, Münschen
Spektralphotometer	NanoVue	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Spektralphotometer	Ultrospec™ 3100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektralphotometer	DU® 640 Spectrophotometer mit High Performance Temperatur	Beckmann Coulter, Krefeld

Sicherheitswerkbank	Controller Variolab Mobilien W 90	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG Wangen
Ultrazentrifuge	Avanti® J-30 I Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
Vertikale Gelelektrophorese Zentrifugen	Mini-Protean® Tetra System Eppendorf 5415 R Heraeus Fresco 21 Heraeus Multifuge® 3 S-R	Bio-Rad, Münschen Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau
Zellaufschlussysteme	French Press Schwingmühle	Constant Systems Limited, Northants, UK Retsch, Haan

### 3.1.2 Chromatographie-Säulen und Säulenmaterial

**Tabelle 3.2: Säulen und Säulenmaterial.**

Trennprinzip	Säulenmaterial
Metallchelate- Affinität	HisTrap™ HP, 5mL #17-5248-01 (GE-Healthcare, Little Chalfont, UK) HisPur™ Ni-NTA Resin #88222 (Thermo Scientific)
Größenausschluss (SEC)	HiTrap™ Desalting, #17-1069-01 (GEHealthcare, Little Chalfont, UK)
Reverse Phase	REPROSIL-PUR C18-AQ, 5 µm, 250 x 4/ 250 x 2 mm (Dr. Maisch HPLC-GmbH, Ammerbuch-Entringen) Poroshell 120 EC-C18, 2,7 µm, 3 x 50mm (Agilent, Santa Clara, USA)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial wurde, wenn nicht anders erwähnt, von folgenden Herstellern bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- VWR International GmbH, Darmstadt
- Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
- Techlab GmbH, Braunschweig
- Chromatographie Handel Müller, Fridolfing

- Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
- GE-Healthcare, Little Chalfont, UK
- Merck KGaA, Darmstadt

## 3.2 Chemikalien, Enzyme, Komplettsysteme, Marker und Ladepuffer

### 3.2.1 Chemikalien

Chemikalien und Nährmedienbestandteile wurden, wenn nicht anders angegeben, von folgenden Herstellern bezogen:

- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
- VWR International GmbH, Darmstadt
- Merck KGaA, Darmstadt
- Applichem GmbH, Darmstadt
- Becton Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, USA

Weitere Chemikalien wurden wie in Tabelle 3.3 angegeben bezogen.

**Tabelle 3.3: Bezugsquelle spezieller Chemikalien.**

Chemikalie	Bezugsquelle
Roseoflavin	Chemos GmbH, Regenstauf
Roseoflavin-5'-mononukleotid	enzymatisch hergestellt (Pedrolli et al. 2011)
Roseoflavinadenindinukleotid	enzymatisch hergestellt (Pedrolli et al. 2011)

### 3.2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen.

Weitere Enzyme und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 3.4 angegeben.



**Tabelle 3.4: Verwendete Enzyme.**

Enzym	Bestellnummer	Hersteller
T4 DNA-Ligase	EL0011	Fermentas, St. Leon-Roth
FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase	EF0651	Fermentas, St. Leon-Roth
Proteinase K	A3830	Applichem, Darmstadt
Phusion® Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase	F-549S	Thermo Scientific, Schwerte

### 3.2.3 Komplettsysteme, Größenmarker und Ladepuffer

**Tabelle 3.5: Verwendete Komplettsysteme (Kit-Systeme).**

Kit-System	Bestellnummer	Hersteller
GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit	K0502	Fermentas, St. Leon-Roth
GeneJet™ PCR Purification Kit	K0701	Fermentas, St. Leon-Roth
Genomic DNA Purification Kit	K0512	Fermentas, St. Leon-Roth
His-Tag AP Western Reagents	70972-3	Novagen, Merck Millipore, Darmstadt

**Tabelle 3.6: DNA-Marker, Protein-Marker und Ladepuffer.**

Marker/Puffer	Bestellnummer	Hersteller
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	SM1811	Fermentas, St. Leon-Roth
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	SM1351	Fermentas, St. Leon-Roth
6x DNA Loading Dye	R0611	Fermentas, St. Leon-Roth

### 3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### 3.3.1 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden folgende Bakterienstämme verwendet:

**Tabelle 3.7: Verwendete Bakterienstämme.**

Stamm	Eigenschaften	Herkunft
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3)	Novagen, Merck Millipore, Darmstadt
<i>E. coli</i> CmpX13	<i>E. coli</i> BL21 DE3 <i>manX::pnuX</i>	Mathes et al. 2009
<i>E. coli</i> CmpX13 Δ <i>sroG</i>	<i>E. coli</i> CmpX13 Riboswitch <i>sroG</i> vor <i>ribB</i> deletiert	Hashimoto (unveröffentlicht)
<i>E. coli</i> CpXFAD	<i>E. coli</i> CmpX13, <i>ribC</i> <sup>-</sup> , zusätzliche Kopie von <i>ribF</i> (Flavokinase/FAD-Synthetase)	Tilo Mathes (unveröffentlicht)
<i>E. coli</i> CpXFMN	<i>E. coli</i> CmpX13, <i>ribC</i> <sup>-</sup> , zusätzliche Kopie von <i>FMN1</i> aus <i>S. pombe</i>	Tilo Mathes (unveröffentlicht)
<i>E. coli</i> Top10	F <sup>-</sup> <i>mcrA</i> Δ( <i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> ) φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>B. subtilis</i> Marburg 168	<i>trpC2</i>	Universität Marburg

#### 3.3.2 Plasmide

In dieser Arbeit wurden die, in Tabelle 3.8 genannten Plasmide verwendet. Die Klonierungstechniken, die zur Erzeugung der Plasmide benutzt wurden, sind in Kapitel 4 beschrieben. Vektorkarten und Sequenzen befinden sich im Anhang dieser Arbeit. Das Plasmid pCA24N stammt aus der ASKA-Library in Japan, die Plasmide mit allen ORFs (open reading frames) aus *E. coli* K-12 anbietet (Kitagawa et al. 2005). Für diese Arbeit wurden 38 Plasmide der ASKA-Library verwendet. Eine ausführliche Liste befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

**Tabelle 3.8: Verwendete Plasmide.**

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pCA24N	Expressionsvektor, CmR, IPTG-induzierbar, LacI, T5-Promotor	Kitagawa et al. (2005)
pET24a(+)	Expressionsvektor, KanR, IPTG-induzierbar, LacI, T7-Promotor	Merck KgaA, Darmstadt

pET24a(+)-azoRCHis	pET24a(+) mit <i>azoR</i> aus <i>E. coli</i> über <i>NdeI/XhoI</i> , His-tag C-terminal	diese Arbeit
pET28a(+)	Expressionsvektor, KanR, IPTG-induzierbar, LacI, T7-Promotor	Merck KgaA, Darmstadt
pET28a(+)-ribF	pET28a(+) <i>ribF</i> aus <i>E. coli</i> über <i>NdeI/XhoI</i> , His-tag N-terminal	diese Arbeit
pBH62	pET24a(+) mit <i>ribM</i> aus <i>S. davawensis</i> codonoptimiert für <i>B. subtilis</i>	Birgit Hobl
pT7luc <sup>mod</sup>	AmpR, LacI, T7-Promotor, Firefly Luciferase <i>luc</i> ; generiert aus pT7luc aber Startcodon von <i>luc</i> von ATG -> GCA und RBS von <i>luc</i> entfernt	Pedrolli et al. (2011)
pT7luc <sup>mod</sup> -sroG	pT7luc <sup>mod</sup> mit <i>sroG</i> aus <i>E. coli</i> über <i>HindIII/BamHI</i>	diese Arbeit

### 3.3.3 Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

**Tabelle 3.9: Verwendete Oligonukleotide.**

Die mit Hilfe der Oligonukleotide eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

Primername	5' -> 3'	Verwendung
ribB fw	TTCACGGCTTACAAGGTC	Kontroll-PCR von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
ribB rv	CAATGGTCACGGTAAAAC	Kontroll-PCR von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
sroG fw	AACTCAGTTGAAAGCCCG	Kontroll-PCR von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
sroG rv	TCAGGGCAGTCTTAGGAG	Kontroll-PCR von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
ribBseq fw	AGCTGCGCTTGTAGGGTTTG	Sequenzierung von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
ribBseq rv	GCACAGGCAAACAATACCGC	Sequenzierung von CmpX13 und CmpX13 $\Delta$ sroG
ribF fw	TTTGGACATATGAAGCTGATACGCGG	Klonierung von <i>ribF</i> in pET28a(+) über <i>NdeI/XhoI</i>
ribF rv neu	ATCTCGAGTTAAGCCGTTTTGTTAGCC	Klonierung von <i>ribF</i> in pET28a(+) über <i>NdeI/XhoI</i>
azoR fw	CAGAGCATATGAGCAAGGTATTAGTTCTTA	Klonierung von <i>azoR</i> in pET24a(+) über <i>NdeI/XhoI</i>
azoRrv	ATATCTCGAGTTATGCAGAAACAATGCT	Klonierung von <i>azoR</i> in pET24a(+) ohne His-tag über <i>NdeI/XhoI</i>
azoRrvHIS	ATATCTCGAGTGCAGAAACAATGCTG	Klonierung von <i>azoR</i> in pET24a(+) mit C-terminalem His-tag über <i>NdeI/XhoI</i>
ASKA-fw	GAGGAGAAATTA ACTATGAG	Sequenzierung von pCA24N-Plasmiden

ASKA-rv	CTAATTCAACAAGAATTGGGAC	Sequenzierung von pCA24N-Plasmiden
sroG-BamHI-rv	GCTCGGATCCAAAGTAGCGTCTGATTCAT	Klonierung von <i>sroG</i> in pT7luc <sup>mod</sup> über <i>HindIII/BamHI</i>
sroG-HindIII-fw neu	GCTCAAGCTTGCTTATTCTCAGGGCG	Klonierung von <i>sroG</i> in pT7luc <sup>mod</sup> über <i>HindIII/BamHI</i>
T7luc seq	GAGTCAGTGAGCGAGGAA	Sequenzierung von pT7luc <sup>mod</sup>

### 3.4 Programme und Datenbanken

In dieser Arbeit wurden folgende Programme und Datenbanken verwendet:

**Tabelle 3.10: Verwendete Programme und Datenbanken.**

Programm/Datenbank	Anwendung	Referenz
BRENDA	Enzymrecherche	<a href="http://www.brenda-enzymes.org/">http://www.brenda-enzymes.org/</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
Genobase/ASKA library	<i>E. coli</i> -K12 Informationen	<a href="http://ecoli.naist.jp/GB8-dev/index.jsp">http://ecoli.naist.jp/GB8-dev/index.jsp</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
ecocyc	Enzym-/Genrecherche	<a href="http://ecocyc.org/">http://ecocyc.org/</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
Endnote X5	Literaturverwaltung	<a href="http://endnote.com/">http://endnote.com/</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
SigmaPlot 9.0	Enzymkinetik	<a href="http://www.sigmaplot.com/">http://www.sigmaplot.com/</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
CLC Workbench	DNA-Sequenzanalyse	<a href="http://www.clcbio.com/index.php?id=92">http://www.clcbio.com/index.php?id=92</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
Gimp2	Bildbearbeitung	<a href="http://www.gimp.org/">http://www.gimp.org/</a> (letzter Zugriff: Aug. 2012)
KineFold	Vorhersage von RNA-Faltungen	<a href="http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl">http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl</a> (letzter Zugriff: Apr. 2013)

## 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

In dieser Arbeit wurden die in Tabelle 4.1 und Tabelle 4.2 beschriebenen Nährmedien und Antibiotika zur Kultivierung von Mikroorganismen und die Herstellung kompetenter Zellen verwendet.

**Tabelle 4.1: Verwendete Nährmedien.**

Name	Quelle	Zusammensetzung
LB (Lysogeny broth)	(Bertani 1951)	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl; pH 7,0 autoklavieren
SOC	(Hanahan 1983)	2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 8,6 mM NaCl und 2,5 mM KCl in H <sub>2</sub> O dest. lösen, auf 1 L auffüllen und autoklavieren. Sterile Zugabe von 20 mM Mg <sup>2+</sup> -Lösung, 20 mM Glucose und bei Bedarf 50 µM Riboflavin zugeben
	Mg <sup>2+</sup> -Lösung für SOC	1 M MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O, 1 M MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O dest. sterilfiltrieren

**Tabelle 4.2: Verwendete Antibiotika.**

Die Stammlösungen der Antibiotika wurden sterilfiltriert (Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von 0,22 µm) und bei -20 °C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Verwendete Konzentration
Ampicillin	50 mg/mL in Wasser	50-100 mg/L
Chloramphenicol	30 mg/mL in Ethanol	30 mg/L
Kanamycin	50 mg/mL in Wasser	50 mg/L

#### 4.1.1 Kultivierung und Dauerkulturen von Mikroorganismen

*Escherichia coli* und *Bacillus subtilis* wurden für Routineanwendungen aerob in LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Zur Proteinexpression wurde *E. coli* bei 30 °C inkubiert. Wenn notwendig wurden dem Medium die Antibiotika Ampicillin (50-100 mg/L), Chloramphenicol (30 mg/L) oder Kanamycin (50 mg/L) zugegeben. Für die Kultivierung auf festen Nährböden wurden dem Medium 15 g/L Agar-Agar zugegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C. Für die

dauerhafte Lagerung der Bakterienstämme wurden 670  $\mu\text{L}$  Übernachtskultur mit 330  $\mu\text{L}$  60 %-Glycerinlösung gemischt und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **4.1.2 Herstellung chemisch kompetenter Zellen**

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurden wie folgt hergestellt: 50 mL LB-Medium wurden in einem Schikanekolben mit einer frischen Übernachtskultur angeimpft ( $\text{OD}_{600} = 0,03$ ) und bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 220 rpm bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3 kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin mittels Zentrifugation vom Kulturmedium abgetrennt (4000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min) und in 20 mL eiskalter 0,1 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung vorsichtig resuspendiert. Nach 20 min auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (3000 rpm,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 10 min) und das Zellpellet anschließend in 2 mL eiskalter  $\text{CaCl}_2/10\text{ }\%$ -Glycerin-Lösung resuspendiert. Die Zellen wurden 12 h bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und danach in Aliquots bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert (Cohen et al. 1972; Sambrook & Russell 2001).

### **4.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.1 Isolierung genomischer DNA**

Für die Isolierung genomischer DNA aus *E. coli* wurde das GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit von Fermentas (St. Leon-Roth) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Zur Vermeidung von Endonukleaseaktivität wurden beim Lyseschritt 0,1 mg/mL Proteinase K zugegeben.

#### **4.2.2 Polymerasekettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) diene dazu, kurze DNA-Fragmente beispielsweise für Klonierungsarbeiten *in vitro* zu amplifizieren. Ein typischer Ansatz sowie das Temperaturprogramm sind in Tabelle 4.3 und Tabelle 4.4 dargestellt.

**Tabelle 4.3: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Phusion Hot Start II High Fidelity Polymerase**

Komponente	Endkonzentration	Volumen (50µL)
H <sub>2</sub> O dest.		auffüllen auf 50µL
5 x Puffer	1 x	10 µL
10 mM dNTPs	200 µM	1 µL
10 µM Primer "forward"	0,5 µM	2,5 µL
10 µM Primer "reverse"	0,5 µM	2,5 µL
Matrizen-DNA	50-250 ng	
2 U/µL Polymerase	0,02 U/µL	0,5 µL

**Tabelle 4.4: Temperaturprogramm für einen PCR-Ansatz**

Zyklusschritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Anlagerung	T <sub>m</sub> + 3 °C	30 s	30
Elongation	72 °C	30 s/1 kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
	4 °C	∞	

### 4.2.3 DNA-Gelelektrophorese

Die Analyse von PCR-Produkten und Restriktionsverdauen erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Die Gele bestanden aus 1 % Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 20 mM Eisessig, pH 8,5) (Sambrook & Russell 2001). Die Auftrennung der DNA erfolgte 1 h im elektrischen Feld bei 80 V. Anschließend wurden die Gele 15 min im Ethidiumbromidbad gefärbt und danach 15 min in H<sub>2</sub>O dest. entfärbt. Die Detektion der DNA erfolgte mittels UV-Licht.

### 4.2.4 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden spezifische Nukleotidsequenzen und wurden eingesetzt, um PCR-Produkte und Plasmide für die Ligation vorzubereiten und um neu konstruierte Plasmide zu charakterisieren. In dieser Arbeit wurden FastDigest Enzyme von Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet. Ein typischer Restriktionsansatz ist in Tabelle 4.5

gezeigt. Bezüglich Temperatur, Inkubationsdauer und Inaktivierung wurden die Angaben des Herstellers beachtet.

**Tabelle 4.5: Zusammensetzung eines Restriktionsverdau.**

	Volumen		
	Plasmid DNA	PCR Produkt	Genomische DNA
H <sub>2</sub> O dest.	auffüllen auf 20 µL	auffüllen auf 30 µL	auffüllen auf 50 µL
10x Puffer	2 µL	2 µL	5 µL
DNA	1 µg	0,2 µg	5 µg
Enzym	1 µL	1 µL	5 µL

#### 4.2.5 Reinigung von DNA aus enzymatischen Reaktionen

Zur Aufreinigung von DNA nach enzymatischen Reaktionen wie PCR, Restriktionsverdauen etc. wurde das GeneJET™ PCR Purification Kit von Fermentas (St. Leon-Roth) entsprechend den Angaben des Herstellers verwendet. Sollte ein DNA-Fragment aus einer Mischung von anderen getrennt werden, wurde die Probe im 1 %-igen Agarosegel aufgetrennt, das entsprechende DNA-Fragment aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GeneJET™ Gel Extraction Kit von Fermentas (St. Leon-Roth) gereinigt.

#### 4.2.6 Ligation

Das Enzym Ligase katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylenden in doppelsträngiger DNA oder RNA. Damit können PCR-Produkte und Plasmide, die mit demselben Restriktionsenzym geschnitten wurden, miteinander verbunden werden. In dieser Arbeit wurde die T4 DNA Ligase der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) eingesetzt. Ein Ligationsansatz setzt sich wie in Tabelle 4.6 beschrieben zusammen und wurde 1 h bei Raumtemperatur oder 16 h bei 4 °C inkubiert. Um die Effizienz der Ligation zu erhöhen, wurden geschnittene Plasmide mit FastAP (Thermosensitive Alkaline Phosphatase) behandelt. Durch Zugabe von 1U FastAP zum Verdau und weitere Inkubation (10 min) wurden die 5'- und 3'-Phosphatgruppen entfernt und so die Religation verhindert (Ullrich et al. 1977).



**Tabelle 4.6: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.**

Komponente	Volumen
linearisierter Vektor	20 - 100 ng
Insert-DNA	1-5 x molare Konzentration <sub>vektor</sub>
10x T4 DNA Ligase Puffer	2 $\mu$ L
T4 DNA Ligase	1 U
H <sub>2</sub> O dest.	auffüllen auf 20 $\mu$ L

#### 4.2.7 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte mit chemisch kompetenten Zellen (Kapitel 4.1.2). Für einen Ansatz wurden 50  $\mu$ L kompetente Zellen langsam auf Eis aufgetaut und mit 25 ng Ligationsansatz bzw. Plasmid gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen 30 s in ein Wasserbad mit 42 °C gegeben. Sofort wurden die Zellen wieder auf Eis gestellt und mit 250  $\mu$ L SOC-Medium versetzt. Nach 45 min Inkubation bei 37 °C und 250 rpm im Schüttelinkubator wurden 50  $\mu$ L des Ansatzes auf LB-Platten mit entsprechenden Selektionszusätzen ausplattiert. Die Koloniebildung konnte nach 12 bis 24 h bei 37 °C beobachtet werden.

#### 4.2.8 Plasmid-Minipräparation

Zur Analyse von Plasmiden wurden diese aus Übernachtskulturen isoliert. Dazu wurde das GeneJET Plasmid Miniprep Kit der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) verwendet und wie vom Hersteller empfohlen benutzt. Zusätzlich wurde nach Zugabe des Lysepuffers 0,1 mg/mL Proteinase K zugegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Endnukleaseaktivität zu reduzieren. Isolierte Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsverdau charakterisiert und als Ausgangs-DNA für Sequenzierungen bei MWG Eurofins verwendet.

(<http://www.eurofinsdna.com/de/home.html>; letzter Zugriff: Aug. 2012)

## 4.3 Biochemische Methoden

### 4.3.1 Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Für die Überproduktion von Proteinen wurden IPTG-induzierbare Plasmide verwendet. Die Proteine wurden in rekombinanter Form mit einem zusätzlichen His<sub>6</sub>-Tag produziert, um sie später mittels Affinitätschromatographie reinigen zu können. *E. coli* CpX-Stämme mit pCA24N, pET24a(+) oder pET28a(+) Plasmid wurden bei 30 °C und 220 rpm in LB Medium kultiviert. Die Enzymproduktion wurde bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,6 durch Zugabe von 0,1 mM (pCA24N) bzw. 1 mM (pET24a(+)/pET28a(+)) IPTG gestartet. Handelte es sich bei dem zu synthetisierenden Protein um ein Flavoprotein, wurde gleichzeitig 50 µM Riboflavin bzw. Roseoflavin zugegeben, um die Proteine *in vivo* mit Flavincofaktoren zu beladen. Das Kulturvolumen betrug dabei 200 mL bei Riboflavinzugabe und 400 mL bei Roseoflavinzugabe. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000 rpm, 4 °C, 20 min) geerntet. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C eingefroren

### 4.3.2 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie (Gravity Flow)

**Tabelle 4.7: Lösungen für die Affinitätschromatographie.**

Name	Zusammensetzung
PBS (phosphate buffered saline)	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl; pH 7,4
Bindepuffer	PBS mit 10 mM Imidazol; pH 7,4
Waschpuffer	PBS mit 25 mM Imidazol; pH 7,4
Elutionspuffer	PBS mit 250 mM Imidazol; pH 7,4

Zur Reinigung der mit Flavincofaktoren beladenen Flavoproteine wurden Gravity Flow Säulen und HisPur Ni-NTA Resin der Firma Fisher Scientific verwendet (1 mL Bettvolumen). Das Zellpellet wurde in Bindepuffer resuspendiert und mittels French Press bei 2000 bar aufgeschlossen. Um Zelltrümmer abzutrennen, wurde der zellfreie Extrakt 10 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Rohextrakt in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (30 000 rpm, 4 °C, 30 min) und der Überstand auf die Ni-NTA Säule gegeben.

Um unspezifisch bindende Proteine abzutrennen, wurde die Säule dreimal mit 2 mL Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend dreimal mit 1 mL Elutionspuffer eluiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen erfolgte mit dem Verfahren nach Bradford, die apparente Homogenität wurde mittels SDS-PAGE und Western-Blot gezeigt.

### 4.3.3 Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie (Äkta-System)

**Tabelle 4.8: Lösungen für die Affinitätschromatographie.**

Name	Zusammensetzung
PBS (phosphate buffered saline)	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, 10 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O, 300 mM NaCl; pH 7,4
Puffer A	PBS mit 10 mM Imidazol; pH 7,4
Puffer B	PBS mit 500 mM Imidazol; pH 7,4

Die Proteine RibF (bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase aus *E. coli*) und Azor (Azobenzolreduktase aus *E. coli*) wurden mittels Affinitätschromatographie und einer ÄKTA-Anlage gereinigt. Zur Reinigung wurde eine HisTrap<sup>TM</sup> HP Säule mit 5 mL Bettvolumen (GE-Healthcare) verwendet. Das Zellpellet wurde in Puffer A resuspendiert und bei 2000 bar in der French Press aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (8000 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Ultrazentrifugation (30 000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Proteinrohextrakt mit einer Flussrate von 5 mL/min auf die Säule aufgegeben und chromatographiert. Nachdem das UV-Signal die Basislinie wieder erreicht hatte, wurde Puffer B schrittweise bis auf 50 % erhöht. Proteinhaltige Fraktionen wurden gesammelt und die Proteinkonzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt. Die apparente Homogenität der gereinigten Proteine wurde mittels SDS-PAGE gezeigt.

### 4.3.4 Größenausschlusschromatographie (SEC)

Um Proteinlösungen in einen anderen Puffer zu überführen oder um freie Flavine abzutrennen, wurde die Größenausschlusschromatographie verwendet. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 10-20 mL/min auf eine HiTrap<sup>TM</sup> Desalting Säule (GE-

Healthcare) aufgegeben, die mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5) equilibriert wurde. Die proteinhaltige Fraktion wurde gesammelt und deren Konzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt. Die Enzyme AzoR und RibF waren, auf diese Weise umgepuffert, bei 4 °C bzw. -20 °C über mehrere Monate stabil.

#### 4.3.5 Aufkonzentrieren von Proteinproben

Die Proteine in einer Lösung wurden mittels Vivaspin-Säulen (Vivaspin 20, 3000 MWCO PES) der Firma Sartorius konzentriert. Durch Zentrifugation der Säulen (8000 rpm, 4 °C) passiert die wässrige Phase die Membran und die Proteine konzentrieren sich im oberen Teil. Dadurch konnten die proteingebundenen Flavine vor dem Denaturieren konzentriert werden und so die Analyse der Cofaktoren mittels HPLC erleichtert werden.

#### 4.3.6 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Tatsache, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue-G250 in saurer Lösung an Proteine bindet. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue-G250 von 470 nm nach 595 nm. Die Absorptionsmessung der Proben erfolgte nach Zugabe von 200 µL Bradford-Reagenz zu 800 µL entsprechend verdünnter Proteinprobe und 5-minütiger Inkubation. Die Werte wurden auf eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (BSA) zwischen 0 und 20 µg/mL bezogen (Tabelle 4.9).

**Tabelle 4.9: Eichgerade für Bradford-Proteinbestimmung.**

Standard	Puffer (µL)	BSA 100 µg/mL (µL)
0 µg/mL	800	-
2,5 µg/mL	780	20
5 µg/mL	760	40
7,5 µg/mL	740	60
15 µg/mL	680	120
20 µg/mL	640	160

### 4.3.7 Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE und Western-Blot

**Tabelle 4.10: Lösungen für SDS-PAGE und Western-Blot.**

Name	Zusammensetzung
TRIS-Glycin-Laufpuffer	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS; pH 8,3
SDS-Probenpuffer	126 mM TRIS/HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 4 % SDS, 0,02 % Bromphenolblau, 20 mM DTT
Towbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % Methanol

Zur Proteinanalyse mittels SDS-PAGE ("sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis") wurden Fertiggele der Firma Bio-Rad (Mini-PROTEAN® TGX™ Any kD™) verwendet. Die Proben wurden mit 2x SDS-Probenpuffer gemischt und 5 min bei 98 °C denaturiert. Für die anschließende Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G250 wurden 10 µg Protein aufgetragen und bei 100 V für 10 min und anschließend bei 130 V in Tris-Glycin-Laufpuffer getrennt (Laemmli 1970). Für den Western-Blot wurden 10 µg Protein aufgetragen und das Gel nach dem Lauf auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (0,04 Ampere, 1 h). Für den Transfer wurden nacheinander drei Lagen Filterpapier, die Membran, das Gel und zum Schluss nochmals drei Lagen Filterpapier luftblasenfrei aufeinander gesetzt. Alle Komponenten wurden zuvor in Towbin-Puffer eingeweicht (Towbin et al. 1979). Zur Detektion des His<sub>6</sub>-Tag wurde das His-Tag AP Western Reagents Kit von Novagen (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet und wie in der Anleitung beschrieben genutzt.

### 4.3.8 Proteinidentifizierung mit MALDI-TOF MS/MS

**Tabelle 4.11: Lösungen für MALDI-TOF MS/MS Analyse von Proteinen.**

Name	Zusammensetzung
DTT-Lösung	10 mM DTT in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
IAA-Lösung	55 mM Iodacetamid in 100 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>
Trypsin-Puffer	10 % Acetonitril, 10 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub> , 1 mM CaCl <sub>2</sub>
Trypsin-Lösung	13 ng/µL Trypsin in Trypsin-Puffer
Extraktionspuffer	5 % Ameisensäure, 50 % Acetonitril (v/v)
Cl-CCA-Lösung	4,5 mg/mL 4-Chlor-cyanozimtsäure in Acetonitril/Wasser/TFA 90/10/0,1 (v/v/v)

Zur Identifizierung von unbekanntem Proteinen in einem SDS-PAGE-Gel wurden die Banden mittels MALDI-TOF MS/MS analysiert. Zunächst wurden die Gelbanden gewaschen und entfärbt. Dazu wurden sie ausgeschnitten, zerkleinert und dreimal 30 min mit 100 µL 50 mM Ammoniumbicarbonat/50 % Acetonitril (v/v) inkubiert. Der Überstand wurde nach jedem Waschen entfernt. Danach erfolgte durch Zugabe von 500 µL Acetonitril die Dehydrierung des Gels. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und das Protein anschließend reduziert und alkyliert: Nach Zugabe von 30-50 µL DTT-Lösung wurden die Gelstücke 30 min bei 56 °C inkubiert. Danach wurde auf Raumtemperatur abgekühlt, 500 µL Acetonitril zugegeben und 10 min inkubiert. Der Überstand wurde vollständig abgenommen, 30-50 µL IAA-Lösung zugegeben und 20 min im Dunkeln mit gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Gelstücke wurden erneut mit 500 µL Acetonitril dehydriert, der Überstand vollständig entfernt und die Gelstücke in der Speed-Vac für 15 min bei 30 °C getrocknet. Für den Verdau wurden die Gelstücke mit 15 µL Trypsin-Lösung rehydriert und 2 h auf Eis inkubiert. Falls notwendig, wurde zusätzliche Trypsin-Lösung zugegeben, jedoch nur so viel, wie das Gel aufnehmen kann. Überschüssige Trypsin-Lösung wurde entfernt und die Gelstücke 12 bis 16 h bei 37 °C inkubiert. Um die Peptide aus dem Gel zu gewinnen, wurden 50 µL Extraktionspuffer zugegeben und 15 min bei 37 °C und 750 rpm inkubiert. Die Peptidlösung wurde in ein neues Gefäß überführt und zwei weitere Extraktionen durchgeführt. Der Extraktionspuffer wurde in der Speed-Vac bei 60 °C für 2 h entfernt. Die so konzentrierten Peptide konnten bis zur Analyse bei -20 °C gelagert werden.

Für die MS/MS-Analyse wurden jedem Ansatz 5-15 µL 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA) zugegeben, gemischt und 2 bis 5 min im Ultraschallbad inkubiert. Nach Zentrifugation bei 10 000 rpm für 15 min wurde ein Aliquot der Peptidlösung im Verhältnis 1:2 mit frisch angesetzter CI-CCA-Lösung gemischt und 1,5 µL davon auf eine Stahlprobenplatte aufgetragen (Shevchenko et al. 2006). Das Verdampfen des Lösungsmittels wurde durch einen Haartrockner beschleunigt. Die Kristalle wurden mit 2 µL 0,1 % TFA gewaschen, wobei das Lösungsmittel zum Schluss mit der Pipette entfernt wurde und die Kristalle anschließend erneut unter Verwendung eines Haartrockners getrocknet wurden. Zum Schluss wurde mit 1,5 µL Acetonitril/Wasser/0,1 % TFA (60/40/0,1 v/v/v) gewaschen und wieder getrocknet. Danach erfolgte die Analyse mittels MALDI-TOF/TOF-MS (Autoflex III Mass Spectrometer, Bruker Daltonics Inc., Billerica, USA). Die Auswertung der Messung erfolgte durch einen Sequenzabgleich mit der MASCOT-Datenbank.

#### 4.3.9 HPLC-Analyse von Flavinen

Die verschiedenen Flavine wurden mittels HPLC (Agilent 1260 Infinity Series) getrennt und quantifiziert. Für die Messung wurden die Proben mit 50 % Trichloressigsäure auf 1 % angesäuert und ausfallendes Protein durch Zentrifugation bei 14 000 rpm für 5 min abgetrennt. Die Proben wurden anschließend durch einen 0,2 µm Celluloseacetatfilter filtriert und dann in die LC/MS eingesetzt. Für die Trennung wurde eine Umkehrphasen-C18-Säule (Poroshell 120 EC-C18 3 x 50 mm 2,7µm) der Firma Agilent eingesetzt. Als Laufmittel wurde eine Mischung aus 18 % Methanol und 82 % 20 mM Ammoniumformiat, 20 mM Ameisensäure bei einem Fluss von 0,5 mL/min verwendet. Die Flavine wurde mit einem Diodenarraydetektor (DAD) bei den Wellenlängen 445 nm (RF, FMN, FAD) und 503 nm (RoF, RoFMN, RoFAD) gemessen. Zur Quantifizierung wurden Standardgeraden der Flavine zwischen 5 und 100 µM eingesetzt.

#### 4.3.10 Aktivitätsbestimmung von RibF

RibF katalysiert die Umsetzung von Riboflavin bzw. Roseoflavin zu FMN und FAD bzw. RoFMN und RoFAD. Der Enzymtest enthielt in einem Volumen von 1 mL 50 mM Kaliumphosphat (pH 7,5), 1 mM ATP, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaF, 24 mM Natriumdithionit, 5-75 µM Substrat und eine geeignete Menge Enzym. Der Reaktionsansatz wurde auf 37 °C temperiert und durch Zugabe von RibF gestartet. Proben zu verschiedenen Zeitpunkten wurden sofort durch Zugabe von 1 % TCA gestoppt und die Substratabnahme anschließend mittels HPLC vermessen. Als eine Unit wurde diejenige Enzymmenge definiert, die 1 µMol Substrat in einer Minute umsetzt. Um die Anfangsgeschwindigkeit der ersten Teilreaktion (Flavokinaseaktivität) zu messen wurde Riboflavin bzw. Roseoflavin als Substrat eingesetzt. Die zweite Teilreaktion (FAD-Synthetaseaktivität) wurde mit FMN bzw. RoFMN als Substrat untersucht.

#### 4.3.11 Aktivitätsbestimmung von AzoR

Methylrot als Substrat:

Wenn nicht anders angegeben, wurde Methylrot als Substrat im Enzymtest eingesetzt. Methylrot wird durch die enzymatische Spaltung der N=N Bindung in die farblose Produkte 2-Aminobenzoesäure und *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin umgesetzt. Der Aktivitätstest enthielt in einem Volumen von 1 mL 25 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 mM Methylrot, 0,4 mM NADH und eine geeignete Menge AzoR. Der Reaktionsansatz wurde bei 30 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe von AzoR gestartet. Die Abnahme von Methylrot wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 430 nm verfolgt. Als eine Unit wurde diejenige Enzymmenge definiert, die die Reduktion von 1  $\mu\text{Mol}$  Methylrot pro Minute katalysiert (Molarer Absorptionskoeffizient  $23\,360\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) (Nakanishi et al., 2001).

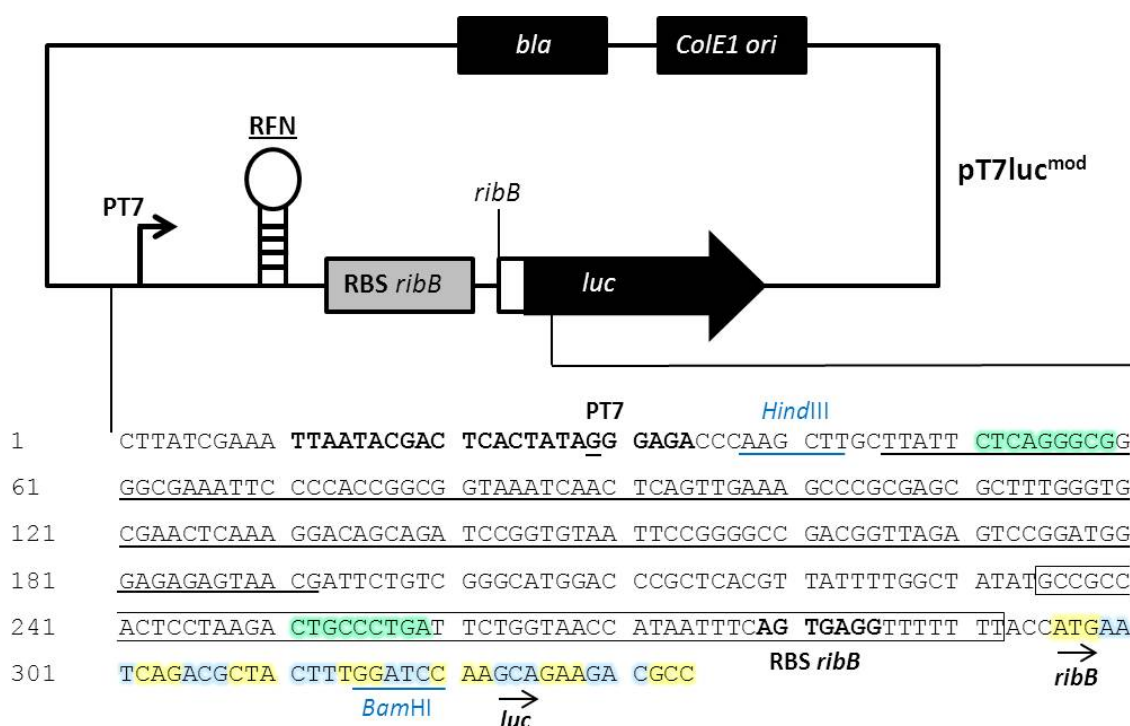
Anthrachinon-2-sulfonsäure als Substrat:

Um die pH-Abhängigkeit von AzoR zu untersuchen, wurde das Puffersystem von McIlvaine (McIlvaine 1921) verwendet. Mit 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{ H}_2\text{O}$  und 0,1 M Zitronensäure wurden Lösungen mit pH-Werten zwischen 3,5 und 8 erzeugt und im Enzymtest verwendet. Da Methylrot bei niedrigem pH-Wert ( $< 4,0$ ) ausfällt, wurde Anthrachinon-2-sulfonsäure als Substrat eingesetzt. Der Enzymtest enthielt in einem Volumen von 1 mL 50 % Puffer, 0,4 mM Anthrachinon-2-sulfat, 0,15 mM NADH und eine geeignete Menge AzoR. Der Ansatz wurde auf 30 °C temperiert und die Reaktion durch Zugabe von AzoR gestartet. Die Abnahme von Anthrachinon-2-sulfonsäure wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt. Eine Unit wurde als diejenige Enzymmenge definiert, welche die Reduktion von 1  $\mu\text{Mol}$  Anthrachinon-2-sulfonsäure pro Minute katalysiert (Molarer Absorptionskoeffizient  $6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ) (Liu et al. 2009).



#### 4.3.12 Gekoppelter *in vitro* Transkriptions/Translations-Test

Um den putativen FMN-Riboswitch *sroG* vor dem Gen *ribB* aus *E. coli* zu untersuchen wurde ein Transkriptions-/Translations-Test (TK/TL) eingesetzt (Pedrolli et al. 2012). Dazu wurde das Plasmid pT7luc<sup>mod</sup>-*sroG* verwendet. Das Plasmid für die Konstruktion einer translationalen Fusion von Riboswitch und Reporter gen besitzt einen T7 Promotor, den *E. coli* Riboswitch *sroG* mit dazugehöriger ribosomaler Bindestelle (RBS) und den ersten sechs Codons (inklusive Startcodon) des Gens *ribB* (3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase), fusioniert mit dem Firefly Luciferase-Reporter gen. In diesem Versuchssystem steht das Reporter gen unter der Kontrolle des Riboswitches. Durch Zugabe von Flavinen wird untersucht, ob der Riboswitch tatsächlich flavinabhängig die Expression des Reporter gens beeinflusst und die Luciferaseaktivität im Vergleich zur Wasserkontrolle abnimmt.



**Abbildung 4.1:** Darstellung des Reporterplasmids pT7luc<sup>mod</sup>-*sroG* für die Überprüfung des FMN Riboswitches aus *E. coli* im Transkriptions/Translations-Test. Die Sequenz des Riboswitches wurde über *HindIII* und *BamHI* in pT7luc<sup>mod</sup> kloniert. Die fett gedruckte Sequenz markiert den T7 Bakteriophagen-Promotor, dessen Transkript am unterstrichenen "G" beginnt. Die unterstrichene Sequenz bildet das FMN Riboswitch Aptamer. Die Sequenz in der Box bildet die Haarnadelstruktur, welche die Maskierung der RBS bewirkt. Die grün hinterlegten Sequenzen sind komplementär zueinander und bilden den "anti-RBS Sequestor". Die RBS ist fett gedruckt dargestellt und die translatierte Sequenz ist gelb/blau hinterlegt. Die Startpunkte für die Gene *ribB* und *luc* sind mit Pfeilen markiert.

Für den Test wurde das *E. coli* T7 S30 Extract System for Circular DNA Kit (Promega, Mannheim) verwendet. Ein Ansatz enthält T7-Lösung, einen S30-Mix und einen Aminosäuremix und wurde, wie in Tabelle 4.12 angegeben, angesetzt. Der Ansatz wurde 5 min bei 30 °C inkubiert, danach sofort auf Eis gestellt und die Reaktion durch Zugabe von 90 µL BSA-Puffer (1 mg/mL BSA, 2mM DTT, 25mM Trisphosphatpuffer, pH 7,8) gestoppt. 10 µL dieser Reaktion wurden mit 50 µL Luciferase Assay Reagent (Luciferase Assay System, Promega, Mannheim) gemischt und die Luciferaseaktivität in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Genios Pro microplate reader, Tecan, Mainz) gemessen.

**Tabelle 4.12: Zusammensetzung des *in vitro* TK/TL-Tests.**

Komponente	Kontrolle	Probe
Flavin (100 µM -1 mM)	-	1 µL
Wasser	1 µL	-
Plasmid (25-50 ng/µL)	1 µL	1 µL
Aminosäure-Mix	1 µL	1 µL
S30-Mix	4 µL	4 µL
T7-Lösung	3 µL	3 µL

#### 4.3.13 *In vivo* Riboswitch-Testsystem

Die folgende Methode wurde verwendet, um *sroG in vivo* im Hinblick auf die mögliche Regulation der Genexpression des Reportergens zu testen. Es wurde wie im vorherigen Versuch das Reporterplasmid pT7luc<sup>mod</sup>-sroG verwendet. Die Expression der Luciferase fand jedoch *in vivo* in *E. coli* CpXFAD-Zellen statt. Der Stamm wurde in 50 mL LB-Medium bei 37 °C kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 wurde die Temperatur auf 30 °C reduziert und 50 µM Riboflavin, Roseoflavin oder zur Kontrolle eine entsprechende Menge DMSO zugegeben. Nach 10 min wurde die Expression der Luciferase durch Zugabe von 1 mM IPTG gestartet. Nach weiteren 50 min wurden die Zellen bei 6000 rpm geerntet und zweimal mit kaltem 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 gewaschen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zellen bei -20 °C eingefroren. Im nächsten Schritt wurden die Zellen in 10 mL 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 resuspendiert und bei 2000 bar in der French Press aufgeschlossen. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation bei 8000 rpm für 20 min bei 4 °C abgetrennt. Die Proteinkonzentration des Proteinrohextrakts wurde mittels Bradfordtest bestimmt. 10 µL einer geeigneten Verdünnung des zellfreien Extrakts wurden mit 50 µL

Luciferase Assay Reagent (Luciferase Assay System, Promega, Mannheim) gemischt und die Luciferaseaktivität in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan Genios Pro microplate reader, Tecan, Mainz) gemessen. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration normiert und die Aktivität des DMSO-Ansatzes als 100 % definiert.

## 5 Ergebnisse

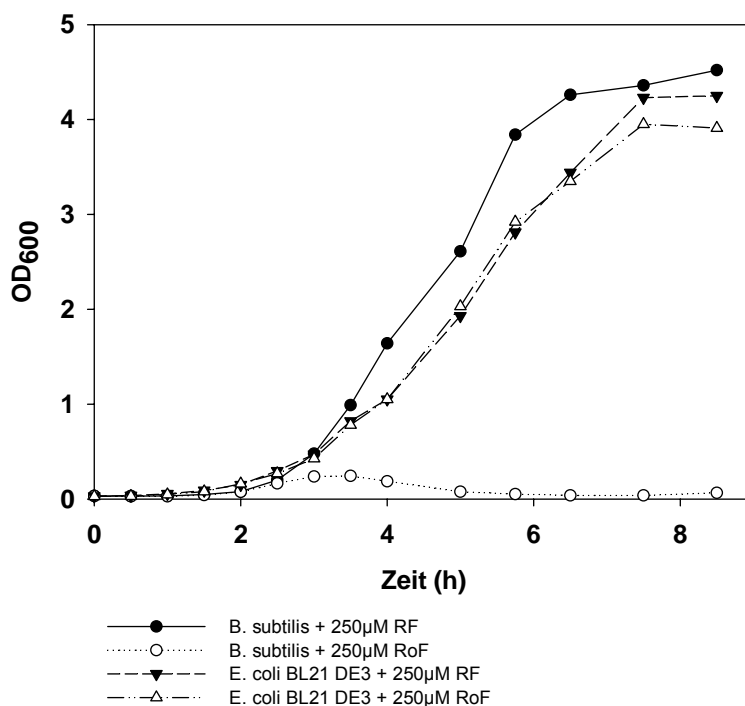
### 5.1 Validierung der Stämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD zur *in vivo* Synthese von Flavoholoenzymen

Das Riboflavinanalogon Roseoflavin aus *S. davawensis* wirkt antibiotisch auf Gram-positive Bakterien und ebenso auf Gram-negative, wenn ein Flavintransporter vorhanden ist, der in der Lage ist, das Riboflavinanalogon in das Cytoplasma zu transportieren. Einige Riboflavintransporter wie YpaA aus *B. subtilis* und PnuX aus *C. glutamicum* können auch Roseoflavin transportieren (Vogl et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Roseoflavin in einigen Bakterien von der Flavokinase/FAD-Synthetase zu den Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD umgesetzt wird. Daher stellen Flavoenzyme mögliche Zielstrukturen für Roseoflavin dar, indem sie RoFMN oder RoFAD binden und dadurch möglicherweise in ihrer Aktivität gehemmt werden (Grill et al. 2008).

In dieser Arbeit sollte anhand des Modellorganismus *E. coli* gezeigt werden, dass Flavoenzyme *in vivo* tatsächlich Cofaktoranaloga binden. Da *E. coli* keinen Flavintransporter besitzt und daher Roseoflavin nicht aufnehmen kann, wurden die Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD verwendet. Der Vorläufer beider Stämme ist *E. coli* CmpX131, der an Stelle des Gens für den Mannosetransporter ManX das Gen für den Flavintransporter PnuX (oder RibM) aus *C. glutamicum* trägt. Durch eine Deletion des Gens für die Riboflavinsynthese *ribC* ist dieser Stamm nicht mehr in der Lage, Riboflavin zu produzieren. Er ist deswegen auf die Bereitstellung von Flavinen im Nährmedium angewiesen (Mathes et al. 2009). Die Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD besitzen eine zusätzliche Kopie der Flavokinase FMN1 aus *S. pombe* bzw. der Flavokinase/FAD-Synthetase RibF aus *E. coli*, wodurch die Synthese der Cofaktoren FMN und FAD erhöht werden sollte. Durch die gezielte Zugabe von Roseoflavin in das Nährmedium können so Flavoenzyme mit Flavincofaktoranaloga hergestellt werden. Die Stämme wurden von Dr. Tilo Mathes (Humboldt-Universität Berlin) zur Verfügung gestellt.

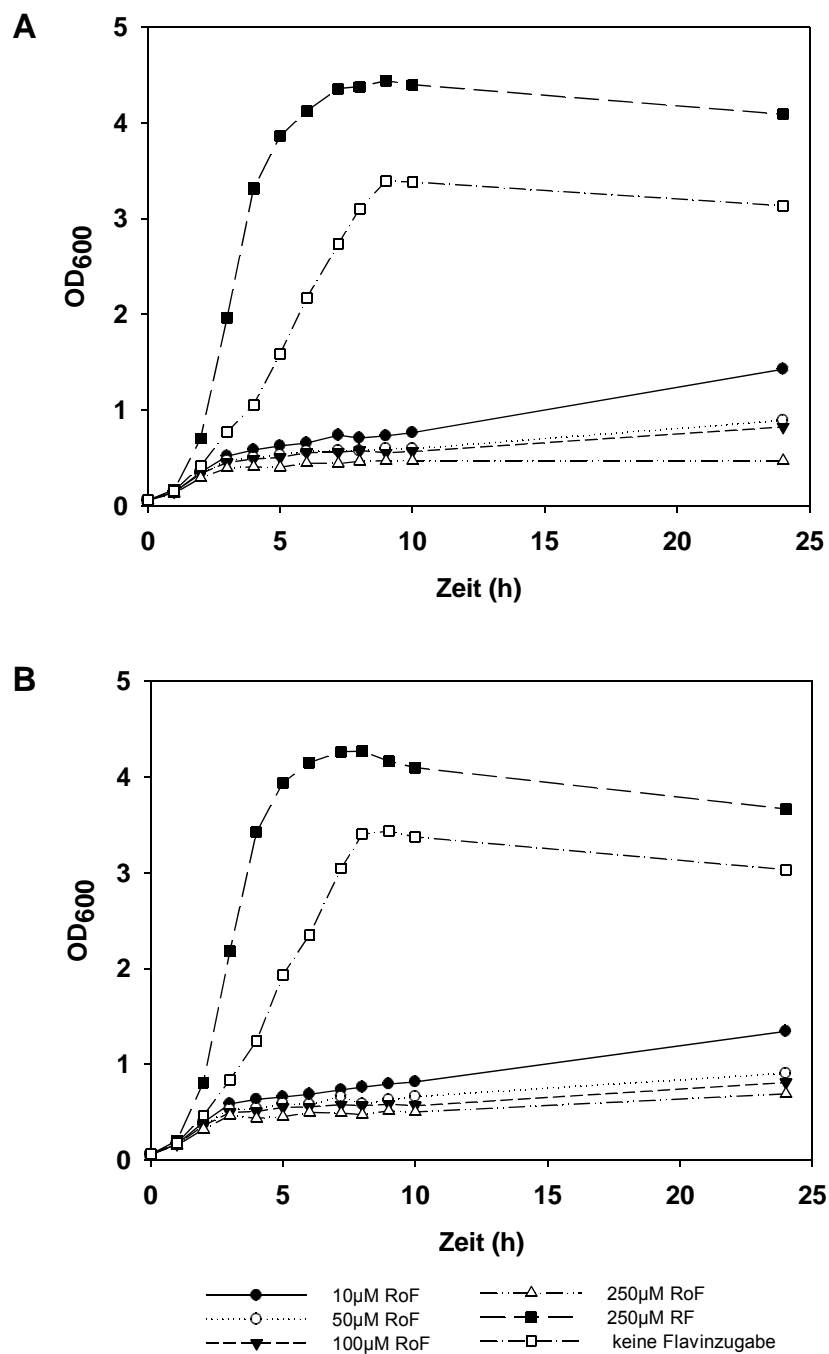
Zunächst sollte durch Wachstumsexperimente gezeigt werden, dass *E. coli* durch die genetischen Veränderungen sensitiv gegenüber Roseoflavin ist. Die Wachstumskurve zeigt, dass Roseoflavin eine starke Wirkung gegenüber *B. subtilis*, jedoch keine Wirkung auf *E. coli*

BL21 (DE3) hat (Abbildung 5.1). *E. coli* BL21 (DE3) besitzt kein Aufnahmesystem für Riboflavin, wodurch das Analogon Roseoflavin ins Cytoplasma gelangen kann. Die Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD sind im Gegensatz zum Wildtyp schon durch geringe Roseoflavinkonzentrationen (10  $\mu\text{M}$ ) im Wachstum gehemmt (Abbildung 5.2). Durch den Transporter PnuX gelangt Roseoflavin ins Cytoplasma und hemmt dort das Wachstum. Auch beim Wachstumsvergleich der Stämme auf festen Nährböden, die 250  $\mu\text{M}$  Riboflavin bzw. Roseoflavin enthalten, sind die Wachstumsunterschiede deutlich zu sehen (Abbildung 5.3). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37  $^{\circ}\text{C}$  wachsen alle Stämme auf riboflavinhaltigen Nährböden. Auf roseoflavinhaltigem Nährboden konnte nur *E. coli* BL21 (DE3) wachsen, der keinen Flavintransporter besitzt. *E. coli* CpXFMN und CpxFAD sowie *B. subtilis* nehmen durch die Transporter PnuX bzw. YpaA Roseoflavin auf und wachsen aufgrund dessen nicht.



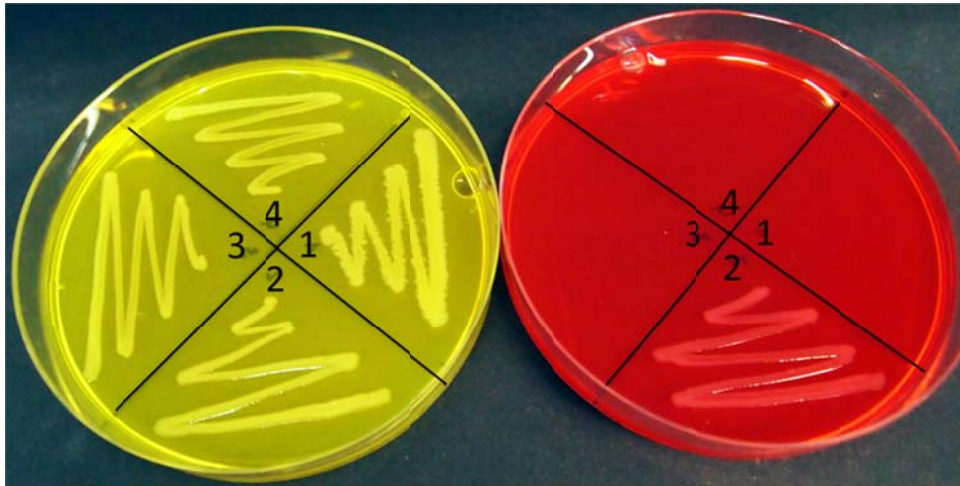
**Abbildung 5.1: Wachstumskurve von *B. subtilis* und *E. coli* BL21 (DE3).**

Wachstum von *B. subtilis* und *E. coli* BL21 DE3 in flüssigem LB-Medium mit 250  $\mu\text{M}$  Riboflavin oder Roseoflavin bei 37  $^{\circ}\text{C}$ , 220 rpm. *B. subtilis* wird durch die Zugabe von Roseoflavin im Wachstum gehemmt, der Kontrollansatz mit Riboflavin zeigt kein reduziertes Wachstum. *E. coli* BL21 (DE3) besitzt keinen Flavintransporter und wird von Roseoflavin im Wachstum nicht eingeschränkt, da es nicht in die Zelle aufgenommen werden kann.



**Abbildung 5.2: Wachstumskurve von *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD.**

Wachstum von *E. coli* CpXFMN (A) und *E. coli* CpXFAD (B) in LB-Medium mit verschiedenen Konzentrationen Roseoflavin (10, 50, 100, 250 µM), Riboflavin (250 µM) oder ohne Flavinzugabe bei 37 °C, 220 rpm. *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD werden durch Zugabe von Roseoflavin im Wachstum gehemmt. Schon geringe Konzentrationen (10 µM) führen zu deutlich reduziertem Wachstum. Die Zugabe von Riboflavin verbessert das Wachstum im Vergleich zu einer Kontrolle ohne Flavinzugabe, da die Stämme nicht in der Lage sind, Riboflavin selbst zu produzieren.



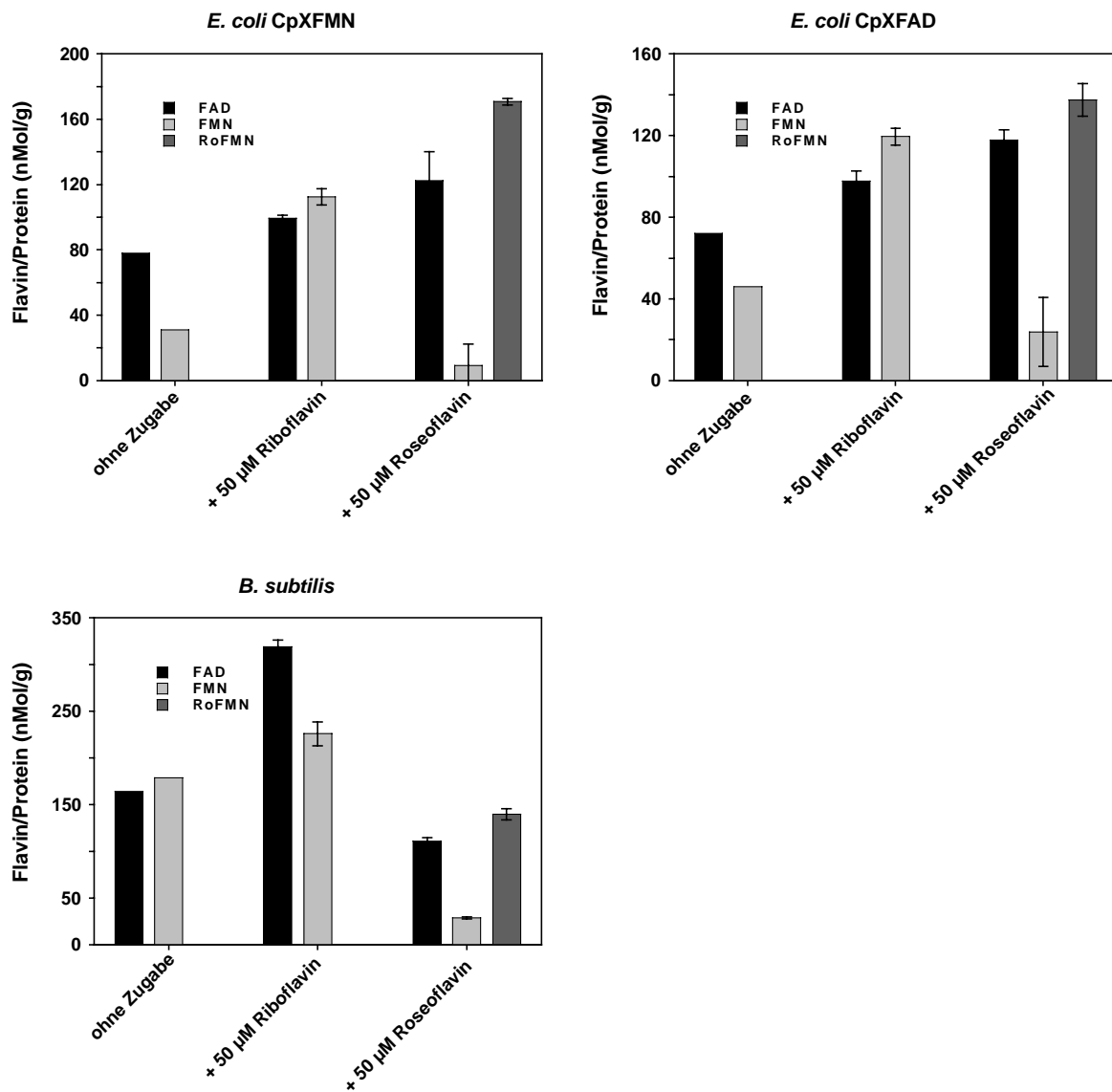
**Abbildung 5.3: Wachstumsvergleich auf festen Nährböden.**

Vergleich des Wachstums von *B. subtilis* WT 168 (1), *E. coli* BL21 DE3 (2), *E. coli* CpXFMN (3) und *E. coli* CpXFAD (4) auf LB-Platten mit 250 µM Riboflavin (links) und 250 µM Roseoflavin (rechts). Auf der zur Kontrolle verwendeten LB-Platte mit Riboflavin wachsen alle Stämme innerhalb von 24 Stunden. Auf LB-Agar mit Roseoflavin kann nur *E. coli* BL21 DE3 wachsen, da er keinen Flavintransporter besitzt und Roseoflavin nicht in die Zelle gelangen kann. *B. subtilis*, *E. coli* CpXFMN und CpXFAD haben einen Flavintransporter und können auf der roseoflavinhaltigen Agarplatte nicht wachsen.

## 5.2 Nachweis von RoFMN und RoFAD in *E. coli* CpXFMN und CpXFAD

### 5.2.1 Nachweis von RoFMN und RoFAD im Cytoplasmaas

Im nächsten Schritt sollte die *in vivo* Produktion der Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD gezeigt werden. Dazu wurden Kulturen von *B. subtilis* (Kontrolle) und der beiden Expressionsstämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD in LB-Medium bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 mit 50 µM Riboflavin bzw. Roseoflavin versetzt und weitere 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, zweimal mit kaltem 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und mittels French Press aufgeschlossen. Der zellfreie Extrakt wurde durch die Zugabe von 1 % Trichloressigsäure (TCA) denaturiert und nach Zentrifugation und Filtration mittels HPLC vermessen. Die gemessene Flavinkonzentration wurde auf die Konzentration des Gesamtproteins normiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 5.4 dargestellt.



**Abbildung 5.4: Flavingehalt in zellfreien Extrakten.**

Zellfreier Extrakt von *E. coli* CpXFMN, *E. coli* CpXFAD und *B. subtilis* nach Wachstum mit Riboflavin oder Roseoflavin wurde mit TCA denaturiert und der Überstand nach Zentrifugation in der HPLC vermessen. Die gemessene Flavinkonzentration (nM) wurde auf die Konzentration des Gesamtproteins (g/L) normiert. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben. Der Vergleich ohne Flavinzugabe wurde in Einfachbestimmung durchgeführt.

In den zellfreien Extrakten der Riboflavin-behandelten Zellen konnten FMN und FAD nachgewiesen werden. Bei *E. coli* CpXFMN und CpXFAD lag der FMN-Gehalt ( $113 \pm 5$  bzw.  $119 \pm 4$  nMol/g) leicht über dem von FAD ( $99 \pm 2$  bzw.  $98 \pm 5$  nMol/g). Bei *B. subtilis* war dagegen der FAD-Anteil ( $319 \pm 7$  nMol/g) größer als der von FMN ( $226 \pm 16$  nMol/g). Im Vergleich zu den *E. coli* CpX-Stämmen war der Flavingehalt bei *B. subtilis* mindestens doppelt so groß. Wachsen die Zellen in Gegenwart von Roseoflavin, hatten alle Stämme einen um mindestens 80 % geringeren FMN-Gehalt, wohingegen der FAD-Gehalt der *E. coli*-Stämme um ca. 20 % zunahm. Bei *B. subtilis* war der FAD-Gehalt um 65 % geringer. Allen mit

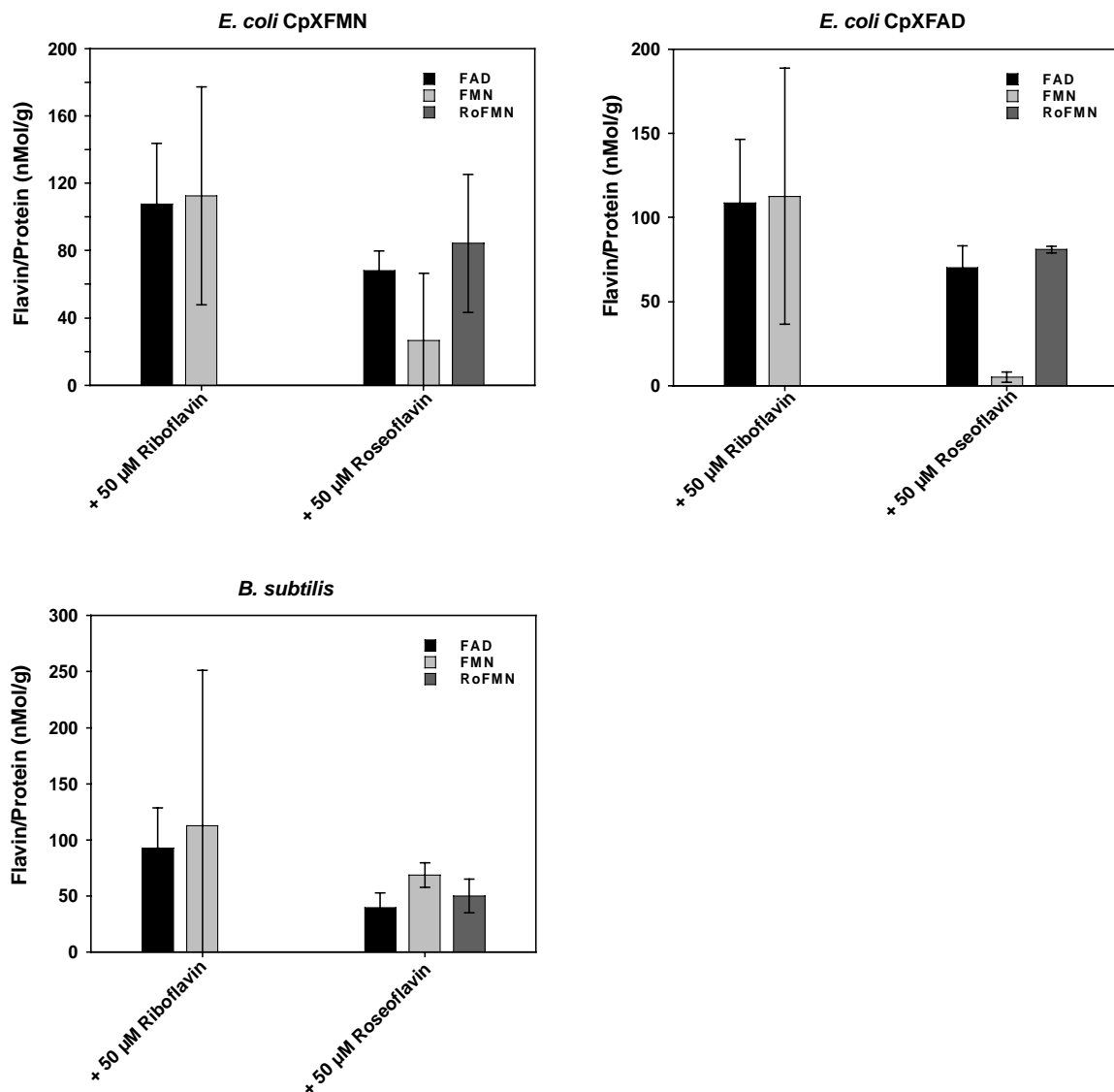


Roseoflavin behandelten Stämmen gemeinsam war ein hoher Anteil des Cofaktoranalogs RoFMN im zellfreien Extrakt. Für *E. coli* CpXFMN und CpXFAD wurden  $171 \pm 2$  bzw.  $137 \pm 8$  nMol/g RoFMN gemessen, *B. subtilis* enthielt  $140 \pm 6$  nMol/g RoFMN. RoFAD hingegen konnte in keiner Probe nachgewiesen werden. Um die natürlichen Bedingungen zu zeigen, wurden die Stämme ohne Flavinzugabe kultiviert und der Flavinegehalt nach dem Aufschluss bestimmt. Dieser Versuch wurde lediglich als Einfachbestimmung durchgeführt. Alle Stämme bilden weniger Cofaktoren als bei der Zugabe von Flavin zum Medium. Bei *E. coli* CpXFMN und CpXFAD ist, im Gegensatz zum Ansatz mit Riboflavin, der FAD-Gehalt höher ( $78$  bzw.  $72$  nMol/g) als der von FMN ( $31$  bzw.  $46$  nMol/g). Bei *B. subtilis* waren FAD- und FMN-Gehalt ähnlich hoch ( $164$  bzw.  $179$  nMol/g). Der Transporter PnuX scheint Flavine weniger gut zu transportieren als YpaA aus *B. subtilis*. In letzterem konnte die Flavinmenge durch die Zugabe von Riboflavin deutlich höher gesteigert werden als bei den getesteten *E. coli*-Stämmen, die PnuX enthielten.

### 5.2.2 Nachweis von RoFMN und RoFAD im löslichen Protein

Um zu zeigen, dass es sich bei den im vorherigen Versuch gemessenen Flavinen tatsächlich um proteingebundene Flavine handelt, wurden die freien Flavine mittels Größenausschlusschromatographie abgetrennt. Da hierdurch eine Verdünnung der Proteinextrakte unvermeidbar war, fand im Anschluss eine Konzentrierung des Gesamtproteins über Ultrafiltration statt (Vivaspin-Säulen, MWCO 3000 Da). Die Proteinextrakte wurden mit TCA denaturiert und mittels HPLC vermessen. In den so behandelten zellfreien Extrakten von *E. coli* CpXFMN und CpXFAD, die mit Riboflavin gewachsen waren, konnte mehr FAD ( $108 \pm 36$  bzw.  $108 \pm 38$  nMol/g) als FMN ( $65 \pm 32$  bzw.  $76 \pm 18$  nMol/g) nachgewiesen werden. Im löslichen Proteom von *B. subtilis* dagegen wurde mehr FMN ( $138 \pm 66$  nMol/g) als FAD ( $93 \pm 36$  nMol/g) gemessen. Wuchsen die Zellen in Gegenwart von Roseoflavin, wurden im löslichen Proteom geringere Mengen FAD als im Kontrollansatz mit Riboflavin gemessen. Für *E. coli* CpXFMN und CpXFAD wurden  $37$  bzw.  $35$  % weniger FAD, für *B. subtilis* sogar  $57$  % weniger FAD gemessen. Der Gehalt von FMN war um  $59$  % (*E. coli* CpXFMN),  $95$  % (*E. coli* CpXFAD) bzw.  $50$  % (*B. subtilis*) reduziert. Wie im vorherigen Versuch wurden große Mengen RoFMN gemessen. *E. coli* CpXFMN und CpXFAD enthielten  $84 \pm 41$  nMol/g bzw.  $81 \pm 2$  nMol/g

RoFMN, bei *B. subtilis* war es mit  $50 \pm 15$  nMol/g etwas weniger. RoFAD konnte auch hier in keiner Probe nachgewiesen werden. Im Vergleich zum vorherigen Versuch kam es bei der Messung des Flavingehaltes im löslichen Proteom zu großen Standardabweichungen der Messungen (Dreifachbestimmung). Da für die Größenausschlusschromatographie die zellfreien Extrakte des Versuchs aus Kapitel 5.2.1 verwendet wurden, sind die größeren Standardabweichungen durch die weiteren Versuchsschritte zu erklären.



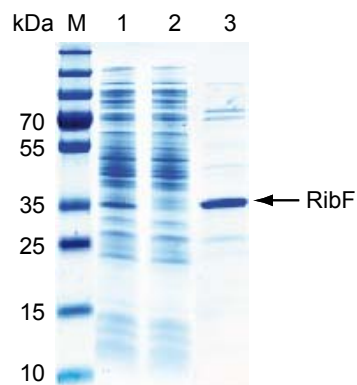
**Abbildung 5.5: Flavingehalt des löslichen Proteoms.**

Die Proteine im zellfreien Extrakt von *E. coli* CpXFMN, *E. coli* CpXFAD und *B. subtilis* nach Wachstum mit Riboflavin oder Roseoflavin wurden mittels Gelfiltration von freien Flavinen abgetrennt. Nach dem Aufkonzentrieren der Proben durch Ultrafiltration wurden die Proteine mit TCA denaturiert und der Überstand nach Zentrifugation in der HPLC vermessen. Die gemessene Flavinkonzentration (nM) wurde auf die Konzentration des Gesamtproteins (g/L) normiert. Der Versuch wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben.

### 5.3 Charakterisierung der Riboflavinkinase/FAD-Synthetase RibF aus *E. coli*

Um die Synthese der Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD im Modellorganismus *E. coli* besser zu verstehen, wurde die putative Flavokinase/FAD-Synthetase RibF aus *E. coli* untersucht. RibF wurde anhand seiner Ähnlichkeit (35 % Ähnlichkeit zu RibC aus *B. subtilis* auf Proteinebene) annotiert und bisher nicht funktionell beschrieben.

Das Gen *ribF* wurde an den Expressionsvektor pET28a(+) gekoppelt und in *E. coli* BL21 (DE3) exprimiert. Auf diese Weise wurde eine rekombinante Form von RibF erzeugt, die N-terminal einen His<sub>6</sub>-Tag trägt. Das Protein RibF wurde über Affinitätschromatographie gereinigt und in einem Aktivitätstest auf Flavokinase/FAD-Synthetase-Aktivität hin getestet (Abbildung 5.6).

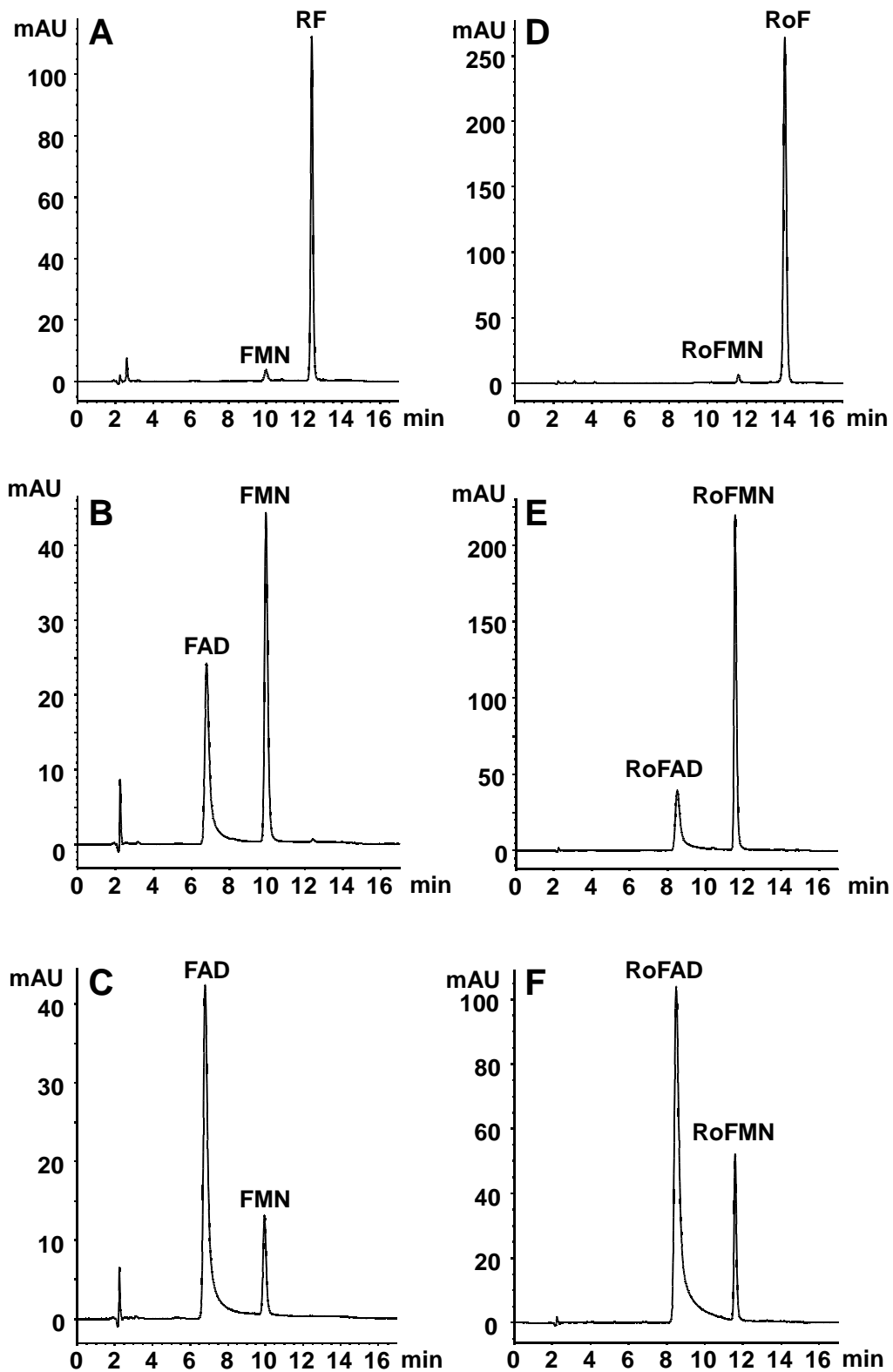


**Abbildung 5.6: SDS-Gel der RibF-Anreicherung.**

Aufgetragen wurde je 150 ng zellfreier Extrakt von pET28a-ribF (1), zellfreier Extrakt von pET28a-leer (2) und gereinigtes RibF aus pET28a-ribF (3). Die Reinigung erfolgte über Affinitätschromatographie via His-tag und anschließender Größenausschlusschromatographie.

Der Aktivitätstest enthielt 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 1 mM ATP, 6 mM MgCl<sub>2</sub>, 12 mM NaF, 24 mM Natriumdithionit, Flavin als Substrat und eine geeignete Menge Enzym. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C im Wasserbad. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde eine Probe entnommen und die Reaktion durch Zugabe von 1 % TCA gestoppt. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert, filtriert und mittels HPLC vermessen.

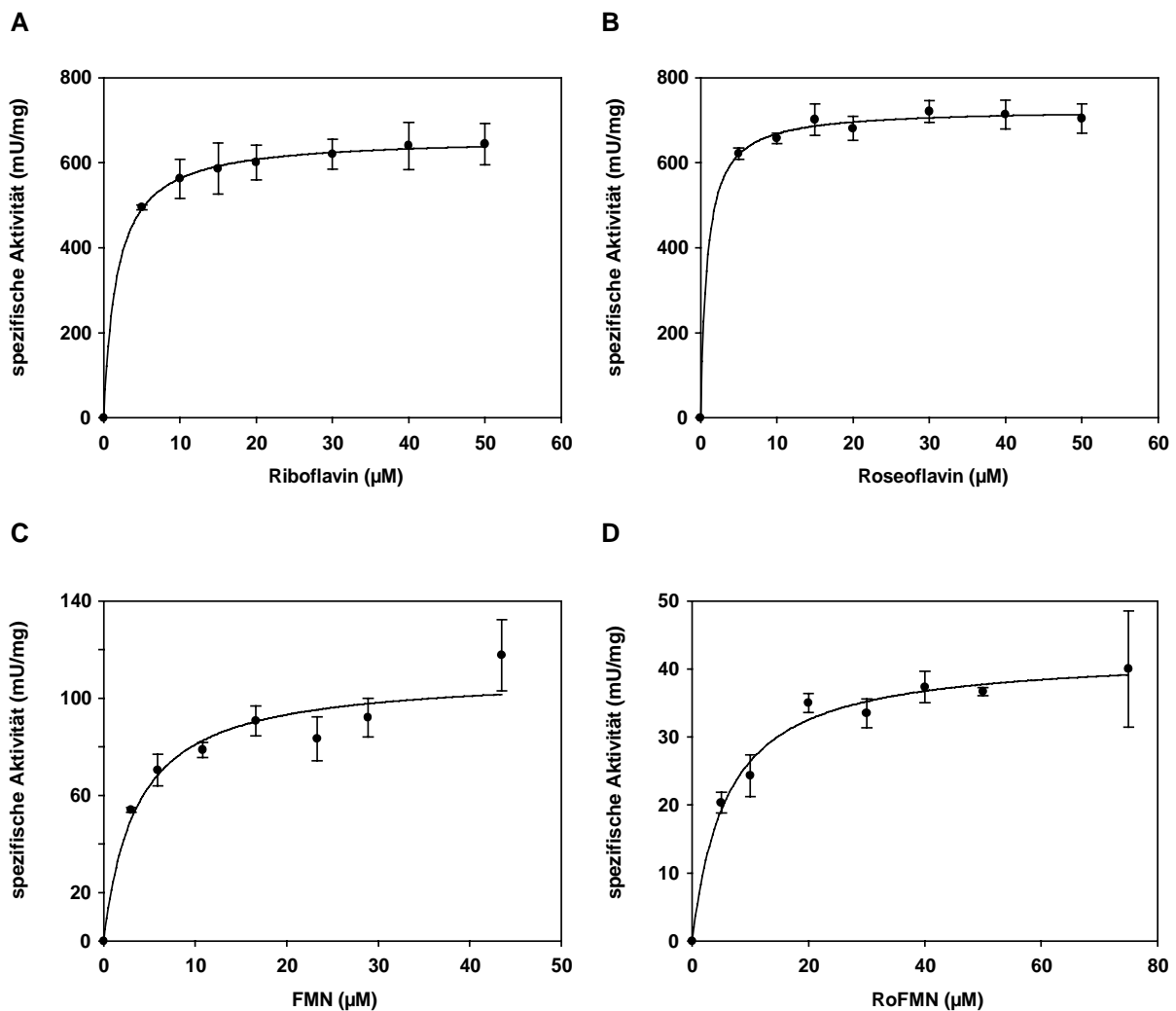
Zunächst wurde durch den Einsatz von Riboflavin und Roseoflavin als Substrat gezeigt, dass RibF in der Lage ist, beide Substrate umzusetzen. Abbildung 5.7 zeigt die Chromatogramme einer RibF-Reaktion mit Riboflavin bzw. Roseoflavin als Substrat zu verschiedenen Zeitpunkten. Riboflavin und Roseoflavin wurden von RibF etwa gleich schnell umgesetzt. Mit Riboflavin als Substrat wurde zunächst FMN gebildet, welches anschließend weiter zu FAD umgesetzt wurde. Roseoflavin wurde analog zu RoFMN und weiter zu RoFAD umgesetzt.



**Abbildung 5.7: HPLC-Chromatogramme des RibF-Aktivitätstest.**

Im RibF-Aktivitätstest wurden 100  $\mu\text{M}$  RF bzw. RoF als Substrat mit 0,08 mg/mL RibF umgesetzt. Die linke Hälfte der Abbildung zeigt die HPLC-Chromatogramme für den Umsatz von RF nach 0 min (A), 10 min (B) und 60 min (C). Der Umsatz von RoF ist in der rechten Bildhälfte nach 0 min (D), 10 min (E) und 60 min (F) dargestellt. Die Messung der Absorption erfolgte für RF, FMN und FAD bei 445 nm, für RoF, RoFMN und RoFAD bei 503 nm. Die Signale der einzelnen Substanzen erscheinen zu folgenden Retentionszeiten: RF (12,5 min), FMN (10 min), FAD (7 min), RoF (14 min), RoFMN (11,7 min), RoFAD (8,5 min).

Um RibF genauer zu charakterisieren, wurden kinetische Experimente durchgeführt und die spezifische Aktivität von RibF für unterschiedliche Substratkonzentrationen bestimmt. Riboflavin und Roseoflavin dienten dabei als Substrat für die Untersuchung der Flavokinaseaktivität. Für die Charakterisierung der FAD-Synthetaseaktivität wurden FMN und RoFMN als Substrat eingesetzt (Abbildung 5.8).



**Abbildung 5.8: Enzymkinetik für RibF aus *E. coli*.**

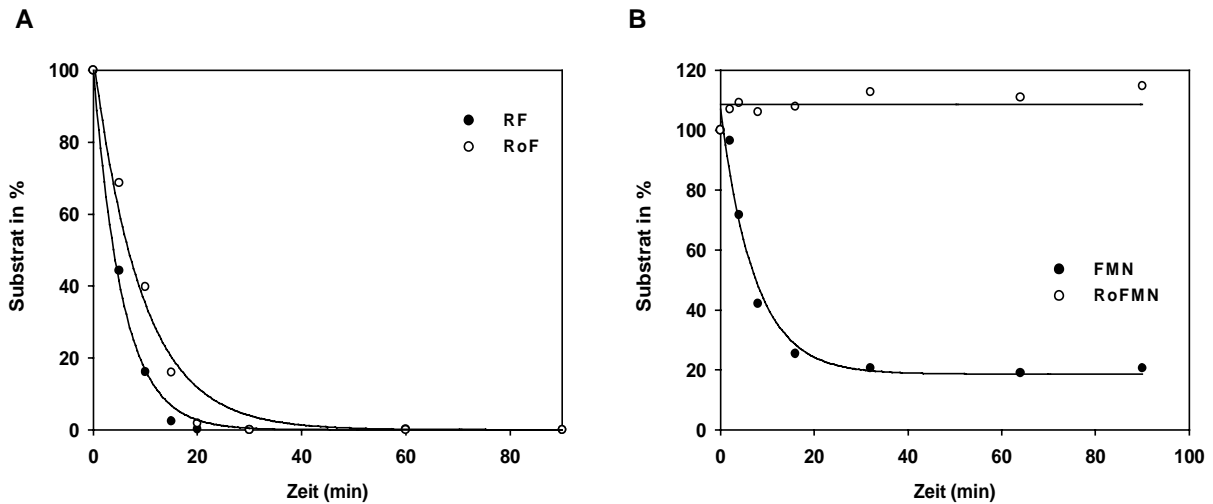
Enzymkinetik mit den Substraten Riboflavin (A) bzw. Roseoflavin (B) zur Bestimmung der Flavokinaseaktivität und FMN (C) bzw. RoFMN (D) zur Bestimmung der FAD-Synthetaseaktivität von RibF. Die verwendete RibF-Konzentration lag bei 0,005 mg/mL für die Bestimmung der Flavokinaseaktivität und bei 0,02 mg/mL für die Bestimmung der FAD-Synthetaseaktivität. Aufgetragen ist die spezifische RibF-Aktivität in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Die Datenpunkte wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben. Die spezifische Aktivität ist dargestellt als mU/mg ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ). Die Anpassung der Kurven erfolgte mittels nicht-linearer Regression in SigmaPlot.

**Tabelle 5.1: Kinetische Parameter von RibF für verschiedene Substrate.**

Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\max}$ ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \cdot \mu\text{M}^{-1}$ )
Riboflavin	1,7	660	0,38	0,22
Roseoflavin	0,9	726	0,42	0,49
FMN	3,6	110	0,06	0,017
RoFMN	6,0	42	0,02	0,003

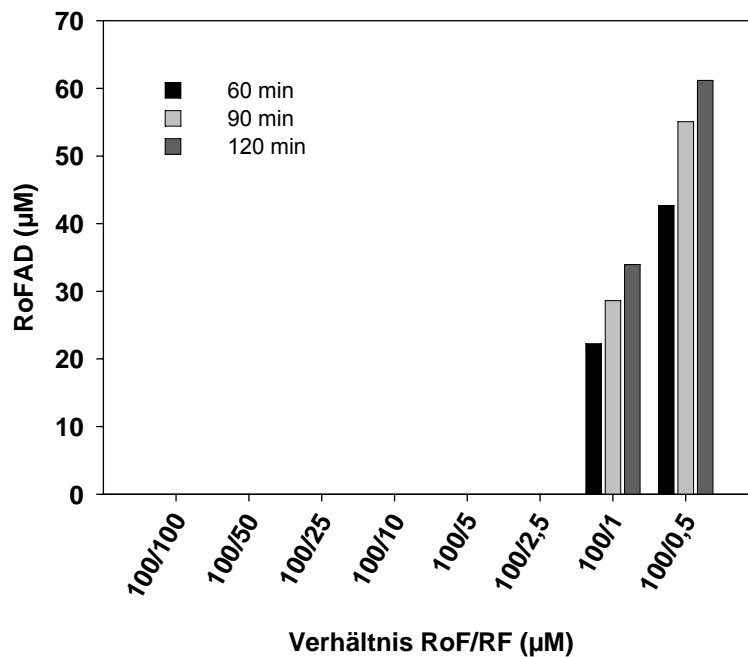
Die spezifische Aktivität (U/mg) wurde gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Die Anpassung der Kurven erfolgte über nicht-lineare Regression in SigmaPlot. Die Kurven folgen einer Michaelis-Menten-Gleichung 1. Ordnung. Die Werte für  $V_{\max}$  und  $K_m$  wurden mit SigmaPlot ermittelt und sind in Tabelle 5.1 zusammengefasst. Die  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Werte zeigen, dass RibF Roseoflavin im Vergleich zu Riboflavin doppelt so gut umsetzt (0,49 bzw.  $0,22 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ). Die FAD-Synthetasereaktion verlief langsamer und auch die  $K_m$ -Werte lagen höher. Daraus ergaben sich  $k_{\text{cat}}/K_m$ -Werte von nur  $0,017 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  für FMN bzw.  $0,003 \text{ s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$  für RoFMN. Insgesamt wird deutlich, dass die Flavokinasereaktion effektiver verläuft und beide Substrate ähnlich gut umgesetzt werden. Die FAD-Synthetasereaktion ist langsamer und die Substrate unterscheiden sich in ihren Umsatzzahlen deutlicher. RoFMN wurde sechsmal schlechter umgesetzt als FMN.

Ein interessanter Effekt konnte bei der gleichzeitigen Zugabe von Riboflavin und Roseoflavin als Substrat beobachtet werden. Die Abnahme der beiden Substrate erfolgte etwa gleich schnell (Abbildung 5.9 A). Die Adenylierungsreaktion fand jedoch nur für FMN statt, während RoFMN nicht weiter zu RoFAD umgesetzt wurde (Abbildung 5.9 B). In einem weiteren Versuch wurden FMN und RoFMN gleichzeitig als Substrat eingesetzt und auch hier fand kein Umsatz von RoFMN zu RoFAD statt. Dies lässt vermuten, dass FMN die Reaktion von RoFMN zu RoFAD inhibiert. Um die Wirksamkeit dieser Hemmung zu untersuchen, wurden Riboflavin und Roseoflavin in verschiedenen Verhältnissen als Substrat für RibF eingesetzt. Das Ergebnis zeigte, dass schon die Anwesenheit sehr geringer Mengen FMN (2,5 %) die Reaktion von RoFMN zu RoFAD unterbindet. Erst nach vollständigem Umsatz von FMN wurde RoFMN von RibF als Substrat verwendet (Abbildung 5.10).



**Abbildung 5.9: Aktivitätstest von RibF mit zwei Substraten.**

RibF-Aktivitätstest bei gleichzeitiger Zugabe von je 50  $\mu\text{M}$  RF und RoF (A) oder FMN und RoFMN (B) als Substrat. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und nach Denaturierung mit 1 % TCA in der HPLC vermessen. RF und RoF wurden jeweils komplett umgesetzt. FMN wurde zu einem großen Teil umgesetzt, wohingegen RoFMN nicht umgesetzt wurde. Wenn FMN oder RoFMN einzeln als Substrat im Aktivitätstest eingesetzt wurden, konnte beides umgesetzt werden.



**Abbildung 5.10: Aktivitätstest von RibF mit verschiedenen Roseoflavin/Riboflavin-Verhältnissen als Substrat.**

Aktivitätstest von RibF mit Roseoflavin als Substrat bei gleichzeitiger Zugabe verschiedener Konzentrationen Riboflavin. Dargestellt ist die gebildete Menge RoFAD ( $\mu\text{M}$ ) zu verschiedenen Zeitpunkten. Erst ab einem Verhältnis von 100:1 wird nach 60 min RoFAD gebildet. Es reichen demnach sehr geringe Mengen FMN aus, um die Bildung von RoFAD aus RoFMN durch RibF zu verhindern.

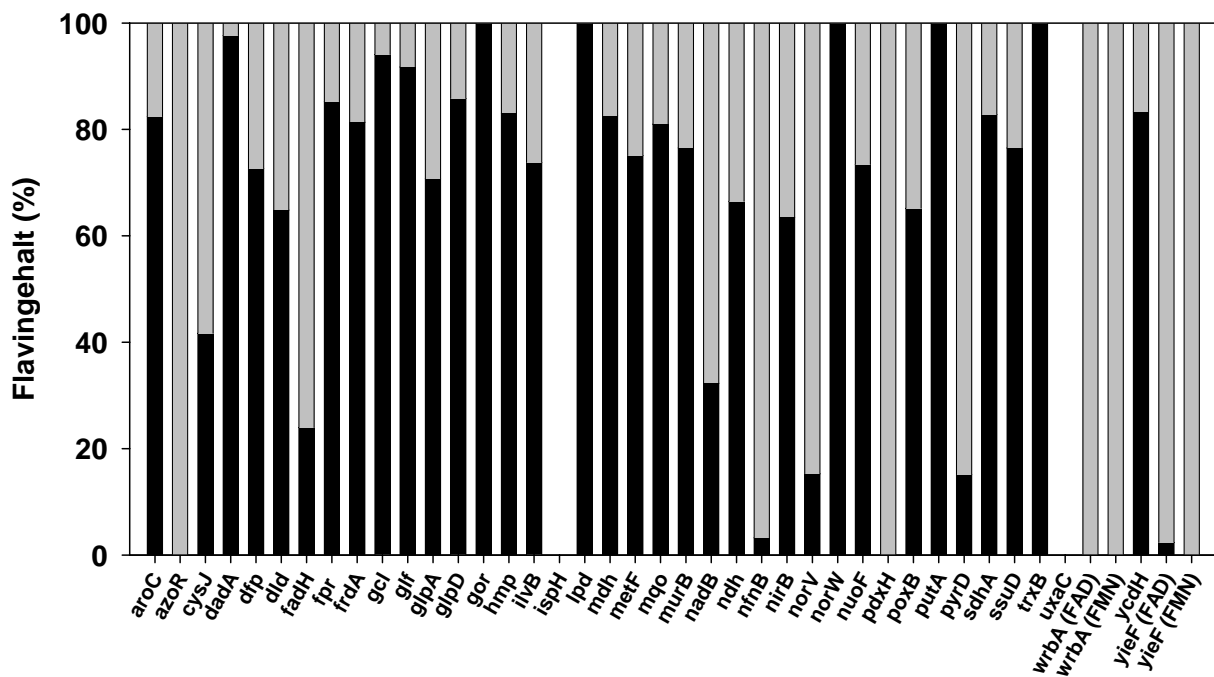
## 5.4 Reinigung von 38 Flavoenzymen aus RoF/RF-behandelten *E. coli*-Kulturen und Analyse der Cofaktoren

Um zu zeigen, dass Flavoenzyme tatsächlich Zielmoleküle für Roseoflavin sind, sollten Flavoenzyme aus dem Modellorganismus *E. coli* untersucht werden. Durch die Verwendung der Stämme *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD und des Expressionsplasmids pCA24N war es möglich, Flavoenzyme mit natürlichen bzw. analogen Cofaktoren *in vivo* zu produzieren. Die Plasmide für die Expression aller vorhergesagten Flavoenzyme wurden von der ASKA-Library bezogen (Kitagawa et al. 2005). Die ASKA-Library bietet Plasmide mit allen ORFs (Open Reading Frames) aus *E. coli* K-12 an. Die Gene stehen im Plasmid pCA24N unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T5-Promotors und die Genprodukte besitzen einen N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag, der die Reinigung über Affinitätschromatographie ermöglicht. Durch Literaturrecherche in der Datenbank BRENDA wurde eine Liste der bekannten und vorhergesagten Flavoenzyme in *E. coli* erstellt. Diese wurde mit den Daten der ASKA-Library abgeglichen und es ergab sich eine Liste mit 38 Flavoenzymen (siehe Anhang). Nach Bestellung und Lieferung der Plasmide wurden diese aus den jeweiligen Stämmen isoliert und ein Kontrollverdau durchgeführt. Die Plasmide wurden anschließend verwendet, um die Stämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD zu transformieren, je nachdem, welchen Cofaktor die Proteine laut Literatur bevorzugen. Zur Produktion FMN-abhängiger Proteine wurde *E. coli* CpXFMN und für die Herstellung FAD-abhängiger Proteine wurde *E. coli* CpXFAD verwendet. Die Plasmide für die Produktion von WrbA und YieF wurden sowohl in *E. coli* CpXFMN als auch *E. coli* CpXFAD transformiert, da die Angaben zum Cofaktor nicht eindeutig waren. Die Stämme wurden bei 30 °C in LB-Medium kultiviert. Bei einer OD<sub>600</sub> = 0,4 wurde die Produktion der Flavoenzyme durch Induktion mit IPTG gestartet. Durch gleichzeitige Zugabe von 50 µM Riboflavin oder 50 µM Roseoflavin wurde die Beladung der Flavoenzyme mit natürlichen oder analogen Cofaktoren erzwungen. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet und anschließend durch den N-terminalen His<sub>6</sub>-Tag über Affinitätschromatographie gereinigt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford bestimmt. Die apparente Homogenität der Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot überprüft. Um die Cofaktoren von den Proteinen zu lösen, wurden die Proben mit 1 % TCA behandelt und anschließend zentrifugiert. Der Überstand, der die freien Flavine enthielt,



wurde anschließend filtriert und mittels HPLC vermessen. Die zusammengefassten Ergebnisse sind in Abbildung 5.11 und Abbildung 5.12 dargestellt. Die detaillierten Ergebnisse der HPLC und der Proteinbestimmung, sowie die Bilder von SDS-PAGE und Western-Blot befinden sich in Tabelle 5.2.

Im Kontrollansatz wurde dem Medium Riboflavin zugegeben, wodurch die Zellen mit den natürlichen Cofaktoren versorgt wurden. Die gereinigten Proteine enthielten alle FMN und/oder FAD. Eine Ausnahme bilden IspH und UxaC. Diese Proteine sind keine Flavoproteine und dienten zur Kontrolle. Nicht jedes der 38 Proteine ließ sich gut reinigen. Bei Gcl, GlpD, NirB, PdxH, PutA und SdhA beispielsweise zwar die Ausbeute an gereinigtem Protein relativ gering (unter 50  $\mu\text{M}$ ). Andere wie beispielsweise Gor, Mdh, NfnB, TrxB und YieF konnten in Konzentrationen von über 300  $\mu\text{M}$  angereichert werden. Auch die Beladung mit dem jeweiligen Cofaktor war unterschiedlich effizient für die einzelnen Proteine. Einige waren intensiv gelb gefärbt (z.B. CysJ, FadH, Fpr, Gor, Lpd, MetF, MurB, NfnB, NorW, PoxB, PutA, TrxB, WrbA und YieF), andere dagegen kaum. Die gebundenen Cofaktoren stimmten größtenteils mit den in der Literatur angegebenen Cofaktoren überein. Lediglich NfnB, das in der Literatur als FAD-abhängig beschrieben wird (Vasudevan et al. 1988), band unter den Versuchsbedingungen hauptsächlich FMN (97 %).

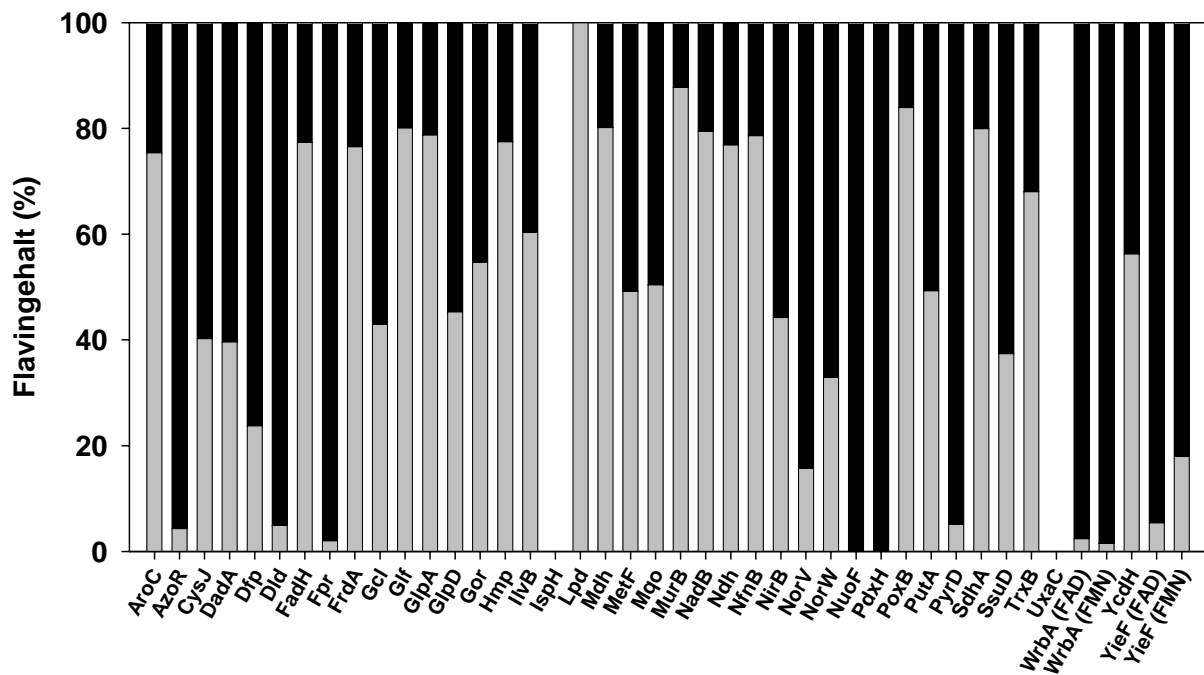


**Abbildung 5.11: Beladung der Flavoproteine nach Wachstum mit Riboflavin.**

Dargestellt ist der relative Anteil an FMN (grau) und FAD (schwarz) an der Gesamtmenge der mit Hilfe der HPLC gemessenen Flavine. Die Flavoenzyme wurden *in vivo* mit Cofaktor beladen, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend der Flavingehalt in der HPLC bestimmt. IspH und UxaC enthielten keine Cofaktoren, da es sich nicht um Flavoproteine handelt (Kontrolle).

Wurde den Zellen zum Zeitpunkt der Induktion Roseoflavin statt Riboflavin zugegeben, verschlechterte sich das Wachstum massiv. Da die Kulturen jedoch zu Beginn des Versuchs in LB-Medium ohne Roseoflavin gewachsen waren, erreichten sie dennoch eine  $OD_{600}$  von etwa 1,6. Die Proteinausbeute war im Allgemeinen aber deutlich geringer als in den Kontrollansätzen mit Riboflavin. Bei den angereicherten Proteinen zeigte sich, dass fast alle sowohl natürliche als auch Cofaktoranaloga gebunden hatten. Ausnahmen waren NuoF und PdxH, welche ausschließlich RoFMN bzw. RoFAD gebunden hatten. Stimmt für den Kontrollansatz mit Riboflavin die gebunden Cofaktoren (FMN oder FAD) noch mit den Angaben in der Literatur überein, war dies für den Roseoflavinansatz nicht immer der Fall. Vor allem FAD-abhängige Enzyme hatten auch RoFMN anstatt des vermuteten RoFADs gebunden (z.B. Fpr, Dfp). Allgemein war die Beladung mit Cofaktor im Roseoflavinansatz schlechter. Besonders betroffen waren hiervon die FAD-abhängigen Proteine, die oft nur sehr geringe Mengen Cofaktor gebunden hatten. Die Beladung der FMN-abhängigen Proteine funktionierte gut, was sich in der intensiven Rotfärbung einiger angereicherter Proteine zeigte (z.B. AzoR, NorV, PdxH, PyrD, WrbA und YieF). Als einziges der getesteten

Flavoproteine hat Lpd keine Cofaktoranaloga gebunden. Im Kontrollansatz mit Riboflavin war sowohl die Ausbeute (230  $\mu\text{M}$ ) als auch die Beladung von Lpd mit FAD (198  $\mu\text{M}$ ) sehr hoch. Im Ansatz mit Roseoflavin war die Ausbeute um den Faktor sieben geringer (35  $\mu\text{M}$ ) und es hatten lediglich geringe Mengen FMN (1,6  $\mu\text{M}$ ) und FAD (1,7  $\mu\text{M}$ ) gebunden. Ein Grund für die schlechte Beladung der FAD-abhängigen Proteine war möglicherweise die geringe Verfügbarkeit von RoFAD.






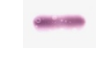






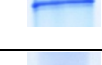
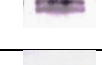




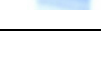
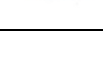


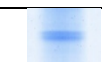









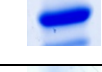


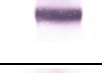







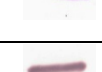
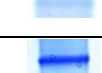





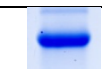



**Abbildung 5.12: Beladung der Flavoproteine nach Wachstum mit Roseoflavin.**

































Dargestellt ist der relative Anteil an FMN/FAD (grau) und RoFMN/RoFAD (schwarz) an der Gesamtmenge der mit Hilfe der HPLC gemessenen Flavine. Die Flavoenzyme wurden *in vivo* mit Cofaktor beladen, mittels Affinitätschromatographie gereinigt und anschließend der Flavingehalt in der HPLC bestimmt. IspH und UxaC enthielten keine Cofaktoren, da es sich nicht um Flavoproteine handelt (Kontrolle). Lpd ist das einzige Flavoprotein, das keine Cofaktoranaloga enthielt.

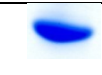
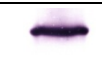

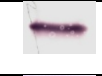


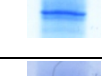
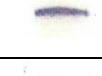







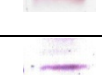
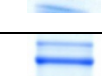

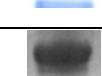
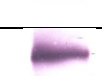
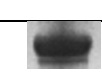
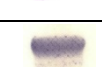
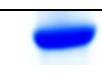

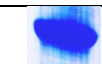
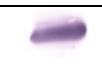
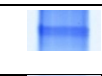

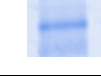



**Tabelle 5.2: Ergebnis der Proteinanreicherung und Cofaktorbeladung von 38 Flavoenzymen aus *E. coli* nach dem Wachstum mit Riboflavin (RF) bzw. Roseoflavin (RoF).**

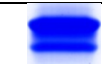

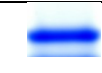







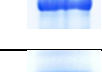









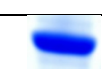

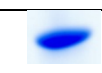



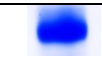





Angegeben sind jeweils der Name des Flavoenzyms inklusive der ASKA-Identifizierungsnummer sowie der Stamm mit dessen Hilfe das Gen exprimiert wurde. Für die Expression in Gegenwart der Flavine RF und RoF sind die Konzentration des angereicherten Proteins sowie die nach der Denaturierung mit TCA in der HPLC gemessene Cofaktorkonzentration angegeben. Ebenfalls dargestellt sind die Ergebnisse aus SDS-PAGE und Western-Blot.

Flavoprotein	ASKA accession number	Host strain	MW (kDA)	Flavin	Protein-konzentration ( $\mu\text{M}$ )	FMN ( $\mu\text{M}$ )	RoFMN ( $\mu\text{M}$ )	FAD ( $\mu\text{M}$ )	RoFAD ( $\mu\text{M}$ )	SDS-PAGE	Western-Blot
AroC	JW2326	CpXFMN	39	RF	145	0,5	0,0	2,2	0,0		
		CpXFMN	39	RoF	78	0,0	0,7	2,0	0,0		
AzoR	JW1409	CpXFMN	22	RF	299	45,3	0,0	0,0	0,0		
		CpXFMN	22	RoF	40	0,4	8,9	0,0	0,0		
CysJ	JW2734	CpXFMN	64	RF	100	39,8	0,0	28,5	0,0		
		CpXFMN	64	RoF	14	0,0	1,1	2,2	2,1		
DadA	JW1178	CpXFAD	48	RF	52	0,1	0,0	2,3	0,0		
		CpXFAD	48	RoF	24	0,4	0,6	0,0	0,0		
Dfp	JW5642	CpXFMN	43	RF	92	1,0	0,0	2,5	0,0		
		CpXFMN	43	RoF	64	0,7	8,9	2,1	0,0		

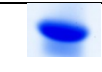

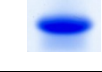




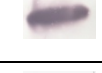


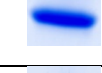









Dld	JW2121	CpXFAD	65	RF	70	3,7	0,0	6,8	0,0		
		CpXFAD	65	RoF	39	0,6	11,8	0,0	0,0		
FadH	JW3052	CpXFMN	66	RF	124	37,7	0,0	11,9	0,0		
		CpXFMN	66	RoF	17	0,0	0,6	2,0	0,0		
Fpr	JW3895	CpXFAD	28	RF	181	16,9	0,0	97,0	0,0		
		CpXFAD	28	RoF	117	0,9	38,4	0,0	3,6		
FrdA	JW4115	CpXFAD	66	RF	85	0,5	0,0	2,1	0,0		
		CpXFAD	66	RoF	131	0,0	0,6	2,0	0,0		
Gcl	JW0495	CpXFAD	65	RF	46	0,6	0,0	8,8	0,0		
		CpXFAD	65	RoF	75	0,0	0,7	2,0	2,0		
Glf	JW2021	CpXFAD	43	RF	157	2,8	0,0	31,5	0,0		
		CpXFAD	43	RoF	21	0,0	0,6	2,4	0,0		
GlpA	JW2235	CpXFAD	59	RF	70	0,9	0,0	2,3	0,0		
		CpXFAD	59	RoF	19	0,0	0,5	2,0	0,0		
GlpD	JW3389	CpXFAD	57	RF	28	0,8	0,0	4,5	0,0		
		CpXFAD	57	RoF	26	0,0	0,6	2,1	1,9		

Gor	JW3467	CpXFAD	49	RF	299	0,0	0,0	175,2	0,0		
		CpXFAD	49	RoF	126	0,0	0,6	3,0	1,9		
Hmp	JW2536	CpXFAD	44	RF	252	0,4	0,0	2,1	0,0		
		CpXFAD	44	RoF	194	0,0	0,6	2,0	0,0		
IlvB	JW3646	CpXFAD	60	RF	121	5,3	0,0	14,9	0,0		
		CpXFAD	60	RoF	59	0,4	0,6	3,4	1,9		
IspH	JW0027	CpXFAD	35	RF	25	0,0	0,0	0,0	0,0		
		CpXFAD	35	RoF	57	0,0	0,0	0,0	0,0		
Lpd	JW0112	CpXFAD	51	RF	229	0,0	0,0	197,9	0,0		
		CpXFAD	51	RoF	35	1,6	0,0	1,7	0,0		
Mdh	JW3205	CpXFAD	32	RF	398	0,5	0,0	2,2	0,0		
		CpXFAD	32	RoF	259	0,4	0,6	2,0	0,0		
MetF	JW3913	CpXFAD	33	RF	234	19,0	0,0	57,2	0,0		
		CpXFAD	33	RoF	41	1,1	0,0	1,0	2,2		
Mqo	JW2198	CpXFAD	60	RF	53	0,5	0,0	2,1	0,0		
		CpXFAD	60	RoF	24	0,5	0,6	2,1	1,9		

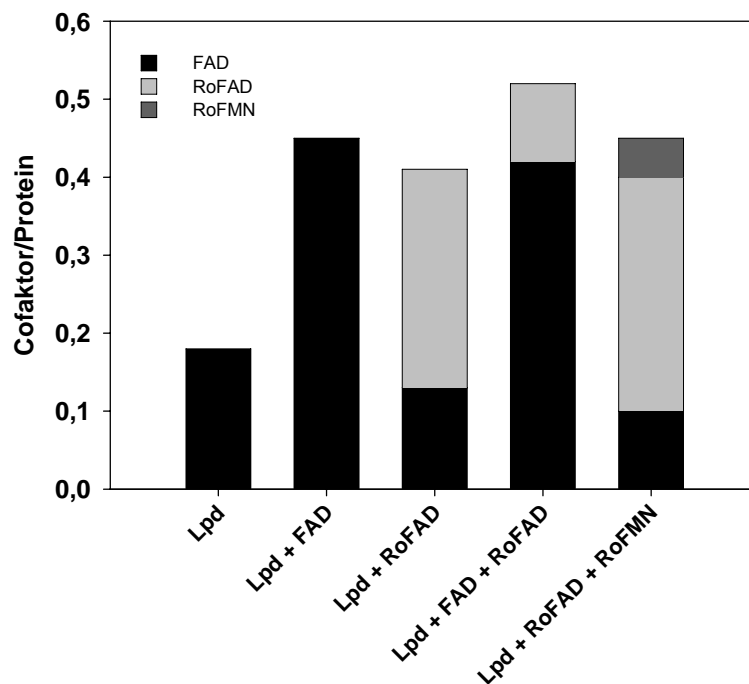
MurB	JW3940	CpXFAD	38	RF	229	22,7	0,0	73,8	0,0		
		CpXFAD	38	RoF	42	0,0	0,6	3,9	0,0		
NadB	JW2558	CpXFAD	60	RF	51	4,4	0,0	2,1	0,0		
		CpXFAD	60	RoF	54	0,4	0,6	2,1	0,0		
Ndh	JW1095	CpXFAD	47	RF	62	1,2	0,0	2,4	0,0		
		CpXFAD	47	RoF	36	0,0	0,6	2,0	0,0		
NfnB	JW0567	CpXFAD	24	RF	328	129,7	0,0	4,3	0,0		
		CpXFAD	24	RoF	137	2,2	0,6	0,0	0,0		
NirB	JW3328	CpXFAD	93	RF	28	2,0	0,0	3,5	0,0		
		CpXFAD	93	RoF	12	0,0	0,5	2,0	2,0		
NorV	JW2680	CpXFMN	54	RF	85	12,4	0,0	2,2	0,0		
		CpXFMN	54	RoF	70	1,2	11,1	0,8	0,0		
NorW	JW2681	CpXFAD	41	RF	144	0,0	0,0	158,0	0,0		
		CpXFAD	41	RoF	50	0,9	0,0	2,7	7,4		
NuoF	JW2279	CpXFMN	49	RF	72	0,7	0,0	2,0	0,0		
		CpXFMN	49	RoF	39	0,0	0,6	0,0	0,0		

PdxH	JW1630	CpXFMN	26	RF	32	7,6	0,0	0,0	0,0		
		CpXFMN	26	RoF	21	0,0	7,7	0,0	0,0		
PoxB	JW0855	CpXFAD	62	RF	125	16,3	0,0	30,5	0,0		
		CpXFAD	62	RoF	23	0,9	0,6	2,2	0,0		
PutA	JW0999	CpXFAD	144	RF	30	0,0	0,0	30,0	3,0		
		CpXFAD	144	RoF	10	0,4	0,6	2,0	1,9		
PyrD	JW0928	CpXFMN	37	RF	108	11,8	0,0	2,1	0,0		
		CpXFMN	37	RoF	179	0,7	50,0	2,0	0,0		
SdhA	JW0713	CpXFAD	64	RF	45	0,5	0,0	2,5	0,0		
		CpXFAD	64	RoF	29	0,4	0,6	2,0	0,0		
SsuD	JW0918	CpXFAD	42	RF	222	0,7	0,0	2,2	0,0		
		CpXFAD	42	RoF	146	0,4	0,6	0,0	0,0		
TrxB	JW0871	CpXFAD	35	RF	353	0,0	0,0	124,1	0,0		
		CpXFAD	35	RoF	123	0,0	0,0	4,4	2,1		
UxaC	JW3063	CpXFAD	54	RF	141	0,0	0,0	0,0	0,0		
		CpXFAD	54	RoF	133	0,0	0,0	0,0	0,0		



WrbA (FAD)	JW0989	CpXFAD	21	RF	302	186,9	0,0	0,0	0,0		
		CpXFAD	21	RoF	222	4,5	182,2	0,0	0,0		
WrbA (FMN)	JW0989	CpXFMN	21	RF	270	143,3	0,0	0,0	0,0		
		CpXFMN	21	RoF	210	0,9	59,8	0,0	0,0		
YcdH	JW5138	CpXFAD	18	RF	241	0,4	0,0	2,0	0,0		
		CpXFAD	18	RoF	237	0,0	0,0	2,0	1,5		
YieF (FAD)	JW3691	CpXFAD	20	RF	403	165,3	0,0	4,0	0,0		
		CpXFAD	20	RoF	57	0,6	10,5	0,0	0,0		
YieF (FMN)	JW3691	CpXFMN	20	RF	213	153,1	0,0	0,0	0,0		
		CpXFMN	20	RoF	107	1,5	15,3	1,8	0,0		

In Kapitel 5.2.1 konnte im zellfreien Extrakt kein RoFAD nachgewiesen werden. Auch die Ergebnisse der RibF-Charakterisierung weisen darauf hin, dass RoFAD in Gegenwart von FMN nicht gebildet wird. Dies könnte dazu führen, dass im Cytoplasma nur sehr geringe Mengen RoFAD gebildet werden und den Flavoproteinen zur Verfügung stehen. Um zu testen, ob FAD-abhängige Flavoenzyme RoFAD binden können, wurde Lpd *in vitro* mit Cofaktor beladen werden. Die Lipoamiddehydrogenase Lpd ist Teil des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes in *E. coli* und katalysiert die Oxidation der Dihydroliponsäure, wobei der Ladungstransfer über FAD verläuft (Schmincke-Ott & Bisswanger 1981). Zunächst wurde Lpd als Apoenzym hergestellt, indem während der Expression dem Medium weder Riboflavin noch Roseoflavin zugegeben wurden. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen aufgeschlossen und Lpd über Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde Lpd eine Stunde mit verschiedenen Cofaktoren inkubiert und danach erneut über Affinitätschromatographie gereinigt. Um die Menge des gebundenen Cofaktors zu bestimmen, wurden die Proteinextrakte mit TCA denaturiert und der Überstand in der HPLC vermessen (Abbildung 5.13). Dabei zeigte sich, dass das als Apoprotein produzierte Lpd noch geringe Mengen FAD gebunden hatte. Durch die Zugabe von verschiedenen Flavinen und anschließender Reinigung konnte Lpd zu 45-50 % beladen werden. Die Inkubation mit FAD oder RoFAD resultierte in der Bindung des jeweiligen Cofaktors in ähnlichem Maße. Bei der Zugabe beider Cofaktoren in Kombination wurde bevorzugt FAD gebunden (42 %). Nur etwa 10 % des Proteins war mit RoFAD beladen. In einem weiteren Versuch wurden RoFMN und RoFAD in Kombination angeboten. Das Ergebnis zeigte, dass fast ausschließlich RoFAD gebunden wurde (30 %) und nur sehr geringe Mengen RoFMN (5 %). Lpd scheint folglich in der Lage zu sein, das Cofaktoranalogen RoFAD zu binden. Für NorW wurden im selben Experiment ähnliche Ergebnisse gemessen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass RoFAD im verwendeten Versuchssystem nur in geringen Mengen vorkam und deswegen kaum von Flavoproteinen gebunden wurde.

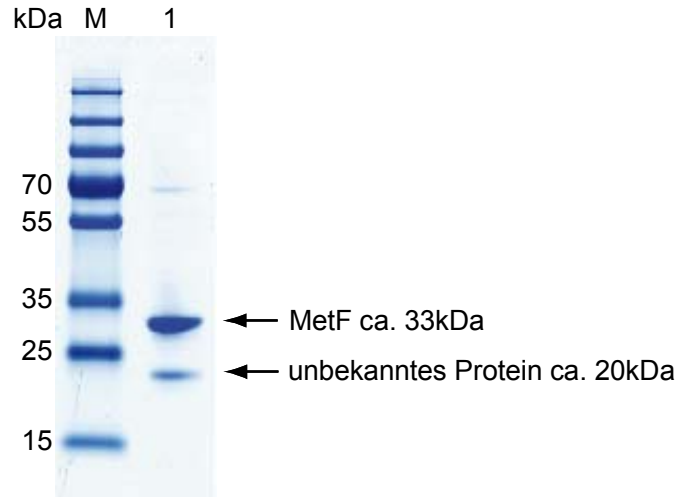


**Abbildung 5.13: *In vitro* Beladung der FAD-abhängigen Dihydrolipoyl-Dehydrogenase (Lpd).**

Gereinigtes Apoenzym wurde 1 h mit Cofaktor inkubiert und danach mittels Affinitätschromatographie über den His<sub>6</sub>-Tag gereinigt. Die Proteine wurden anschließend mit 1 % TCA denaturiert und die freien Flavine im Überstand in der HPLC gemessen. Die gemessene Flavinmenge ( $\mu\text{M}$ ) wurde auf die Proteinkonzentration ( $\mu\text{M}$ ) bezogen. Lpd-Apoenzym enthielt noch geringe Mengen FAD. Die Zugabe von FAD oder RoFAD führte zur Bindung des jeweiligen Cofaktors. Bei gleichzeitiger Zugabe von FAD und RoFAD wurde FAD bevorzugt gebunden. RoFAD wurde bei gleichzeitiger Zugabe von RoFMN bevorzugt.

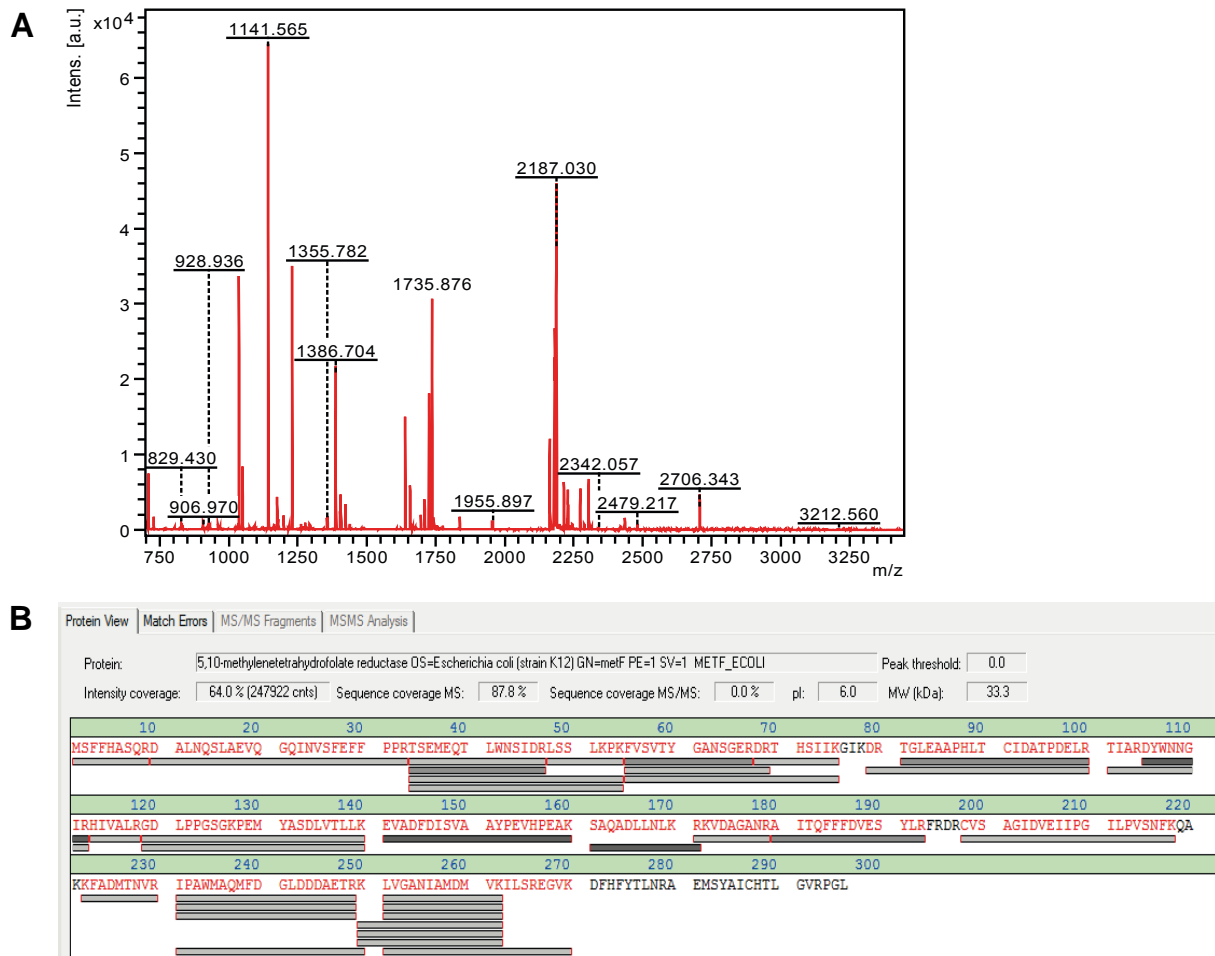
Eine weitere Auffälligkeit stellte die unvollständige Cofaktorsättigung der angereicherten Proteine dar. Da es sich für die Reinigung über Affinitätschromatographie um ein Standardprotokoll für alle Proteine handelte, enthielten die Elutionsfraktionen teilweise erhebliche Mengen an Verunreinigungen mit unspezifisch bindenden Proteinen. Eine relativ dominante Proteinbande bei ca. 20 kDa wurde jedoch in allen 80 Anreicherungen gefunden. Um das dazugehörige Protein zu identifizieren, wurde die Bande aus dem Gel der SDS-PAGE (Abbildung 5.14) ausgeschnitten und für die Analyse mit MALDI-TOF/TOF-MS vorbereitet. Zur Kontrolle der Methode wurde auch die Proteinbande des angereicherten Zielproteins (in diesem Fall MetF bei ca. 33 kDa) ausgeschnitten und ebenfalls mittels MS analysiert. Das Protein wurde zunächst aus dem Gel extrahiert und tryptisch verdaut. Die Messung der Peptidfragmente im Massenspektrometer sowie die Auswertung über die MASCOT-Datenbank wurde von Dipl.-Ing. (FH) Bogdan Munteanu am Institut für instrumentelle Analytik und Bioanalytik der Hochschule Mannheim durchgeführt. Im Massenspektrometer wurden die Massen der verschiedenen Peptidfragmente bestimmt. Über die Datenbank

MASCOT konnten sie anschließend mit den Fragmenten eines theoretischen Trypsinverdaus des *E. coli*-Proteoms verglichen werden (Peptidmassen-Fingerprint-Analyse). Als Ergebnis werden wie etwa bei einem BLAST die Proteine mit den größten Übereinstimmungen angezeigt. Den Proteinen wird ein Score zugewiesen, der angibt, wie hoch die Wahrscheinlichkeit ist, dass es sich um einen signifikanten Treffer handelt. Ab einem Score von 56 wird von einem signifikanten Treffer gesprochen. Die 33 kDa Proteinbande konnte mit einem Score von 111 und einer Sequenzabdeckung von 88 % als 5,10-Methylentetrahydrofolat-Reduktase MetF (EC 1.7.99.5) identifiziert werden (Abbildung 5.15). Das unbekannte Protein wurde mit einem Score von 92 und einer Sequenzabdeckung von 49 % als Chloramphenicol-Acetyltransferase (EC 2.3.1.28) identifiziert (Abbildung 5.16). Es handelt sich folglich um das Genprodukt des auf dem Expressionsplasmid pCA24N enthaltenen Chloramphenicolresistenzgens. Dieses Enzym bindet keine Flavine als Cofaktor, verzerrt aber die gemessene Proteinkonzentration und verhindert damit Aussagen über die Cofaktorsättigung des Versuchs. Da die Bande nicht in allen Reinigungen die gleiche Intensität hatte, ist der Grad der Verunreinigung zwischen den Ansätzen nicht vergleichbar.



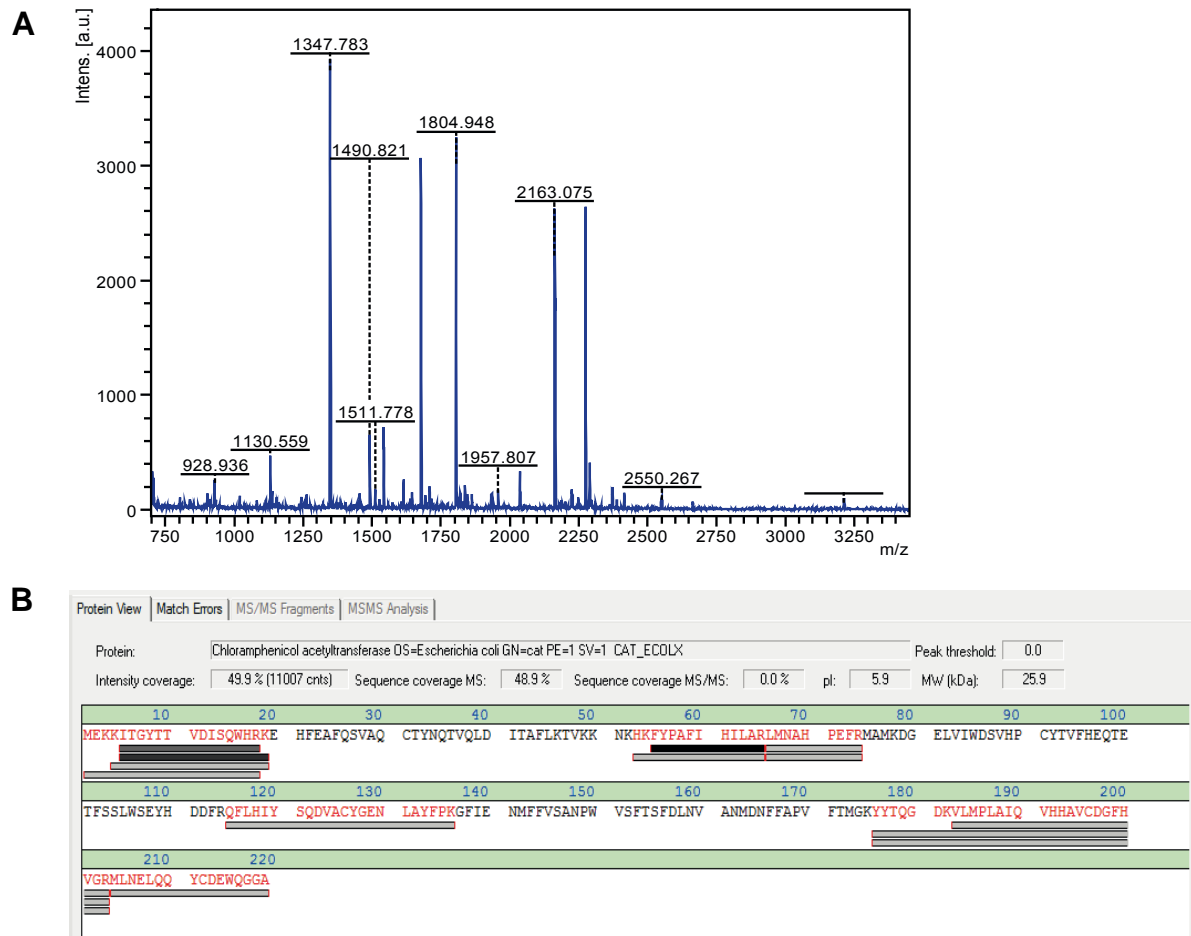
**Abbildung 5.14: Proteinbanden der SDS-PAGE für die Proteinanalyse mit MALDI-TOF MS/MS.**

In der SDS-PAGE der angereicherten Flavoproteine fand sich immer ein unbekanntes Protein mit einer Größe von ca. 20 kDa. Die Bande wurde ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie analysiert. Die Abbildung zeigt die Elutionsfraktion der Affinitätsreinigung von MetF (1), die markierten Banden wurden für die MS/MS verwendet. Die Bande des Zielproteins MetF diente als Kontrolle und wurde als MetF erkannt. Die unbekannte Bande wurde als Chloramphenicol-Acetyltransferase identifiziert.



**Abbildung 5.15: Ergebnis der MS-Analyse der putativen MetF-Bande.**

Massenspektrum der Peptidfragmente nach dem tryptischen Verdau der Proteinbande (A). Die Peptidfragmente wurden über die MASCOT-Datenbank mit den theoretischen Peptidfragmenten eines Trypsinverdau des *E. coli*-Proteoms verglichen. Mit einem Score von 111 und einer Sequenzabdeckung von 88 % wurde die Proteinbande als 5,10-Methylenetetrahydrofolat-Reduktase identifiziert (B).



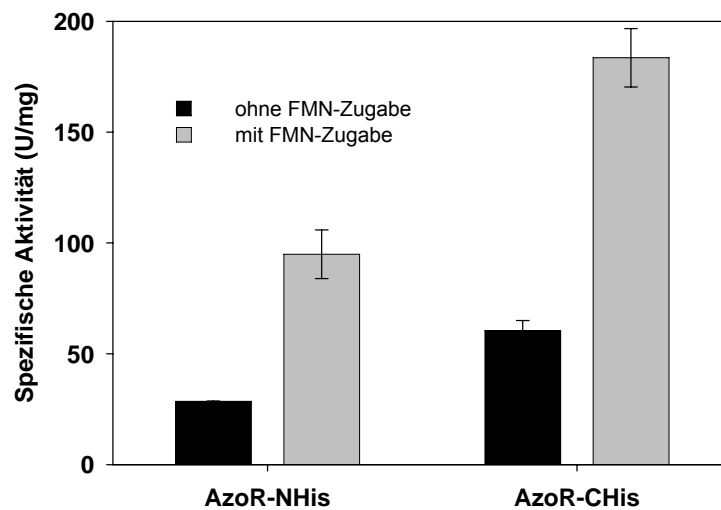
**Abbildung 5.16: Ergebnis der MS-Analyse der unbekanntem Proteinbande.**

Massenspektrum der Peptidfragmente nach dem tryptischen Verdau der Proteinbande (A). Die Peptidfragmente wurden über die MASCOT-Datenbank mit den theoretischen Peptidfragmenten eines Trypsinverdau des *E. coli*-Proteoms verglichen. Mit einem Score von 92 und einer Sequenzabdeckung von 49 % wurde die Proteinbande als Chloramphenicol-Acetyltransferase identifiziert (B).

## 5.5 Charakterisierung des Flavoproteins Azobenzolreduktase aus *E. coli*

In Kapitel 5.4 wurde bereits gezeigt, dass Flavoenzyme die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD binden. Um zu zeigen, dass Flavoenzyme mit Cofaktoranaloga eine veränderte Aktivität haben und dies ein möglicher Grund für die antibiotische Wirkung von Roseoflavin darstellt, wurde beispielhaft die FMN-abhängige Azobenzolreduktase AzoR (EC 1.7.1.6) aus *E. coli* genauer untersucht. AzoR spaltet Azobindungen (N=N) mit NADH als Elektronendonator. In einem Ping-Pong-Mechanismus wird beispielsweise 1 Mol der Azoverbindung Methylrot unter Verwendung von 2 Mol NADH in 2-Aminobenzoessäure und *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylendiamin gespalten. Die Rolle von AzoR in der Zelle ist weitgehend unklar. Deletionsmutanten zeigen in LB-Medium keinen Wachstumsunterschied im Vergleich zum Wildtyp. Nach der Behandlung mit Benzoquinonen wächst die Deletionsmutante jedoch schlechter. Daher wird AzoR eine Rolle in der Abwehr thioispezifischen Stresses, hervorgerufen durch die Anreicherung elektrophiler Quinone, zugeschrieben (Liu et al. 2009). Für eine wichtige Rolle von AzoR spricht auch, dass es in vielen Organismen homologe Proteine gibt. So wurden in *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Photobacterium luminescens*, *Vibrio vulnificus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas putida* AzoR-Homologe beschrieben (Ito et al. 2006). Auch in *S. cerevisiae* (Lot6p, YLR011wp) und Säugern (NADPH-abhängige Quinon-Oxidoreduktase) wurden Proteine mit Azoreduktaseaktivität gefunden (Ryan et al. 2010).

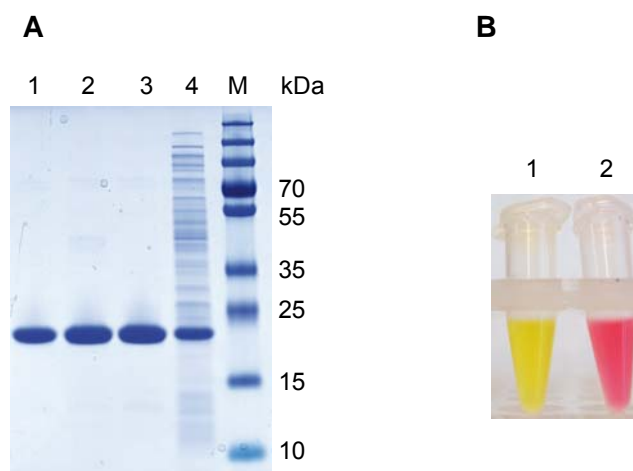
Für die Untersuchung von AzoR wurde das Gen *azoR* aus *E. coli* mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in pET24a(+) kloniert (pET24a-azoRCHis). Außerdem wurde das Plasmid pCA24N-azoR verwendet, mit dem eine AzoR-Version mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag exprimiert wurde. Zunächst wurden die beiden Versionen AzoR-CHis und AzoR-NHis auf ihre Aktivität hin untersucht. Für die Aktivitätsmessung wurde ein Enzymtest mit Methylrot als Substrat verwendet. Sowohl bei AzoR-NHis als auch bei AzoR-CHis konnte die Aktivität durch die zusätzliche Zugabe von 10 µM FMN deutlich gesteigert werden. Dabei zeigte sich, dass AzoR-CHis (183,5 ± 13,2 U/mg) die in der Literatur beschriebene Aktivität (189 U/mg) aufwies (Nakanishi et al. 2001). AzoR-NHis hatte eine geringere Aktivität (94,9 ± 11,0 U/mg) und wurde deswegen in den folgenden Experimenten nicht weiter verwendet (Abbildung 5.17).



**Abbildung 5.17: Aktivität von AzoR mit N- bzw. C-terminalem His-tag.**

Die Aktivität von AzoR wurde im Aktivitätstest mit Methylrot als Substrat in Dreifachbestimmung gemessen. Beide AzoR-Versionen zeigen ohne FMN-Zugabe eine geringere Aktivität als die, in der Literatur für AzoR (ohne His-tag) beschriebene Aktivität. Nach FMN-Zugabe erreicht AzoR-CHis ( $183,5 \pm 13,2$  U/mg) die in der Literatur beschriebene Aktivität (189 U/mg) und wurde aus diesem Grund für alle weiteren Experimente eingesetzt.

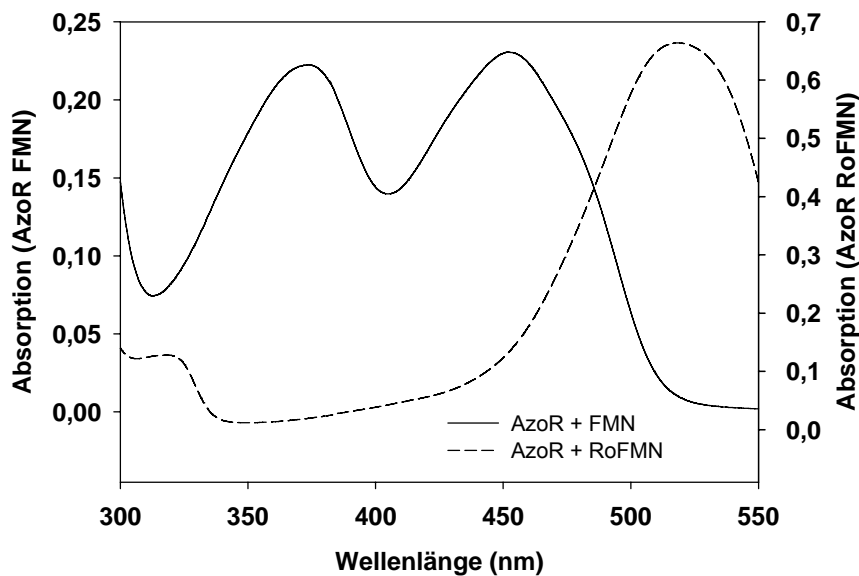
Um die Aktivität von AzoR mit analogem Cofaktor zu testen, wurde AzoR-CHis in *E. coli* CpXFMN exprimiert. Zum Zeitpunkt der Induktion ( $OD_{600} = 0,5$ ) wurden 50  $\mu$ M Riboflavin bzw. Roseoflavin zugegeben, um AzoR-CHis mit FMN bzw. RoFMN *in vivo* zu produzieren. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen geerntet, aufgeschlossen und AzoR an der Äkta mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Anschließend wurde das gereinigte Protein (Abbildung 5.18) im Aktivitätstest eingesetzt.



**Abbildung 5.18: AzoR Reinigung.**

(A) SDS-Gel der AzoR-Reinigung: Aufgetragen wurden jeweils 150 ng Protein des Proteinrohextrakts (Bahn 4), des gereinigten AzoR nach der Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie (Bahn 3) sowie nach *in vitro* Beladung mit Cofaktor und anschließender Größenausschlusschromatographie beladen mit FMN bzw. RoFMN (Bahn 1 und 2). (B) Gereinigtes AzoR *in vitro* beladen mit FMN (1) bzw. RoFMN (2).

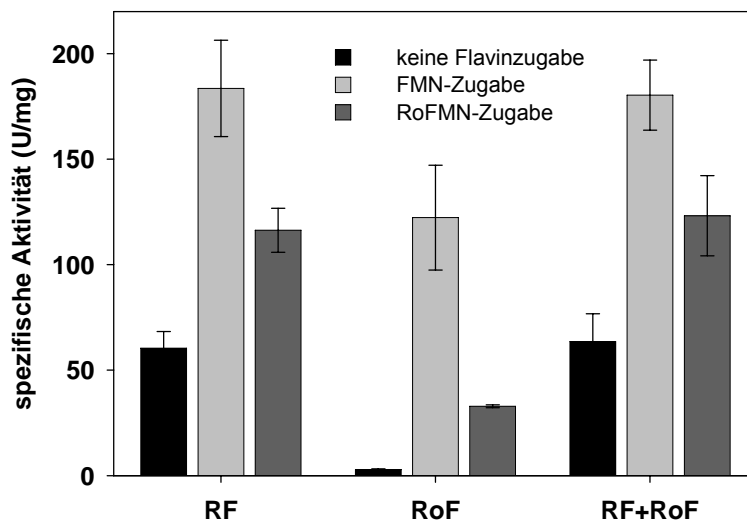




**Abbildung 5.19: Absorptionsspektren von *in vitro* mit Cofaktor beladenem AzoR-CHis.**

AzoR-CHis-FMN zeigt die für Riboflavin, FMN und FAD typischen Maxima bei 360 und 450 nm. AzoR-CHis-RoFMN zeigt dagegen das für Roseoflavin, RoFMN und RoFAD typische Maximum bei 503 nm. Die Spektren wurden mit einem Beckmann Photometer im Bereich zwischen 300 und 550 nm aufgenommen. Die Proteinkonzentration der Proben betrug 0,05 mg/mL.

Die Ergebnisse (Abbildung 5.20) zeigen, dass AzoR-CHis-RF, das mit FMN beladen ist, aktiver ist als mit RoFMN beladenes AzoR-CHis-RoF ( $60,4 \pm 4,6$  U/mg bzw.  $2,9 \pm 0,2$  U/mg). Um die Menge an Cofaktor zu bestimmen, wurde eine Probe von AzoR-CHis-RF bzw. -RoF durch Zugabe von 1 % TCA denaturiert und der Überstand in der HPLC vermessen. Dabei zeigte sich, dass sowohl bei der Expression mit Riboflavin als auch bei der Expression mit Roseoflavin die Beladung mit Cofaktor nicht vollständig war ( $152 \mu\text{M}$  FMN/ $370 \mu\text{M}$  Protein bzw.  $3,79 \mu\text{M}$  RoFMN/ $160 \mu\text{M}$  Protein). Durch Zugabe von FMN im Aktivitätstest konnte die Aktivität gesteigert werden, da nicht beladenes AzoR hierdurch mit Cofaktor versorgt wurde. AzoR-CHis-RF erreichte so eine Aktivität von  $183,5 \pm 13,2$  U/mg, AzoR-CHis-RoF eine Aktivität von  $122,3 \pm 14,3$  U/mg. RoFMN konnte die Aktivität nicht in diesem Maße steigern ( $116,3 \pm 6,0$  U/mg für AzoR-CHis-RF bzw.  $32,9 \pm 0,4$  U/mg für AzoR-CHis-RoF). Wurde AzoR-CHis in Gegenwart einer Mischung von Riboflavin und Roseoflavin exprimiert, wurden ähnliche Aktivitäten wie für AzoR-CHis-RF gemessen ( $63,6 \pm 5,0$  U/mg). Die Aktivität konnte durch die Zugabe von FMN ebenfalls gesteigert werden ( $180,4 \pm 6,8$  U/mg). RoFMN steigerte die Aktivität in deutlich geringerem Maß ( $123,2 \pm 7,7$  U/mg). Die Messung des Flavingehalts von AzoR-CHis-RF+RoF ergab  $136 \mu\text{M}$  FMN und  $31 \mu\text{M}$  RoFMN pro  $260 \mu\text{M}$  Protein.

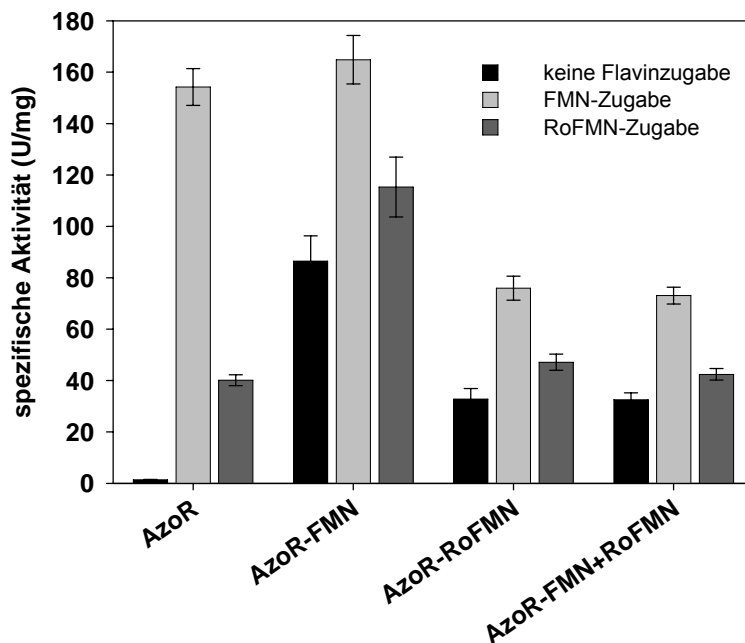


**Abbildung 5.20: Aktivität von *in vivo* mit Cofaktor beladenem AzoR-CHis.**

Auf der x-Achse ist angegeben, welches Flavin bzw. welche Flavine während der Expression von AzoR-CHis zum Medium zugegeben wurden. Die y-Achse gibt die Aktivität in U/mg ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) für Aktivitätstests ohne zusätzliche Flavinzugabe bzw. mit FMN- bzw. RoFMN-Zugabe an. Die Aktivitätsmessung wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichungen sind angegeben.

Durch die Beladung von AzoR-CHis mit Cofaktor *in vitro* sollte vollständig beladenes Enzym hergestellt werden. Dazu wurde zunächst Apoenzym produziert, indem während der Expression von pET24a-AzoRCHis in *E. coli* CpXFMN kein Flavin zum Medium zugegeben wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen der stationären Phase geerntet, gewaschen und mit der French Press aufgeschlossen. Mittels HPLC konnte gezeigt werden, dass auf diese Weise mit Affinitätschromatographie gereinigtes AzoR-CHis nur geringe Mengen FMN gebunden hat ( $2,7 \mu\text{M FMN}/360 \mu\text{M AzoR}$ ). Das Enzym wurde anschließend im Verhältnis 1:100 mit den Cofaktoren FMN oder RoFMN für eine Stunde inkubiert. Nicht gebundene Flavine wurden mittels Größenausschlusschromatographie an der Äkta abgetrennt. Die Analyse der Cofaktoren in der HPLC zeigte, dass AzoR-CHis zu einem großen Teil mit Cofaktor beladen war ( $38 \mu\text{M FMN}/47 \mu\text{M AzoR}$  bzw.  $43 \mu\text{M RoFMN}/45 \mu\text{M AzoR}$ ). Der Aktivitätstest zeigte ebenfalls höhere Aktivitäten im Vergleich zu *in vivo* beladenem AzoR-CHis, was auf eine bessere Beladung des Enzyms mit Cofaktor zurückzuführen ist (Abbildung 5.21). AzoR-CHis-FMN hatte eine Aktivität von  $86,4 \pm 3,5 \text{ U/mg}$ , welche sich durch Zugabe von  $10 \mu\text{M FMN}$  im Enzymtest auf  $164,9 \pm 3,6 \text{ U/mg}$  steigern ließ. AzoR-CHis-RoFMN hatte eine Aktivität von  $32,8 \pm 1,7 \text{ U/mg}$ , die sich durch FMN-Zugabe auf  $75,9 \pm 1,9 \text{ U/mg}$  steigern ließ, während die Zugabe von RoFMN die Aktivität nicht in diesem Maße steigerte. Wurde AzoR-CHis mit einer Mischung aus FMN und RoFMN inkubiert, konnte anschließend eine Aktivität von

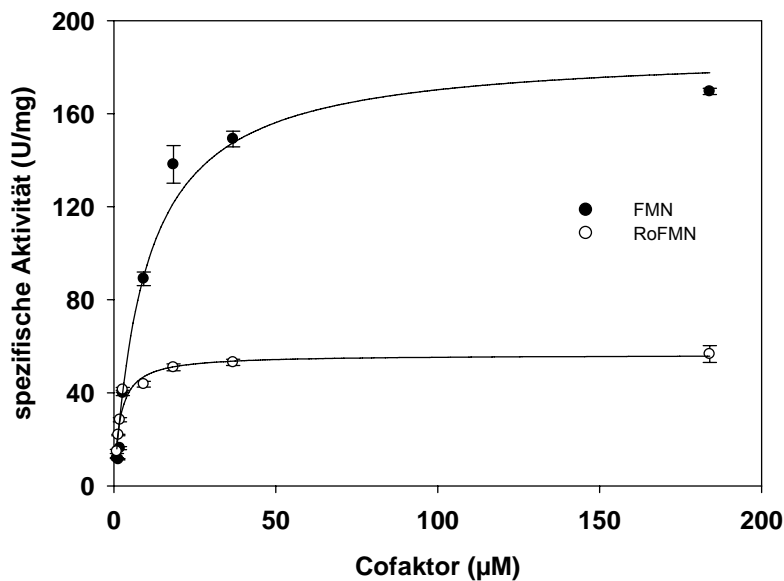
$32,6 \pm 1,9$  U/mg gemessen werden, die durch FMN-Zugabe auf  $73,1 \pm 2,3$  U/mg stieg. RoFMN konnte die Aktivität nur leicht erhöhen ( $42,4 \pm 1,6$  U/mg). Die Analyse der gebundenen Cofaktoren in der HPLC ergab einen deutlich höheren Anteil an RoFMN gegenüber FMN ( $75 \mu\text{M}$  RoFMN und  $15 \mu\text{M}$  FMN pro  $60 \mu\text{M}$  AzoR).



**Abbildung 5.21: Aktivität von *in vitro* mit Cofaktor beladenem AzoR-CHis.**

Auf der x-Achse ist angegeben, mit welchem Cofaktor AzoR-CHis beladen wurde. Die y-Achse gibt die Aktivität in U/mg ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) für den Standardaktivitätstest ohne zusätzliche Flavinzugabe bzw. mit FMN- bzw. RoFMN-Zugabe an. Die Aktivitätsmessung wurde in Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichungen sind angegeben.

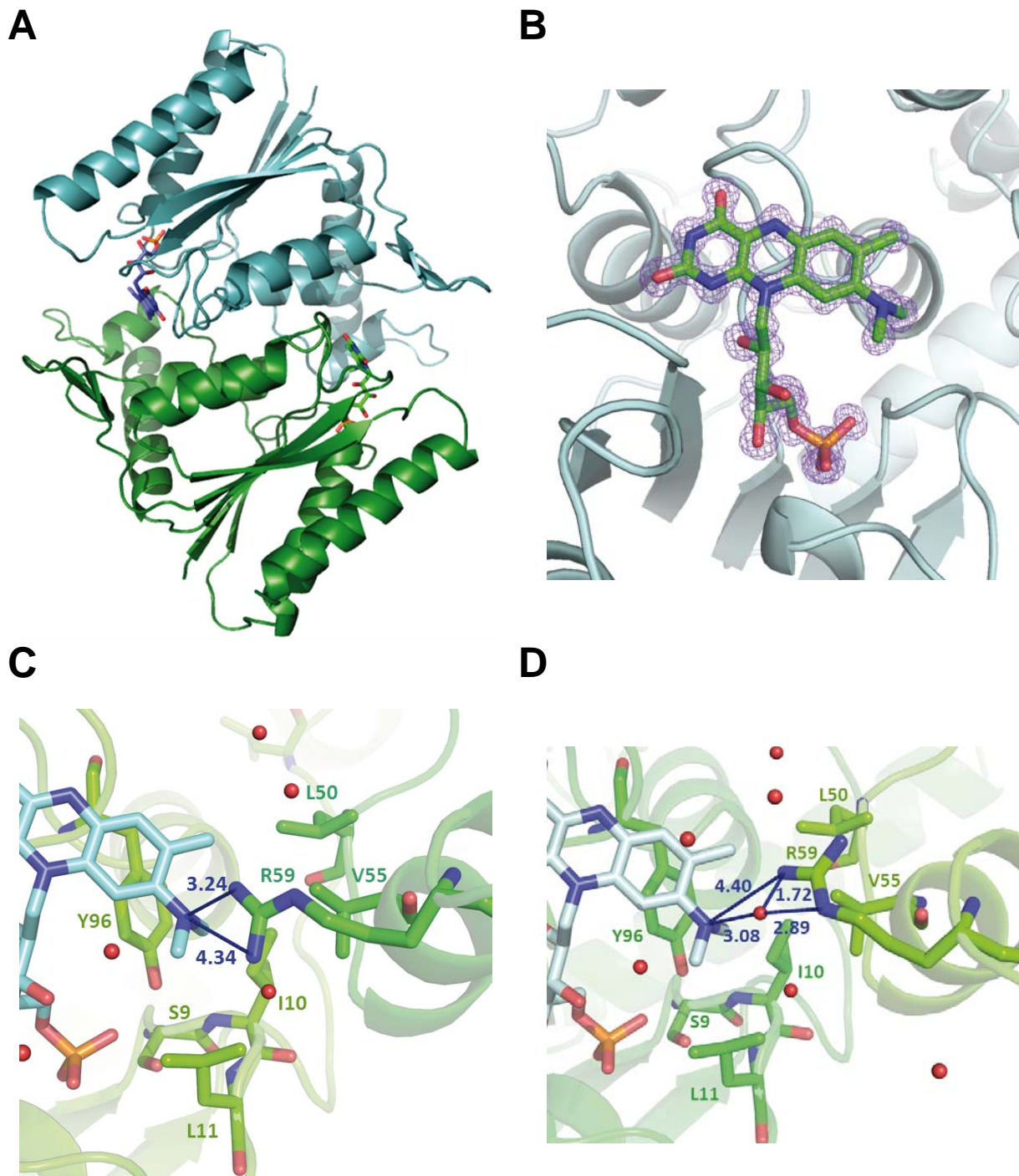
Durch ein Titrationsexperiment sollte geklärt werden, ob AzoR-CHis eine höhere Affinität zu RoFMN als zu FMN hat, was die Ergebnisse der *in vitro* Beladung vermuten ließen. Dazu wurde AzoR-Apoenzym im Aktivitätstest mit verschiedenen Konzentrationen FMN und RoFMN eingesetzt ( $1\text{-}180 \mu\text{M}$ ). Die Datenpunkte folgen einer Michaelis-Menten-Kinetik. Die Bestimmung der Affinitätskonstante  $K_d$  und der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  erfolgten mittels nicht-linearer Regression in SigmaPlot. Es zeigte sich, dass beide Cofaktoren eine hohe Affinität zu AzoR-CHis haben. Die Affinität zu RoFMN ( $K_d = 1,8 \mu\text{M}$ ) war im Vergleich zu FMN ( $K_d = 9,9 \mu\text{M}$ ) etwas höher (Abbildung 5.22). Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  betrug  $56 \text{ U/mg}$  für AzoR mit RoFMN bzw.  $187 \text{ U/mg}$  für AzoR mit FMN.



**Abbildung 5.22: Bestimmung der Affinitätskonstanten  $K_d$  für Azor mit FMN und RoFMN.**

Gereinigtes Apoprotein Azor wurde mit verschiedenen Konzentrationen FMN bzw. RoFMN gemischt und die Aktivität gemessen. Die gemessene spezifische Aktivität in U/mg ( $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) wurde gegen die eingesetzte Cofaktorkonzentration aufgetragen. Die Datenpunkte wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt und die Standardabweichung ist angegeben. Die Kurve folgt einer Michaelis-Menten-Gleichung und wurde mit Sigma-Plot ermittelt. Die Werte für die Affinitätskonstante  $K_d$  betragen  $9,9 \mu\text{M}$  für FMN und  $1,8 \mu\text{M}$  für RoFMN.

Als Grund für die geringere Aktivität erschien eine schlechtere Bindung an das Enzym daher unwahrscheinlich. Durch die Bindung von RoFMN an Azor-CHis könnte es aber zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des Enzyms gekommen sein. Daher wurde eine Probe von Azor-CHis-RoFMN kristallisiert. Dieses Experiment wurde am Department of Applied Biological Chemistry (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, University of Tokyo) von Tomoko Mase, Takuya Miyakawa und Masaru Tanokura durchgeführt. Die Arbeitsgruppe von Masaru Tanokura beschäftigte sich in der Vergangenheit mit Azor aus *E. coli* und hatte bereits die Kristallstruktur von Azor publiziert (Ito et al. 2006). Apoenzym von Azor-CHis wurde *in vitro* mit RoFMN beladen und über Größenausschlusschromatographie von freien Flavinen und Imidazol getrennt. Anschließend wurde es nach Japan versandt und dort wie in Ito et al. (2006) beschrieben kristallisiert. Die Kristallstruktur von Azor-CHis-RoFMN wurde in einer Auflösung von  $1,07 \text{ \AA}$  bestimmt und mit der schon beschriebenen Struktur von Azor in Komplex mit FMN verglichen (Ito et al. 2006; Ito et al. 2008). Die Kristallstruktur zeigt, dass RoFMN die Dimerisierung des Proteins nicht beeinflusst und sich durch die Bindung nur geringe Strukturunterschiede ergeben (Abbildung 5.23 A).



**Abbildung 5.23: Kristallstruktur von AzoR-RoFMN.**

(A) AzoR-RoFMN bildet ein Dimer und bindet zwei Moleküle RoFMN. (B) Der analoge Cofaktor RoFMN passt in die FMN-Bindetasche des Proteins. AzoR-RoFMN bildet ein asymmetrisches Dimer aus AzoR-RoFMN1 (C) und AzoR-RoFMN2 (D). In AzoR-RoFMN1 ist die Aminogruppe R59 anders orientiert und bietet Platz für ein Wassermolekül (rot), das in AzoR-RoFMN2 und AzoR-FMN nicht vorhanden ist.

RoFMN passt in die FMN-Bindetasche, wobei durch Dimethylaminogruppe am C(8) hydrophobe Wechselwirkungen mit I10, L11, L50, V55 und eventuell R59 möglich sind (Abbildung 5.23 B). Für AzoR mit FMN als Cofaktor wurden keine Enzyminteraktionen an der Methylgruppe des C(8) beschrieben (Ito et al. 2006). Im Gegensatz zu AzoR-FMN besteht das

Dimer von AzoR-RoFMN aus zwei asymmetrischen Einheiten. Die beiden Protomere AzoR-RoFMN1 und AzoR-RoFMN2 unterscheiden sich in ihrer Orientierung von R59. In AzoR-RoFMN1 wurde ein Wassermolekül zwischen R59 und der Dimethylaminogruppe am C(8) gefunden, das in AzoR-FMN und AzoR-RoFMN2 nicht vorhanden ist (Abbildung 5.23 C und D). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Aminogruppe R59 bei AzoR-RoFMN2 näher an der Dimethylaminogruppe ist als bei AzoR-RoFMN1.

Als weitere Anhaltspunkte für die unterschiedlichen Eigenschaften von AzoR-FMN und AzoR-RoFMN wurden die kinetischen Parameter der Reaktion mit Methylrot und NADH bestimmt. Für die Bestimmung der  $K_m$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/K_m$ -Werte für Methylrot wurde der Enzymtest mit einer konstanten Konzentration von NADH (400  $\mu\text{M}$ ) und Methylrotkonzentrationen zwischen 10 und 150  $\mu\text{M}$  durchgeführt. Entsprechend wurden für die Bestimmung der kinetischen Parameter von NADH eine konstante Konzentration von Methylrot (100  $\mu\text{M}$ ) und variierende NADH-Konzentrationen eingesetzt (100 bis 1000  $\mu\text{M}$ ). Die ermittelten spezifischen Aktivitäten wurden gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen und die Kurven mittels nicht-linearer Regression in SigmaPlot angepasst. In Tabelle 5.3 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich, dass die  $K_m$ -Werte für NADH für beide AzoR-Varianten annähernd gleich sind. Für Methylrot dagegen ergeben sich deutliche Unterschiede. Der  $K_m$ -Wert von AzoR-RoFMN ist mit 2  $\mu\text{M}$  um 93 % geringer als der  $K_m$ -Wert von AzoR-FMN (27  $\mu\text{M}$ ). Insgesamt ergab sich durch die reduzierte Aktivität von AzoR-RoFMN zwar eine schlechtere Wechselzahl  $k_{cat}$  (12  $\text{s}^{-1}$ ), durch den geringeren  $K_m$ -Wert ist die Effizienz der Reaktion jedoch doppelt so hoch wie für AzoR-FMN ( $k_{cat}/K_m$  6 bzw. 3  $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ ). Bei der Reaktion von NADH ergaben sich für AzoR-RoFMN aber schlechtere Werte als für AzoR-FMN. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit für AzoR-RoFMN war mit 45 U/mg gegenüber 277 U/mg für AzoR-FMN deutlich geringer. Durch die ähnlichen  $K_m$ -Werte ergaben sich dadurch für AzoR-RoFMN um 84 % reduzierte Werte für  $k_{cat}$  bzw.  $k_{cat}/K_m$ . Die Bindung des Cofaktoranalogs RoFMN hat demnach vermutlich Auswirkungen auf die Struktur und damit die katalytischen Eigenschaften von AzoR und muss für die Begründung der reduzierten Enzymaktivität berücksichtigt werden.

Tabelle 5.3: Kinetische Parameter für die Reaktion von AzoR mit Methylrot und NADH.

	$V_{\max}^{\text{Methylrot}}$ (U/mg)	$K_m^{\text{Methylrot}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ (1/s)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )	$V_{\max}^{\text{NADH}}$ (U/mg)	$K_m^{\text{NADH}}$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ (1/s)	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
AzoR-FMN	211	27	76	3	277	260	100	0,38
AzoR-RoFMN	32	2	12	6	45	269	16	0,06

Im Gegensatz zu FMN besitzt RoFMN eine Dimethylaminogruppe am C(8). Es wurde daher vermutet, dass RoFMN durch pH-Wert-Änderungen auf andere Weise beeinflusst wird als FMN. Für die Bestimmung des pH-Optimums wurde Anthrachinon-2-sulfonsäure als Substrat verwendet, da Methylrot bei niedrigem pH-Wert ausfällt. Als Puffersystem dienten die Puffer von McIlvaine im pH-Bereich von 3,5 bis 8,0. Die Aktivität von AzoR-FMN war mit maximal 23,4 U/mg deutlich höher als die von AzoR-RoFMN mit 1,7 U/mg. In Abbildung 5.24 sind die spezifischen Aktivitäten daher prozentual zur jeweiligen maximalen Aktivität dargestellt. Die Anpassung der Kurven erfolgte mittels nicht-linearer Regression in SigmaPlot und die damit ermittelten Werte für das pH-Optimum liegen bei pH 6,3 (AzoR-FMN) und pH 6,9 (AzoR-RoFMN). Die Aktivitätsabnahme im sauren pH war bei beiden AzoR-Formen ähnlich. Im basischen pH-Bereich verlor AzoR-RoFMN aber weniger stark an Aktivität als AzoR-FMN.

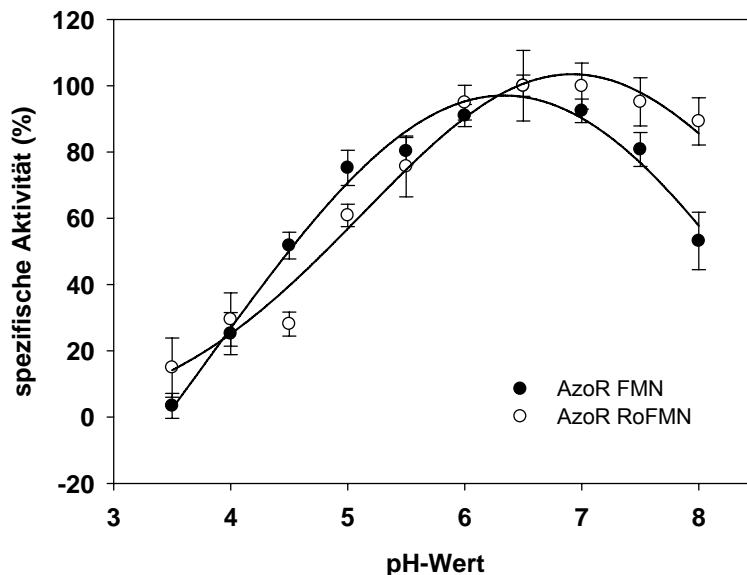


Abbildung 5.24: pH-Abhängigkeit der AzoR-Aktivität.

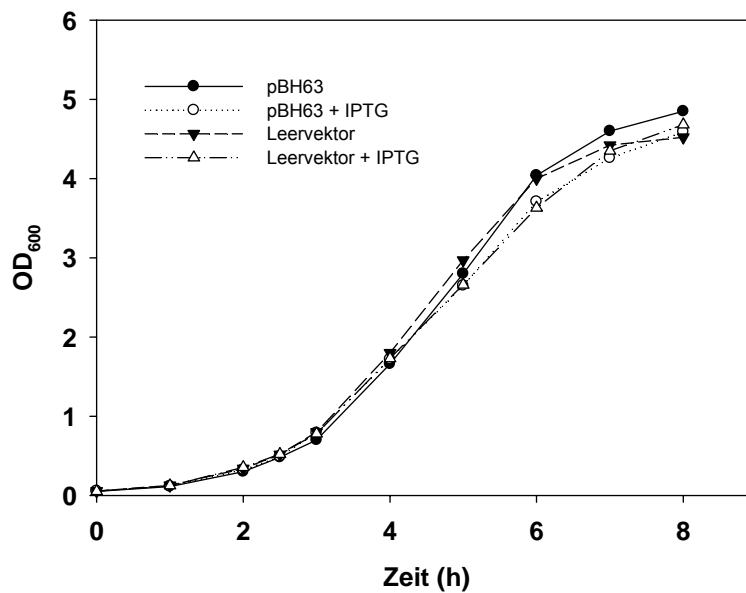
Die Aktivität von *in vitro* mit FMN bzw. RoFMN beladenem AzoR mit Anthrachinon-2-sulfonsäure als Substrat wurde bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Da die Aktivität von AzoR-RoFMN (max. 1,7 U/mg) deutlich geringer ist als die von AzoR-FMN (23,4 U/mg), wurden die Ergebnisse prozentual dargestellt. Für jeden Datenpunkt wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt und die Standardabweichung ist angegeben. Das pH-Optimum von AzoR-RoFMN ist leicht in den basischen pH-Bereich verschoben.

Ein möglicher Grund für die niedrigere Aktivität von AzoR-RoFMN könnte im veränderten Redoxpotential liegen (Walsh et al. 1978). Die Messung des Redoxpotentials der freien und der AzoR-gebundenen Flavine erfolgte nach der "dye equilibration"-Methode von Dr. Alexandra Binter an der TU Graz (Massey 1991). Das Redoxpotential für proteingebundenes FMN betrug -145 mV (ungebunden -207 mV) und -223 mV für proteingebundenes RoFMN (ungebunden -246 mV). Der Unterschied im Redoxpotential von 80 mV könnte ebenfalls eine Rolle für die reduzierte Aktivität von AzoR-RoFMN gegenüber AzoR-FMN spielen. Die Ergebnisse zu AzoR wurden unter Langer et al. (2013) veröffentlicht.

## 5.6 Charakterisierung des Riboswitches *sroG* aus *E. coli*

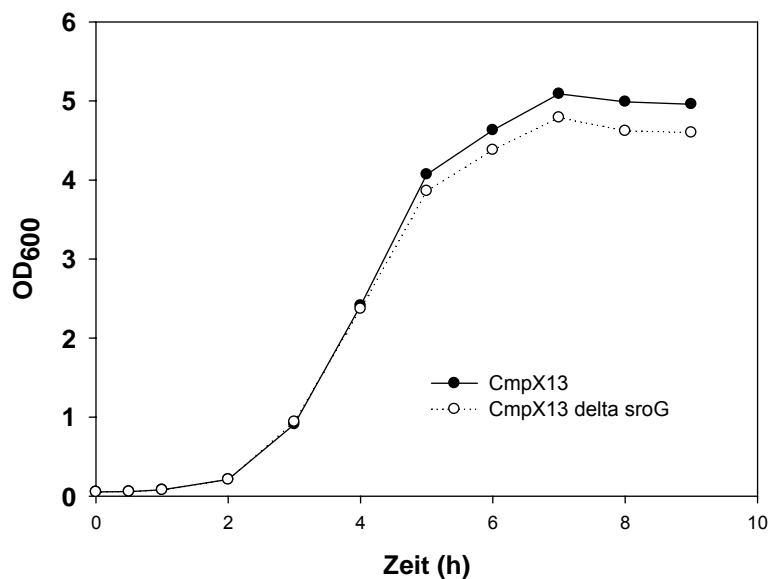
In der Literatur werden neben den bereits erwähnten Flavoproteinen auch FMN-Riboswitches als Zielstrukturen für Flavinanaloga genannt. *E. coli* besitzt nur einen FMN-abhängigen Riboswitch vor dem Gen für die 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase *ribB*. Dieses regulatorische Element wird *sroG* genannt. Das Gen *ribB* ist Teil der Riboflavinbiosynthese in *E. coli*. Eine Überproduktion von *ribB* in *E. coli* mit Hilfe des Plasmids pBH63 (pNCO113-*ribB* aus *E. coli* BL21 DE3 [2AS D]) führte zu einer erhöhten Produktion von Riboflavin und dessen Ausscheiden in das Medium. Der Kulturüberstand wurde mit 1 % TCA denaturiert und der Riboflavinegehalt in der HPLC gemessen. Im Kulturüberstand des induzierten Stammes wurde im Vergleich zu Kulturen, die das Leerplasmid trugen, eine 2,5-fach höhere Riboflavinkonzentration gemessen ( $3,35 \mu\text{M} \pm 0,27$  bzw.  $1,34 \mu\text{M} \pm 0,02$ ). Zwischen den induzierten und nicht induzierten Ansätzen zeigte sich kein Unterschied in der Riboflavinkonzentration des Überstandes. Da pNCO113 keinen lac-Repressor besitzt, ist das Plasmid vermutlich "leaky", d.h. auch in nicht induziertem Zustand wird *ribB* exprimiert. In einer Deletionsmutante von *E. coli* CmpX13, in der *sroG* entfernt wurde (*E. coli* CmpX13  $\Delta$ sroG), erhöhte sich die Riboflavinkonzentration im Medium um den Faktor 2,9 ( $3,53 \mu\text{M} \pm 0,45$  bzw.  $1,22 \mu\text{M} \pm 0,17$ ). Die Riboflavinbiosynthese scheint in beiden Fällen dereguliert zu sein, was jedoch keinen Einfluss auf das Wachstum hatte (Abbildung 5.25 und Abbildung 5.26).





**Abbildung 5.25: Wachstumskurve von *E. coli* CmpX13 + pBH63 bzw. + pNCO113 in LB low salt.**

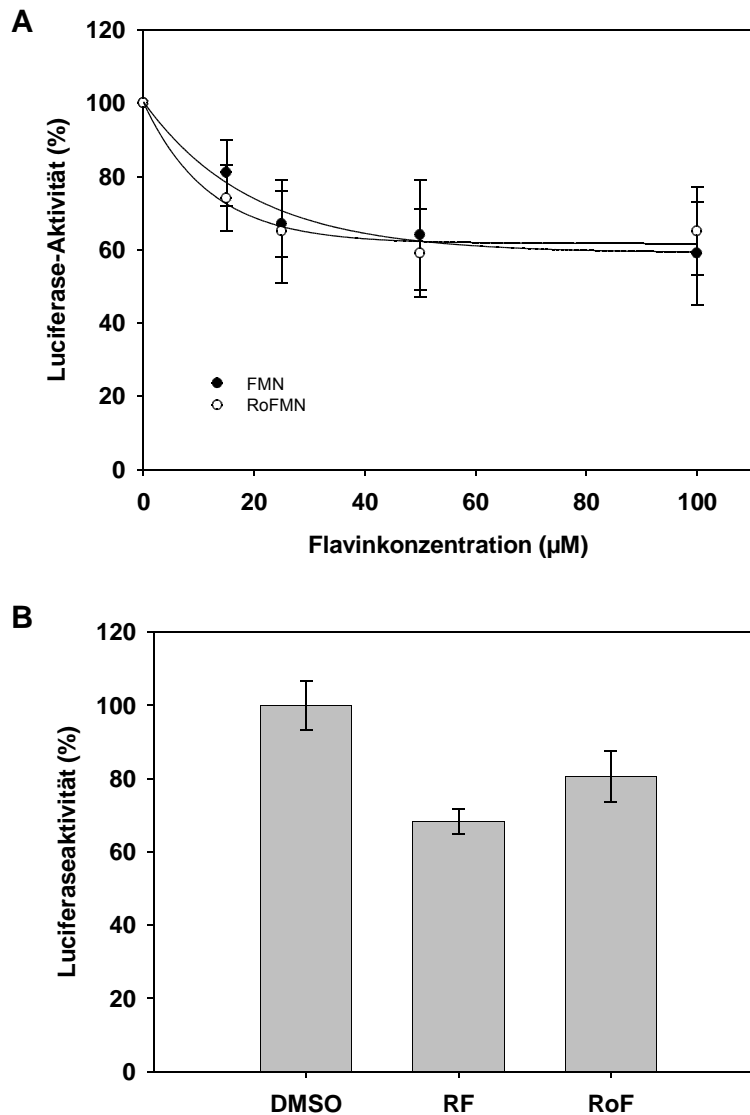
Die beiden Stämme unterscheiden sich in ihrem Wachstum kaum, produzieren aber unterschiedliche Mengen Riboflavin, die sie in das Medium abgeben. *E. coli* CmpX13 + pBH63 überexprimiert *ribB* und gibt mehr Riboflavin in das Medium ab (3,35  $\mu\text{M} \pm 0,27$ ) als der Stamm, der das Leerplasmid pNCO113 enthält (1,34  $\mu\text{M} \pm 0,02$ ).



**Abbildung 5.26: Wachstumskurve von *E. coli* CmpX13 und *E. coli* CmpX13  $\Delta$ sroG in LB-Medium.**

Die beiden Stämme unterscheiden sich in ihrem Wachstum in LB-Medium (37 °C, 220 rpm) kaum. In *E. coli* CmpX13  $\Delta$ sroG scheint die Riboflavinbiosynthese durch das Entfernen des putativen Riboswitches vor *ribB* dereguliert zu sein. Im Kulturüberstand dieses Stammes wurde 2,9-mal mehr Riboflavin gemessen als im Vergleichsstamm *E. coli* CmpX13 mit Riboswitch (3,53  $\mu\text{M} \pm 0,45$  bzw. 1,22  $\mu\text{M} \pm 0,17$ ).

Die Untersuchung der regulatorischen Eigenschaften von *sroG* erfolgte mit einem *in vitro* Transkriptions-/Translationstest. Das Plasmid pT7luc<sup>mod</sup>-*sroG* trägt das Reporter-gen Firefly Luciferase (*luc*) unter Kontrolle eines IPTG-induzierbaren T7-Promotors. Zwischen Promotor und Reporter-gen wurde der Riboswitch *sroG* kloniert. Im TR/TL-Test reguliert er damit die Expression des Reporter-gens. Durch Zugabe von FMN und RoFMN konnte die Abnahme der Luciferaseaktivität im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle bestimmt werden. Die Ergebnisse zeigen, dass die Zugabe von FMN und RoFMN die Expression der Luciferase und damit deren Aktivität im Leuchtttest etwa im gleichen Maße hemmen. Schon relativ geringe Mengen (15  $\mu\text{M}$ ) reichen aus, um eine Hemmung zu erzeugen. Die maximale Aktivitätsabnahme von ca. 40 % ist bereits ab einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  erreicht (Abbildung 5.27 A). Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde das Plasmid pT7luc<sup>mod</sup>-*sroG* auch für einen *in vivo* Test benutzt. Dabei wurde der Stamm *E. coli* CpXFAD mit dem Plasmid transformiert. Der Stamm kann selbst kein Riboflavin produzieren. Das dem Medium zugegebene Flavin ist deswegen die Hauptquelle für die Produktion von Flavincofaktoren. Der Stamm wurde kultiviert und die Expression des Reporter-gens durch Zugabe von 1 mM IPTG und gleichzeitiger Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Riboflavin oder Roseoflavin gestartet. Nach einer Stunde wurden die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Der Proteinrohextrakt wurde anschließend auf seine Luciferaseaktivität hin untersucht. Die Aktivität wurde auf die Proteinkonzentration bezogen und bestätigte die Ergebnisse des *in vitro* TR/TL-Tests. Die Proteinrohextrakte der Kulturen, die mit Riboflavin bzw. Roseoflavin gewachsen waren, hatten eine geringere Luciferaseaktivität ( $68 \pm 3$  % bzw.  $80 \pm 7$  %) im Vergleich zu einer Kontrolle, der nur DMSO (das Lösungsmittel der Flavine) zugegeben wurde (Abbildung 5.27 B).



**Abbildung 5.27: Ergebnis der Riboswitch-Charakterisierung.**

(A) Die Firefly Luciferase wurde *in vitro* mit Hilfe des Plasmids pT7luc<sup>mod</sup>-sroG bei verschiedenen Flavinkonzentrationen exprimiert und anschließend die Aktivität der Luciferase gemessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des Aktivitätstests. Die Aktivität der Luciferase nimmt mit steigender FMN bzw. RoFMN-Konzentration ab und erreicht ab etwa 50 µM FMN bzw. RoFMN einen Minimalwert von 60. (B) Das Gen der Firefly Luciferase wurde unter Kontrolle des FMN-Riboswitches *sroG* aus *E. coli* mit Hilfe des Plasmids pT7luc<sup>mod</sup>-sroG *in vivo* in *E. coli* CpXFAD exprimiert. Bezogen auf die Luciferaseaktivität des Proteinrohextrakts von Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, zeigen Proteinrohextrakte von Zellen, die mit 50 µM Riboflavin bzw. 50 µM Roseoflavin behandelt wurden, eine reduzierte Aktivität (68 % bzw. 80 %). Aufgetragen wurde die in Dreifachbestimmung ermittelte Luciferaseaktivität, als Fehler ist die Standardabweichung angegeben.

## 6 Diskussion

Die wachstumshemmende Wirkung von Antimetaboliten im Stoffwechsel ist seit langem bekannt. Die als Chemotherapeutika eingesetzten Sulfonamide beispielsweise wirken in Bakterien als Antimetabolite der *p*-Aminobenzoesäure hemmend im Folsäurestoffwechsel (Brown 1962). Das Riboflavinanalogon Roseoflavin und seine antibiotische Wirkung gegenüber Gram-positiven Bakterien wurden 1974 beschrieben. Es handelt sich um das einzig natürliche Riboflavinanalogon mit antibiotischer Wirkung (Otani et al. 1974). Als mögliche Ziele für Roseoflavin gelten Flavoenzyme und FMN-Riboswitches. Etwa 0,1-3,5 % der annotierten Gene in Bakterien sind flavinabhängig und damit potentielle Zielmoleküle, wobei deren Zahl für verschiedene Genome stark schwankt (Macheroux et al. 2011). Flavintransporter, wie sie in *B. subtilis* (YpaA) und *C. glutamicum* (PnuX) beschrieben wurden, ermöglichen den Transport von Riboflavin in die Zelle. Für beide Transporter konnte gezeigt werden, dass sie auch Roseoflavin transportieren (Vogl et al. 2007; Hemberger et al. 2011). In der Zelle wird Riboflavin sehr schnell von ATP-abhängigen Flavokinasen/FAD-Synthetasen (EC 2.7.1.26/2.7.7.2) zu FMN und FAD umgesetzt (Demain 1972). In *B. subtilis* wird auch Roseoflavin als Substrat akzeptiert und zu RoFMN und RoFAD umgesetzt (Grill et al. 2008). Es wird angenommen, dass die Cofaktoraloga RoFMN und RoFAD für die antibiotische Wirkung von Roseoflavin verantwortlich sind. Für die FAD-abhängige *D*-Aminosäureoxidase (EC 1.4.3.3) aus *S. scrofa* konnte gezeigt werden, dass sie RoFAD bindet und dadurch inaktiviert wird (Grill et al. 2008). Der Verlust der Enzymaktivität wird auf das unterschiedliche Redoxpotential der Cofaktoraloga zurückgeführt (Hasford & Rizzo 1998). Als ein weiteres Ziel für Roseoflavin wurden FMN-Riboswitches identifiziert. In *B. subtilis*, *S. coelicolor* und *L. monocytogenes* wurde die Genexpression in Anwesenheit von Roseoflavin reduziert. Es wird angenommen, dass auch in diesem Fall RoFMN das aktive Molekül ist, das an den Riboswitch bindet (Lee et al. 2009; Ott et al. 2009; Mansjo & Johansson 2011; Pedrolli et al. 2012).

In dieser Arbeit sollten im Modellorganismus *E. coli* die Zielmoleküle für Roseoflavin identifiziert werden. Sämtliche bekannten Flavoenzyme aus *E. coli* wurden rekombinant hergestellt und dabei durch die Zugabe von Roseoflavin *in vivo* mit den Cofaktoraloga

RoFMN und RoFAD beladen. Darüber hinaus wurde der FMN-Riboswitch aus *E. coli* als mögliches Zielmolekül untersucht.

## 6.1 Bildung von FMN/FAD-Analoga in rekombinanten *E. coli*-Stämmen

Für die Herstellung von Flavoenzymen mit Cofaktoraloga wurde *E. coli* als Modellorganismus gewählt, da Plasmide mit Genen für alle Flavoenzyme über die ASKA-Library verfügbar waren (Kitagawa et al. 2005). Da *E. coli* keinen Flavintransporter für den Transport von Roseoflavin besitzt, wurden die Stämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD verwendet. Dabei handelt es sich um Derivate von *E. coli* CmpX131, der durch die Deletion von *ribC* riboflavinauxotroph ist und den Riboflavintransporter PnuX aus *C. glutamicum* produziert (Mathes et al. 2009). *E. coli* CpXFMN enthält eine zusätzliche Kopie des Flavokinasegens *FMN1* aus *S. pombe* (Santos et al. 2000) während *E. coli* CpXFAD eine zusätzliche Kopie des annotierten Flavokinase/FAD-Synthetasegens *ribF* aus *E. coli* enthält. Die *E. coli* CpX-Stämme wurden von Dr. Tilo Mathes (Humboldt-Universität, Berlin) zur Verfügung gestellt und waren noch nicht genauer charakterisiert. In Wachstumskurven und auf festen Nährmedien wurde zunächst gezeigt, dass die Stämme roseoflavinsensitiv sind. Schon geringe Mengen Roseoflavin (10  $\mu$ M) reichten aus, um das Wachstum zu hemmen. Zum Vergleich hierzu wurde *E. coli* BL21 DE3 untersucht. Dieser Stamm enthält keinen Flavintransporter und ist aufgrund dessen nicht sensitiv gegenüber Roseoflavin. Das Bakterium *B. subtilis* besitzt den Flavintransporter YpaA und wurde bereits als roseoflavinsensitiv beschrieben (Otani et al. 1974; Vogl et al. 2007). Durch die Untersuchung des Gesamtflavins im Cytoplasma konnte gezeigt werden, dass *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD, ebenso wie *B. subtilis*, *in vivo* Roseoflavin in die Zelle aufnehmen und es zu RoFMN umwandeln. Die Synthese der Cofaktoraloga RoFMN und RoFAD war die Voraussetzung für die *in vivo* Produktion rekombinanter Flavoenzyme mit Cofaktoraloga. Bei der Messung des Flavingehalts im Cytoplasma von *E. coli* CpXFMN und CpXFAD nach Wachstum mit Roseoflavin konnte, ebenso wie bei der Messung der proteingebundenen Flavine, kein RoFAD nachgewiesen werden. Die bereits beschriebene bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase aus *B. subtilis* setzt Roseoflavin sowohl zu RoFMN als auch RoFAD um (Grill et al. 2008). Jedoch konnte auch bei der Messung des Flavingehalts im Cytoplasma und der proteingebundenen Flavine

von *B. subtilis* nach Wachstum mit Roseoflavin kein RoFAD nachgewiesen werden. Durch die Behandlung der Proben mit TCA zur Proteinfällung als Vorbereitung für die HPLC könnte es durch den sauren pH-Wert zum Abbau der Flavine gekommen sein. Capo-Chichi et al. (2000) konnten diesen Effekt jedoch nur für TCA-Konzentrationen über 20 % nachweisen. Auch in anderen Arbeiten hatten niedrige TCA-Konzentrationen keinen Einfluss auf die Stabilität der Flavine (Lopez-Anaya & Mayersohn 1987; Batey & Eckhert 1990). Die verwendete TCA-Konzentration von 1 % sollte demnach keinen Einfluss auf die Stabilität der Flavine in den Proben gehabt haben.

Setzt man voraus, dass RoFAD nicht gebildet wurde, scheint sich die Flavokinase/FAD-Synthetase beispielsweise aus *B. subtilis* *in vivo* und *in vitro* unterschiedlich zu verhalten, da sie *in vitro* sowohl RoFMN als auch RoFAD synthetisiert. Das Gen *ribF* ist in *E. coli* BL21 (DE3) als Flavokinase/FAD-Synthetase (EC 2.7.1.26/2.7.7.2) annotiert und wurde bisher nicht charakterisiert (ECD: 00029 PubMed Nucleotide) (Jeong et al. 2009). Um die Produktion der Cofaktoranaloga in *E. coli* CpXFMN und CpXFAD zu verstehen, wurde RibF in *E. coli* rekombinant synthetisiert und gereinigt. Es konnte gezeigt werden, dass RibF sowohl Flavokinase- als auch FAD-Synthetaseaktivität besitzt. RibF konnte Riboflavin zu den Cofaktoren FMN und FAD und Roseoflavin zu RoFMN und RoFAD umsetzen. Die  $k_{\text{cat}}$ -Werte zeigen, dass Roseoflavin ( $k_{\text{cat}} = 0,42 \text{ s}^{-1}$ ) und Riboflavin ( $k_{\text{cat}} = 0,38 \text{ s}^{-1}$ ) etwa gleich schnell umgesetzt wurden. Die Reaktion der FAD-Synthetase erfolgte für das Cofaktoranalogen RoFMN deutlich langsamer ( $k_{\text{cat}} = 0,02 \text{ s}^{-1}$ ) als für FMN ( $k_{\text{cat}} = 0,06 \text{ s}^{-1}$ ). Als Folge der Aktivität von RibF aus *E. coli* und RibC aus *B. subtilis* wurde erwartet, dass im Cytoplasma von *E. coli* CpX und *B. subtilis* sowohl RoFMN als auch RoFAD nachweisbar sind. Eine Erklärung für das Fehlen von RoFAD im Cytoplasma von *E. coli* CpX liefert ein Experiment, bei dem im RibF-Enzymtest Riboflavin und Roseoflavin gleichzeitig als Substrat eingesetzt wurden. In diesem Fall wurde Riboflavin zu FMN und FAD, Roseoflavin hingegen nur zu RoFMN umgesetzt. Ein weiterer Versuch zeigte, dass schon ein Prozent FMN ausreicht, um die Reaktion von RoFMN zu RoFAD zu inhibieren. Das Wachstum von *E. coli* CpXFMN, *E. coli* CpXFAD und *B. subtilis* zur Produktion von Zellmaterial für die Messung des Flavingehalts im Cytoplasma wurde in LB-Medium durchgeführt. Dieses Medium enthält natürlicherweise 1-4  $\mu\text{M}$  der FMN-Vorstufe Riboflavin, wodurch die Bildung von RoFAD weitestgehend inhibiert worden sein könnte. Grill et al. (2008) haben die Aktivität der Flavokinase/FAD-Synthetase RibC aus *B. subtilis* nicht mit einer Kombination von Riboflavin und Roseoflavin

als Substrat getestet. Möglicherweise ist auch RibC aus *B. subtilis* nicht in der Lage RoFAD in Anwesenheit von FMN zu bilden. Pedrolli et al. (2012) konnten im zellfreien Extrakt von *S. coelicolor* und *S. davawensis* RoFMN und RoFAD nachgewiesen werden (Pedrolli et al. 2012). Die Flavokinase/FAD-Synthetase RibC aus *S. davawensis* kann *in vitro* RoFMN und RoFAD aus Roseoflavin synthetisieren (Grill et al. 2008). Auch für dieses Enzym wurde eine Kombination von Riboflavin und Roseoflavin als Substrat nicht getestet. Die Enzyme von *S. coelicolor* und *S. davawensis* sind möglicherweise in der Lage, beide Substrate nebeneinander umzusetzen, was den Nachweis von RoFAD im zellfreien Extrakt erklären könnte.

In Tabelle 6.1 sind die kinetischen Parameter für Flavokinasen/FAD-Synthetasen aus *E. coli*, *B. subtilis* und *S. davawensis* zusammengefasst. Alle Flavokinasen/FAD-Synthetasen können die Substrate Riboflavin und Roseoflavin jeweils ähnlich gut umsetzen. Zwischen den Enzymen gibt es jedoch vor allem bei den  $K_m$ -Werten Unterschiede. Diese liegen für RibF aus *E. coli* bei 1,8 bzw. 0,9  $\mu\text{M}$  für Riboflavin bzw. Roseoflavin, wohingegen für die Flavokinasen/FAD-Synthetasen aus *B. subtilis* und *S. davawensis* Werte zwischen 30 und 55  $\mu\text{M}$  bestimmt wurden (Grill et al. 2008). Die maximalen Reaktionsgeschwindigkeiten sowie die  $k_{\text{cat}}$ -Werte zeigen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich  $V_{\text{max}}$  von RibC aus *B. subtilis* ist für Riboflavin als Substrat mit 1200 U/mg ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) etwas höher als die anderen Werte für  $V_{\text{max}}$  (500-900 U/mg). Die kinetischen Daten der FAD-Synthetase-Reaktion für die RibC-Enzyme aus *S. davawensis* und *B. subtilis* wurden von Grill et al. (2008) nicht bestimmt. Auffallend für die Werte von RibF aus *E. coli* ist, dass die FAD-Synthetase-Reaktion für die getesteten Substrate FMN und RoFMN deutlich langsamer abläuft als die Flavokinasereaktion. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit liegt nur bei 110 bzw. 42 U/mg ( $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) für FMN bzw. RoFMN. Das natürliche Substrat FMN wird schneller umgesetzt als das Analogon RoFMN. Darüber hinaus liegt der  $K_m$  für FMN mit 3,6  $\mu\text{M}$  niedriger als für RoFMN (6,0  $\mu\text{M}$ ).

Mathes et al. (2009) konnten mit dem Stamm *E. coli* CmpX13, dem Vorläufer der CpX-Stämme, Proteine mit analogen Cofaktoren *in vivo* herstellen. Unter anderem wurde der FAD-abhängige Photorezeptor Slr1694 produziert, der eine BLUF-Domäne (BLUF: blue light sensors using FAD) enthält. Slr1694 hatte Roseoflavin, RoFMN und auch RoFAD gebunden, wenn es in Gegenwart von Roseoflavin produziert wurde. Wie in den Versuchen der vorliegenden Arbeit zur Flavinbestimmung im Cytoplasma wurde *E. coli* CmpX131 von

Mathes et al. (2009) in LB-Medium kultiviert, das geringe Mengen Riboflavin enthält. Dennoch bildete *E. coli* CmpX131 in diesem Experiment RoFMN und RoFAD. Wahrscheinlich wird RoFAD nur in geringen Mengen gebildet und ist erst messbar, wenn ein FAD-bindendes Protein in großen Mengen vorliegt und RoFAD zusammen mit dem Enzym beispielsweise mittels Affinitätschromatographie angereichert wird. Es ist daher anzunehmen, dass auch die CpX-Stämme RoFMN und RoFAD bilden und sich für die Produktion von Flavoenzymen mit Cofaktoranaloga eignen.

**Tabelle 6.1: Kinetische Konstanten für verschiedene Flavokinasen/FAD-Synthetasen.**

Die kinetischen Daten der Flavokinasen/FAD-Synthetasen aus *S. davawensis* und *B. subtilis* stammen aus Grill et al. (2008).

RibC/RibF	Substrat	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$V_{\text{max}}$ ( $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$k_{\text{cat}}/K_m$ ( $\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$ )
<i>S. davawensis</i>	Riboflavin	40	500	0,3	0,0075
	Roseoflavin	30	900	0,5	0,017
<i>B. subtilis</i>	Riboflavin	55	1200	0,7	0,013
	Roseoflavin	30	600	0,4	0,013
<i>E. coli</i>	Riboflavin	1,8	660	0,38	0,22
	Roseoflavin	0,9	726	0,42	0,49
	FMN	3,6	110	0,06	0,017
	RoFMN	6,0	42	0,02	0,003

## 6.2 Flavoenzyme aus *E. coli* binden die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD

Flavoenzyme sind in allen bekannten Organismen verbreitet und spielen dort eine wichtige Rolle in der Zelle. Beispielsweise sind die Succinatdehydrogenase im Primärstoffwechsel sowie die Chorismatsynthase und Acetolactatsynthase bei der Biosynthese der Aminosäuren essentiell (Macheroux et al. 2011). Damit bieten Flavoenzyme ein breites Ziel für die Bindung von Cofaktoranaloga. Für einzelne Enzyme und Proteine verschiedener Mikroorganismen wurde bereits die Bindung von Cofaktoranaloga beschrieben (Grill et al. 2008; Mathes et al. 2009). Meist wurde die Beladung der getesteten Proteine jedoch *in vitro* durchgeführt. Genaue Aussagen über den Anteil der Flavoenzyme einer Zelle, die *in vivo* tatsächlich Ziele für Cofaktoranaloga darstellen, gibt es derzeit nicht. In dieser Arbeit wurden die Flavoenzyme aus *E. coli* mit dem in Kapitel 6.1 diskutierten Expressionssystem in Gegenwart von Riboflavin und Roseoflavin produziert. Die Identifikation aller Flavoenzyme in *E. coli* war kompliziert, da verschiedene Datenbanken unterschiedliche Annotierungen verwenden. In



dieser Arbeit wurde die Proteindatenbank BRENDA als Grundlage für die Auswahl der Flavoenzyme herangezogen. Nach dem Abgleich dieser Daten mit den zur Verfügung stehenden Plasmiden der ASKA-Library entstand eine Liste von 40 Proteinen, die für die Versuche eingesetzt wurden. Ein mittlerweile erschienenenes Review von 2011 präsentiert eine aktuelle Liste von bekannten und putativen Flavoenzymen in einigen Prokaryoten und Eukaryoten. Für den hier verwendeten Modellorganismus *E. coli* wird eine Zahl von 68 Flavoproteinen genannt, wobei es sich bei zwanzig davon um putative Proteine handelt (Macheroux et al. 2011). Damit ergibt sich eine Differenz von acht Proteinen zu der Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proteine. In diese Studie wurde somit ein Großteil der zu Beginn der Arbeit bekannten Flavoenzyme einbezogen.

Zwei der 40 untersuchten Proteine (UxaC und IspH) sind nicht flavinabhängig und dienen zur Kontrolle des Versuchssystems. Wie erwartet, konnte in den angereicherten Proteinproben von UxaC und IspH kein FMN, FAD, RoFMN oder RoFAD gemessen werden. Die 4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyl-diphosphatreduktase IspH benötigt für die von ihr katalysierten Reaktion FAD, bindet es aber selbst nicht (Adam et al. 2002). Bei der D-Glukuronatisomerase UxaC handelt es sich um ein Metalloprotein, das  $Zn^{2+}$  als Cofaktor benötigt (Linster & Van Schaftingen 2004). Ein unspezifisches Binden von Flavinen an coangereicherte Proteine konnte somit ausgeschlossen werden.

Die restlichen 38 Flavoenzyme enthielten alle FMN und/oder FAD, wenn sie in Gegenwart von Riboflavin produziert wurden. Diese Kontrollansätze zeigen, dass es sich bei diesen Enzymen tatsächlich um Flavoenzyme handelt, die unter den Versuchsbedingungen mit ihrem natürlichen Cofaktor beladen werden können. Alle untersuchten Flavoenzyme haben vorzugsweise den in der Literatur angegebenen Cofaktor gebunden. Lediglich die 6,7-Dihydropteridinreduktase NfnB, in Vasudevan et al. (1988) als FAD-abhängig beschrieben, hatte zu 97 % FMN gebunden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass NfnB FMN-abhängig ist, was auch von Zenno et al. (1996) publiziert wurde. Wurden die Flavoenzyme in Gegenwart von Roseoflavin produziert, hatten alle bis auf die Lipoamiddehydrogenase Lpd RoFMN und/oder RoFAD gebunden. Da die Synthese der Proteine in LB-Medium stattfand, das geringe Mengen Riboflavin enthält (1-4  $\mu$ M), wurden neben RoFMN/RoFAD auch FMN/FAD gebunden.

Einige Proteine konnten nur mit geringen Ausbeuten angereichert werden, da das Protokoll der Affinitätschromatographie zur Reinigung der Proteine aus zeitlichen Gründen nicht auf

jedes zu reinigende Protein optimiert werden konnte. So wurden beispielweise membran-gebundene Proteine vermutlich nur in geringen Mengen angereichert. Das könnte die relativ geringe Ausbeute z.B der Prolindehydrogenase (PutA), der NADH-Dehydrogenase II (Ndh), der Malatdehydrogenase (Mqo), der Glyzerin-3-phosphatdehydrogenase (GlpD) und der D-Lactatdehydrogenase (Dld) erklären. Diese Enzyme sind membrangebunden oder -assoziiert und benötigen zur Reinigung aufwändigere Methoden (Kohn & Kaback 1973; Brown & Wood 1992; Bjorklof et al. 2000; van der Rest et al. 2000; Walz et al. 2002).

Insgesamt war die Cofaktorsättigung der angereicherten Enzyme in vielen Fällen nicht vollständig. Eine Verzerrung der Cofaktorsättigung entstand, abgesehen von unspezifisch coangereicherten Proteinen vor allem durch die Anreicherung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (EC 2.3.1.28). Das Plasmid pCA24N der ASKA-Library, welches für die Expression der Flavoproteine verwendet wurde, enthält ein Chloramphenicolresistenzgen. Das von diesem kodierte Protein besitzt einen hohen Anteil an Histidin (5,5 %) und bindet während der Affinitätschromatographie ebenfalls an das Säulenmaterial. Durch die Waschschrte wird es nicht oder nur unzureichend entfernt und findet sich deswegen in der Eluierungsfraction wieder (Oswald & Rinas 1996). Dieses Phänomen machte sich vor allem bei geringer Produktion des Zielproteins bemerkbar. Durch die zu Beginn der Arbeit getestete Produktion der Azobenzolreduktase (AzoR) und der NAD(P)H-Dehydrogenase (WrbA) konnte dieses Problem nicht erkannt werden, da AzoR und WrbA mit ca. 20 kDa dieselbe Größe wie die Chloramphenicol-Acetyltransferase besitzen. Die Expressionen und Reinigungen wurden zunächst für alle zu testenden Flavoenzyme durchgeführt. Erst im Anschluss erfolgte die Kontrolle via SDS-PAGE und Western-Blot. Wäre dieses Problem zu Beginn erkannt worden, wäre der Einsatz eines anderen Vektors sinnvoll gewesen. Die Aminoglycosid-3'-phosphotransferase (APH), das Genprodukt des Kanamycinresistenzgens im pET-Vektorsystem (Novagen, Merck Millipore, Darmstadt), enthält beispielsweise nur 2,6 % Histidin. Für die Produktion der Flavokinase/FAD-Synthetase RibF wurde ein solcher pET-Vektor verwendet, wodurch während der Affinitätschromatographie keine Resistenzgenprodukte angereichert wurden. Ein weiterer Grund für die unvollständige Cofaktorsättigung liegt vermutlich in der Überproduktion der Flavoenzyme. In der Zelle wird unnatürlich viel flavinabhängiges Protein produziert, für deren Beladung die vorhandene Cofaktormenge nicht ausreicht. Dies führt dazu, dass nur ein Teil des produzierten Proteins mit Cofaktor beladen werden kann.

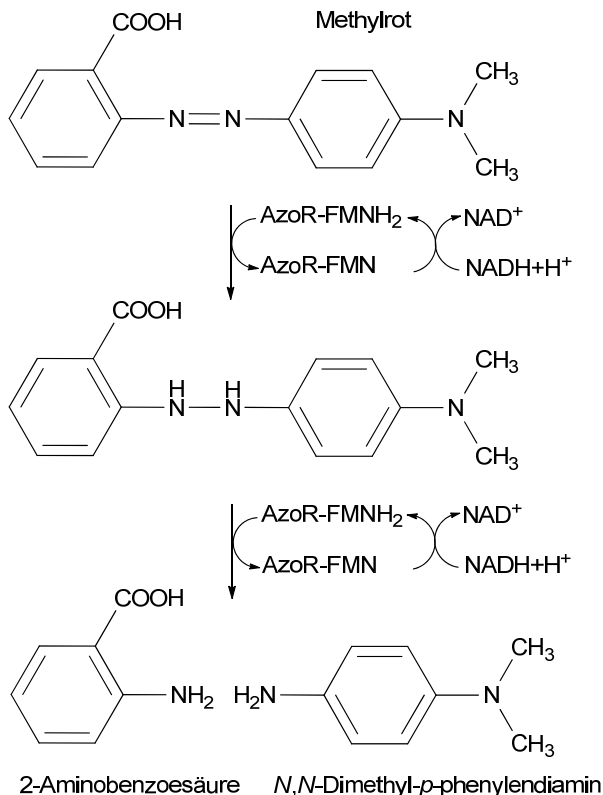
Auch die Tatsache, dass einige Enzyme wie beispielsweise die NADH-Dehydrogenase NuoF (Leif et al. 1995) aus mehreren unterschiedlichen Untereinheiten besteht, könnte dafür verantwortlich sein, dass diese bei der alleinigen Expression der flavinbindenden Untereinheiten nicht in der Lage waren, den Cofaktor effektiv zu binden. Außerdem muss berücksichtigt werden, dass das Ablösen der Cofaktoren durch die Denaturierung des Proteins mit TCA nicht unbedingt ein vollständiges Freisetzen der Flavine bewirkt hat. Nach der TCA-Fällung waren einige Proteinpellets noch gelb bzw. rosa, wie beispielsweise Gor, FrdA, NfnB, TrxB und Ndh. Ein Grund hierfür könnte die kovalente Bindung des Cofaktors an das Enzym sein, die bei etwa 10 % der bekannten Flavoenzyme vorkommt. Zum Großteil handelt es sich dabei um FAD-abhängige Flavoenzyme (Macheroux et al. 2011). Hierzu zählen beispielsweise auch die 6,7-Dihydropteridinreduktase NfnB und die Fumaratreduktase FrdA, die ihre Cofaktoren fest bzw. kovalent binden (Zenno et al. 1996; Iverson et al. 1999). Es ist daher zu anzunehmen, dass kovalent bzw. fest gebundene Cofaktoren nicht vollständig vom Protein abgelöst werden konnten.

Die Versuche zur Messung der Cofaktoranaloga im Cytoplasma und im löslichen Proteom legen nahe, dass die gebildete Menge an RoFAD zu gering war, um die durch Überexpression erhöhte Enzymmenge mit Cofaktor zu versorgen. Es konnte jedoch bewiesen werden, dass RoFAD *in vivo* gebildet wurde, da für einige angereicherte Flavoenzyme eine Bindung geringer Mengen RoFAD nachgewiesen werden konnte. Die *in vitro*-Beladung der Dihydrolipoyldehydrogenase Lpd und der Flavorubredoxinreduktase NorW mit RoFAD haben außerdem gezeigt, dass zumindest diese beiden Flavoenzyme RoFAD annähernd genauso gut binden wie FAD. Es ist wahrscheinlich, dass auch andere FAD-abhängige Flavoenzyme zur RoFAD-Bindung in der Lage sind. Da aber *E. coli* CpX sensitiv gegenüber Roseoflavin ist, obwohl kaum RoFAD in der Zelle produziert oder gebunden wurde, besteht die Möglichkeit, dass RoFAD für die toxische Wirkung von Roseoflavin keine entscheidende Rolle spielt. RoFMN hingegen wurde in hohen Konzentrationen gebildet und konnte *in vivo* gut an FMN-abhängige Flavoenzyme binden. Die Anzahl der FMN-abhängigen Enzyme als Zielmolekül von RoFMN ist groß genug, um durch ihre Inaktivierung eine Hemmung des Wachstums zu verursachen. Auch unter den FMN-abhängigen Enzymen finden sich für die Zelle essentielle Enzyme, wie z.B. die Phosphopanthothenatcystein-Ligase Dfp (Spitzer et al. 1988). Es ist denkbar, dass die wachstumshemmende Wirkung von Roseoflavin hauptsächlich auf der

Interaktion von Flavoenzymen mit RoFMN beruht. Zudem besitzt *E. coli* mit dem FMN-Riboswitch *sroG* ein weiteres mögliches Ziel für RoFMN.

### 6.3 AzoR mit dem Cofaktoranalogen RoFMN ist weniger aktiv

Die Versuche zur *in vivo*-Beladung von Flavoenzymen mit Cofaktoranaloga zeigen, dass die meisten Flavoenzyme aus *E. coli* die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD binden können. Zur Bestätigung der Annahme, dass die Bindung von Cofaktoranaloga einen Einfluss auf die Aktivität eines Enzyms hat, wurde die Azobenzolreduktase AzoR aus *E. coli* als Modellenzym untersucht. AzoR ist eine Oxidoreduktase, welche unter Verwendung von NADH als Elektronendonator in einem Ping-Pong-Mechanismus die Spaltung von Azo-Bindungen (N=N) katalysiert. Dabei erfolgt die Übertragung der Elektronen durch den Cofaktor FMN (Nakanishi et al. 2001). Abbildung 6.1 zeigt das Reaktionsschema für die Spaltung der Azoverbindung Methylrot, welches im Aktivitätstest als Substrat diente.



**Abbildung 6.1: Reaktion von AzoR (EC 1.7.1.6) mit Methylrot als Substrat.**

AzoR spaltet Methylrot in einem Ping-Pong-Mechanismus mit 2 Mol NADH als Elektronendonator in 2-Aminobenzoessäure und *N,N*-Dimethyl-*p*-phenylenediamin.

AzoR konnte nahezu vollständig mit Cofaktor beladen werden. Dies und die Tatsache, dass bereits ein Aktivitätstest sowie eine Kristallstrukturanalyse von AzoR publiziert wurden, führten zu der Entscheidung, die Aktivität von AzoR mit FMN und RoFMN als Cofaktor zu untersuchen (Nakanishi et al. 2001; Ito et al. 2006; Ito et al. 2008). Die Funktion von AzoR für die Zelle ist noch nicht endgültig geklärt. Da Azoverbindungen hauptsächlich durch anthropologische Eintragungen in die Umwelt gelangen, wird angenommen, dass die ursprüngliche Aufgabe der Azoreduktasen nicht deren Spaltung ist. Es gibt Hinweise, dass Azoreduktasen in der Abwehr von oxidativem Stress eine Rolle spielen. Für einige Enzyme wurde nachgewiesen, dass sie auch Quinone als Substrat akzeptieren. Quinone sind eine natürliche, ubiquitär vorkommende Gruppe von Verbindungen, die auch als Coenzyme, Elektronenakzeptoren und Vitamine verwendet werden. Quinonreduktasen katalysieren die Reduktion von Quinonen, wobei durch ein-Elektronenübertragung die potentiell gefährlichen Semiquinone entstehen (Liu et al. 2009). Diese können mit molekularem Sauerstoff zu Superoxidradikalen reagieren, die zu oxidativem Stress führen und eine zellschädigende Wirkung haben. Es konnte gezeigt werden, dass ein *E. coli*-Stamm, der die Azoreduktase AZR aus *Rhodobacter sphaeroides* exprimiert, resistenter gegenüber oxidativem Stress und Hitzeschocks ist (Liu et al. 2007). Untersuchungen an der AzoR aus *E. coli* gaben Hinweise auf eine Rolle in der Abwehr gegen thiol-spezifischen Stress (Liu et al. 2009). Auch die Tatsache, dass in vielen Mikroorganismen homologe Gene zu AzoR gefunden wurden, deutet auf eine grundlegende Bedeutung der Azoreduktasen hin. So besitzen *Yersinia pseudotuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Photobacterium luminescens*, *Vibrio vulnificus*, *Haemophilus influenzae* und *Pseudomonas putida* homologe Gene zu AzoR (Ito et al. 2006). Diese Arbeit untersuchte zum ersten Mal den Einfluss eines Cofaktor-analogons auf die Azoreduktaseaktivität von AzoR aus *E. coli*. AzoR konnte *in vivo* mäßig gut mit Cofaktor beladen werden (0,4 FMN/AzoR bzw. 0,02 RoFMN/AzoR). Die Ergebnisse der *in vivo*-Beladung des Enzyms mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in Kapitel 5.4 führte zu einer besseren Beladung von AzoR mit RoFMN (0,2 RoFMN/AzoR). Da AzoR mit Hilfe eines pET-Vektors überproduziert wurde und sich damit eine sehr hohe Konzentration von AzoR in der Zelle befand, reichte die zur Verfügung stehende Cofaktormenge für eine komplette Beladung nicht aus. Durch die *in vitro*-Beladung konnte nahezu vollständig beladenes AzoR hergestellt werden (0,8 FMN/AzoR bzw. 0,9 RoFMN/AzoR). Die hohe Affinität von AzoR zu FMN und RoFMN wurde durch die Bestimmung der Affinitätskonstanten  $K_d$  bestätigt. Die Affinität zu

RoFMN war dabei sogar geringfügig höher als zu FMN (2 bzw. 10  $\mu\text{M}$ ). Im Aktivitätstest mit Methylrot als Substrat war die Aktivität von AzoR-RoFMN gegenüber AzoR-FMN jedoch um 70 % reduziert.

Die Messung des Redoxpotentials an der Universität Graz durch Dr. Alexandra Binter ergab einen Unterschied von 80 mV zwischen AzoR-FMN (-145 mV) und AzoR-RoFMN (-223 mV). Der Unterschied im Redoxpotential zwischen den ungebundenen Flavinen ist mit 40 mV (-207 mV FMN bzw. -246 mV RoFMN) nur halb so groß. Das Redoxpotential und die Reaktivität der Cofaktoren wird entscheidend durch die Umgebung im Enzym beeinflusst. In der *D*-Aminosäureoxidase beispielsweise beträgt der Unterschied im Redoxpotential von freiem FAD/FADH<sub>2</sub> (-210 mV) zu proteingebundenem (0 mV) etwa 200 mV (Zheng & Ornstein 1996). Es wurde gezeigt, dass Flavine mit Substituenten am C(8)-Atom ein verändertes Redoxpotential haben und dadurch zwar gute sterische Substituenten für FMN/FAD sind, möglicherweise jedoch biologisch inaktiv sind (Walsh et al. 1978). Im Fall von AzoR-RoFMN veränderte sich das Redoxpotential sowohl des freien als auch des enzymgebundenen Flavins, die Aktivität des Enzyms ging hierdurch jedoch nicht vollständig verloren.

Darüber hinaus wurde AzoR-RoFMN mittels Kristallisation im Hinblick auf strukturelle Unterschiede untersucht. Dieses Experiment wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Tanokura an der Universität in Tokio durchgeführt. AzoR-FMN wurde als Homodimer beschrieben, das zwei Moleküle FMN nicht-kovalent bindet (Ito et al. 2006). Die Dimerisierung des Enzyms wurde durch die Bindung von RoFMN nicht beeinträchtigt. Auch die Gesamtstruktur des Enzyms änderte sich durch die Bindung des Cofaktoranalogs nicht. Auffällig ist jedoch die Tatsache, dass AzoR-RoFMN im Gegensatz zu AzoR-FMN ein Heterodimer bildet. Die beiden Untereinheiten unterscheiden sich in der Orientierung von R59, einer Aminosäure in der Cofaktorbindetasche. Außerdem findet sich im Protomer AzoR-RoFMN1 zwischen R59 und der Dimethylaminogruppe am C(8)-Atom von RoFMN ein Wassermolekül, das im anderen Protomer sowie bei AzoR-FMN nicht vorkommt (Ito et al. 2006). Dadurch kann es zur Protonierung von RoFMN kommen, was zu einer signifikanten Veränderung des Redoxpotential führen würde (Hasford & Rizzo 1998).

Darüber hinaus ist es plausibel, dass die Aktivität der Cofaktoranaloga von der Aminosäure-Umgebung der Cofaktorbindetasche abhängig ist. Shinkai et al. (1986) argumentieren, dass die Cofaktoranaloga von Roseoflavin lediglich in polarer Umgebung inaktiv sind, da der Isoalloxazinring durch einen internen Ladungstransfer von der Dimethylaminogruppe zum

Pteridinteil seine oxidativen Eigenschaften verliert. Durch eine hydrophobe Umgebung können proteingebundene Flavinanaloga ihre Aktivität möglicherweise zurückerhalten (Shinkai et al. 1986). Es ist denkbar, dass die Anwesenheit eines Wassermolekül AzoR zu einer polaren Umgebung und dadurch zur Inaktivierung des Cofaktors führt. Die strukturelle Analyse von AzoR-RoFMN zeigte auch, dass die Dimethylaminogruppe am C(8) von RoFMN zusätzliche Interaktionen mit der Dimethylgruppe von Methylrot eingehen kann. Eine zusätzliche Interaktion mit dem Substrat ist möglicherweise für den niedrigeren  $K_m$  von 2  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu 27  $\mu\text{M}$  für AzoR-FMN verantwortlich. Für NADH ergeben sich keine zusätzlichen Interaktionen. Der  $K_m$  für dieses Substrat liegt für beide AzoR-Formen bei 260  $\mu\text{M}$ . Des Weiteren wurde das pH-Optimum der beiden AzoR-Formen mit Anthrachinon-2-sulfonsäure als Substrat ermittelt. Das pH-Optimum von AzoR-RoFMN (pH 6,9) war minimal weiter in den basischen Bereich verschoben als das von AzoR-FMN (pH 6,3), was durch die Protonierung des N(8a) verursacht worden sein könnte. Der Unterschied ist gering, zeigt aber, dass durch die Bindung des Cofaktoranalogs verschiedenste Bereiche und Eigenschaften von AzoR beeinflusst wurden. Für die um 70 % reduzierte Aktivität von AzoR sind wahrscheinlich das veränderte Redoxpotential sowie die Protonierung des Cofaktors verantwortlich.

Die Untersuchungen an AzoR legen aber auch nahe, dass durch die Cofaktorbindung eine Vielzahl an Wechselwirkungen zu Stande kommen kann, die jede für sich oder in Kombination eine Abnahme der Aktivität bewirken können. Es ist wahrscheinlich, dass verschiedene Flavoenzyme durch die Cofaktorbindung auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden. Durch die Bindung von RoFMN/RoFAD könnte die Gesamtstruktur der Enzyme oder die Bildung von Multimeren beeinträchtigt werden. Weiterhin könnten die Cofaktoren durch die Änderung ihrer Redoxeigenschaften inaktiv sein oder ihre Bindung könnte durch kleinere strukturelle Veränderungen bzw. Wechselwirkungen mit dem Enzym oder Substrat zu veränderten kinetischen Eigenschaften führen. Denkbar wäre hier nicht nur eine Reduktion des  $K_m$  wie bei AzoR, sondern eine Erhöhung. Dies kann insbesondere bei den physiologischen Substratkonzentrationen innerhalb der Zelle zu reduzierter Enzymaktivität führen. Neben AzoR wurden bereits weitere Enzyme beschrieben, die Roseoflavin, RoFMN oder RoFAD binden und in dieser Form inaktiv bzw. weniger aktiv sind (Otto et al. 1981; Otani et al. 1997; Yorita et al. 2000; Grill et al. 2008). Es ist daher wahrscheinlich, dass neben

AzoR auch andere Flavoenzyme aus *E. coli* durch das Binden von Cofaktoranaloga in ihrer Aktivität beeinflusst werden.

#### **6.4 Der FMN-Riboswitch *sroG* aus *E. coli* reguliert die Riboflavinbiosynthese und reagiert auf RoFMN**

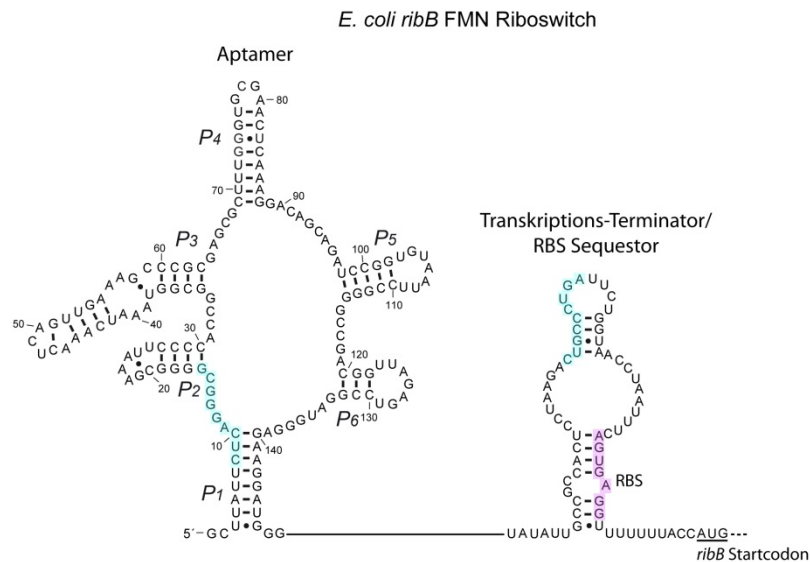
Bisher sind zwölf verschiedene Riboswitch-Klassen bekannt. Jede davon bindet spezifisch einen bestimmten Metaboliten und ist in ihrer Sequenz und ihrer Sekundärstruktur hoch konserviert (Blount & Breaker, 2006). Der FMN-Riboswitch bindet FMN und reguliert dadurch in vielen Bakterien Gene der Riboflavinbiosynthese oder des Riboflavintransports. Versuche deuten darauf hin, dass Riboswitches Ziele von Antimetaboliten sind. Durch die Bindung der Antimetabolite kommt es zu einer Konformationsänderung der Riboswitches, wodurch die Genexpression reduziert wird. Beispielweise bindet das Thiaminanalogon Pyriithiamin im Cytoplasma als Pyriithiaminpyrophosphat an den Thiaminpyrophosphat (TPP)-Riboswitch und hemmt das Wachstum einiger Bakterien und Pilze. Zur Entwicklung von Pyriithiaminresistenzen kommt es beispielsweise, wenn der Riboswitch so verändert ist, dass er den Antimetaboliten nicht mehr binden kann. Bei pyriithiaminresistenten *B. subtilis*- und *Aspergillus oryzae*-Stämmen wurden Mutationen in der konservierten Region des TPP-Riboswitches gefunden (Sudarsan et al., 2005). Ähnliches wurde für die wachstumshemmenden Lysinanaloga *L*-Aminoethylcystein und *DL*-4-Oxallysin beschrieben. Beide Substanzen binden an den Lysin-Riboswitch des *lysC*-Gens in *B. subtilis*. Resistente *B. subtilis*-Stämme trugen eine Mutation im *lysC*-Riboswitch und waren *in vitro* nicht mehr in der Lage, den Liganden Lysin zu binden (Lu et al. 1992). Auch für das Riboflavinanalogon Roseoflavin wurden resistente *B. subtilis*- und *Lactococcus lactis*-Stämme beschrieben, die eine Mutation im FMN-Riboswitch des *rib*-Operons trugen. Eine Mutation im Aptamerbereich des Riboswitch führte auch hier zu resistenten Stämmen, da FMN bzw. RoFMN nicht mehr gebunden werden kann und die Riboflavinbiosynthese infolgedessen dereguliert ist. Das erklärt, warum viele der resistenten Stämme Riboflavin überproduzieren (Krenea & Perumov 1990; Kil et al. 1992; Burgess et al. 2004). Für *B. subtilis* und *L. monocytogenes* konnte gezeigt werden, dass ihr FMN-Riboswitch Roseoflavin binden kann (Lee et al. 2009; Ott et al. 2009; Mansjo & Johansson 2011). Pedrolli et al. (2012) zeigten, dass in *S. coelicolor* nicht Roseoflavin,



sondern RoFMN an den FMN-Riboswitch bindet und die Sensitivität gegenüber Roseoflavin bewirkt. Der FMN-Riboswitch in *S. davawensis* kann RoFMN dagegen nicht binden und ist resistent gegenüber Roseoflavin (Pedrolli et al. 2012).

FMN-Riboswitches sind demnach ebenfalls ein Zielmolekül für das Riboflavinanalogon Roseoflavin. Der FMN-Riboswitch *sroG* aus *E. coli* befindet sich in der 5'-untranslatierten Region der 3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphatsynthase (*ribB*), einem Gen der Riboflavinbiosynthese. Anhand von Sequenzvergleichen konnte gezeigt werden, dass *sroG* aus bekannten Riboswitchelementen besteht (Gelfand et al. 1999; Vogel 2003). In dieser Arbeit sollte der FMN-Riboswitch *sroG* neben den Flavoproteinen als weiteres Zielmolekül für Roseoflavin untersucht werden. Zunächst konnte mit Hilfe des *sroG*-deletierten Stammes *E. coli* CmpX13  $\Delta$ *sroG* die regulatorische Eigenschaft des FMN-Riboswitches in *E. coli* gezeigt werden. Durch das Fehlen des FMN-Riboswitches wurde die Expression von *ribB* nicht reguliert und es kam zu einer Überproduktion von Riboflavin, das in das Medium abgegeben wurde. Die Genregulation durch *sroG* scheint jedoch nicht sehr stark zu sein, da der Riboflavingehalt im Überstand lediglich um den Faktor 2,9 erhöht war. Ein ähnlicher Phänotyp konnte durch die Überproduktion von *ribB* mit Hilfe des Plasmids pNCO113-*ribB* erzeugt werden. Hier erhöhte sich der Riboflavingehalt im Medium um den Faktor 2,5. Die genauere Charakterisierung des Riboswitches erfolgte mit Hilfe des *in vitro* Transkriptions-/Translations-Tests (TK/TL-Test). *SroG* wurde vor ein Reporter-gen (Luciferase) kloniert und dessen Produktion in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Metabolite FMN und RoFMN gemessen. Dabei zeigte sich, dass *sroG* sowohl auf FMN als auch auf RoFMN reagierte und mit steigenden Konzentrationen der Metabolite die Produktion der Luciferase inhibierte. Beide Metabolite konnten die Genexpression um bis zu 40 % zu reduzieren und zeigten ihre Wirkung bereits in Konzentrationen unter 10  $\mu$ M. Die Vermutung, dass es sich um eine schwache Regulation handelt, wurde damit bestätigt. Ein weiterer Versuch, in dem das im TK/TL-Test verwendete Plasmid pT7luc<sup>mod</sup>-*sroG* *in vivo* eingesetzt wurde, ergab eine Hemmung der Luciferaseaktivität um 32 % (Riboflavin) und 20 % (Roseoflavin). In diesem Versuch wurden dem Medium während der Expression 50  $\mu$ M Riboflavin bzw. Roseoflavin zugegeben. Die genaue Konzentration der Metabolite FMN und RoFMN in der Zelle ist nicht bekannt und hängt sowohl vom Transport in die Zelle als auch von der Umsetzung durch die Flavokinase ab. Vermutlich handelt es sich aber um relativ geringe Konzentrationen. Die

vergleichsweise schwache Regulation der Genexpression durch *sroG* kann anhand der Struktur des Riboswitches erklärt werden (Abbildung 6.2).

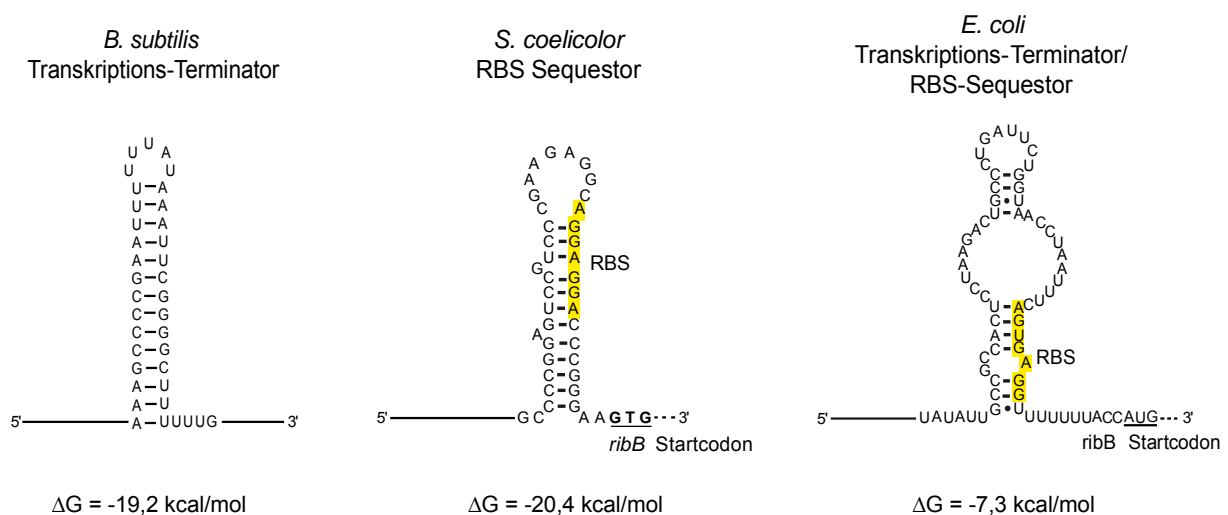


**Abbildung 6.2: Putative Sekundärstruktur des FMN-Riboswitches *sroG* aus *E. coli*.**

Die türkis hinterlegten Sequenzen sind komplementär und bilden in Abwesenheit von FMN den anti-RBS-/anti-Terminator-Sequestor. Rosa hinterlegt ist die RBS von *ribB*, die in Anwesenheit von FMN durch die Bildung der Haarnadelstruktur maskiert wird.

Die putative Struktur des FMN-Riboswitches *sroG* vereint Formen der transkriptionellen und translationalen Regulation. Durch die Bindung des Metaboliten wird im Downstream-Bereich von *sroG* eine Haarnadelstruktur gebildet, die als Transkriptions-Terminator fungiert, zugleich aber die RBS von *ribB* maskiert. Die Bildung des Transkriptions-Terminators ist ein Merkmal von Riboswitches, welche die Genexpression auf transkriptioneller Ebene regulieren. Hierbei fällt die Polymerase von der DNA ab und verhindert dadurch die Synthese der mRNA. Im Fall der translationalen Regulation wird zwar die mRNA gebildet, die Initiation der Translation wird jedoch durch das Maskieren der RBS mit Hilfe der Haarnadelstruktur verhindert (Vitreschak et al. 2002). Die freie Energie der Haarnadelstruktur liefert einen Wert für den Grad ihrer Stabilität. Im Vergleich zu anderen FMN-Riboswitches handelt es sich bei der Haarnadelstruktur *sroG* um eine schwache Struktur. Die mit KineFold bestimmte freie Energie beträgt  $-7,3$  kcal/mol (Xayaphoummine et al. 2005). Die Haarnadelstruktur des FMN-Riboswitches vor *ribD* (*ribG*) in *B. subtilis* besitzt stattdessen eine freie Energie von  $-19,2$  kcal/mol. Die Expression von *ribD* wird auf transkriptioneller Ebene reguliert. Bindet FMN an das Aptamer, wird die Haarnadelstruktur des Transkriptions-Terminators

gebildet und die Transkription vorzeitig abgebrochen. Die Struktur des *ribB* FMN-Riboswitches aus *S. coelicolor* ist ebenfalls bekannt. Ihre Haarnadelstruktur besitzt eine freie Energie von -20,4 kcal/mol (Pedrolli et al. 2012). Die Haarnadelstruktur maskiert die RBS und inhibiert die Translationsinitiation. Durch den komplementären Aufbau sind die Haarnadelstrukturen der Riboswitches in *B. subtilis* und *S. coelicolor* sehr stabil (Abbildung 6.3). Pedrolli et al. (2012) untersuchte im TK/TL-Test die Reaktion der Riboswitches aus *B. subtilis* und *S. coelicolor* auf FMN und RoFMN. Dabei wurde beobachtet, dass der *ribD* Riboswitch aus *B. subtilis* die Expression des Reportergens in Gegenwart von FMN bzw. RoFMN um ca. 60 % reduziert. Die Regulation durch den *ribB* Riboswitch aus *S. coelicolor* ist mit einer Reduktion der Genexpression um 62 % (FMN) und 75 % (RoFMN) noch stärker. Die erhöhte Reduktion der Genexpression kann durch die ebenfalls erhöhte Stabilität der Haarnadelstruktur erklärt werden.



**Abbildung 6.3: Haarnadelstrukturen verschiedener FMN-Riboswitches.**

Die Haarnadelstrukturen im Downstream-Bereich des Aptamers führen zum Abbruch der Transkription oder zur Maskierung der ribosomalen Bindestelle (RBS). Die freie Energie liefert einen Wert für die Stabilität der Struktur, die bei *sroG* aus *E. coli* im Vergleich zu den FMN-Riboswitches aus *B. subtilis* und *S. coelicolor* gering ist. Die Strukturen der Riboswitches aus *B. subtilis* und *S. coelicolor* stammen aus Winkler et al. (2002) bzw. Pedrolli et al. (2012). Die Werte für die freie Energie wurden mit KineFold berechnet.

Im *E. coli* Riboswitch *sroG* bilden sich weniger Basenpaarungen aus, wodurch sich die Haarnadelstruktur leichter löst. Dies bedingt die vergleichsweise schwache Genregulation. Durch die Mischform aus transkriptioneller und translationaler Regulation besteht jedoch in *E. coli* die Möglichkeit, die Expression sowohl durch Abbruch der Transkription als auch durch Inhibierung der Translationsinitiation bei bereits gebildeter mRNA zu hemmen. Unter Umständen kann durch die doppelte Regulation die schwache Haarnadelstruktur

ausgeglichen werden. Eine starke Regulation der Riboflavinbiosynthese, wie in *B. subtilis*, ist sinnvoll, wenn die Biosynthese vollständig ausgeschaltet werden soll. Da *B. subtilis* einen Riboflavintransporter besitzt, kann bei genügend Riboflavin in der Umgebung der eigene Riboflavinsyntheseapparat heruntergefahren werden. Im Gegensatz dazu kann *E. coli* durch das Fehlen eines geeigneten Transporters Riboflavin nicht aus der Umgebung aufnehmen. Da Riboflavin bzw. die daraus gebildeten Cofaktoren FMN und FAD für die Zelle essentiell sind und ständig benötigt werden, ist es für *E. coli* nicht notwendig, seine Riboflavinsynthese stark zu regulieren. Es wurde sogar lange angenommen, dass die Riboflavinbiosynthese in *E. coli* keiner Regulation unterliegt. Stoffwechselstudien gaben keine Hinweise auf eine Regulation der Riboflavinbiosynthese. Erst die Entdeckung der Riboswitches und darauffolgende Sequenzvergleiche lieferten Hinweise auf eine mögliche Regulation (Vitreschak et al. 2002).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei *sroG* um einen FMN-Riboswitch handelt, der die Riboflavinbiosynthese reguliert und sowohl FMN als auch RoFMN als Metaboliten bindet. Da die regulatorischen Fähigkeiten von *sroG* begrenzt sind, ist es unwahrscheinlich, dass der FMN-Riboswitch das alleinige Zielmolekül für Roseoflavin in *E. coli* ist. Auch in *L. monocytogenes* reagiert der FMN-Riboswitch auf Roseoflavin und die Genexpression eines putativen Flavintransporters wird reduziert. Vermutlich führt die Aufnahme von Roseoflavin zur Bindung von RoFMN an das Aptamer des Riboswitches und infolgedessen zu einer reduzierten Riboflavinaufnahme und schlechterem Wachstum. Durch eine Mutation im Riboswitch reagiert dieser nicht mehr auf Roseoflavin bzw. RoFMN. Das Wachstum des Stammes verbessert sich dadurch, ist jedoch deutlich schlechter als die Kontrolle ohne Roseoflavin (Mansjo & Johansson 2011). Es ist deshalb wahrscheinlich, dass es für Roseoflavin weitere Zielmoleküle in *L. monocytogenes* und vermutlich auch in anderen Organismen gibt. Dabei handelt es sich möglicherweise um die Flavoproteine, da z.B. in *L. monocytogenes* kein weiterer FMN-Riboswitch existiert. Für weiterführende Studien wäre es interessant, die Versuche von Mansjo und Johansson mit *L. monocytogenes* weiter zu verfolgen. Aufschlussreich könnte beispielsweise die Untersuchung der Flavoenzyme des von Natur aus roseoflavinsensitiven Stammes sein.

## 7 Literaturverzeichnis

- Abbas, C. A. and Sibirny, A. A. (2011). "Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers." Microbiol Mol Biol Rev **75**(2): 321-360.
- Adam, P., Hecht, S., Eisenreich, W., Kaiser, J., Grawert, T., Arigoni, D., Bacher, A. and Rohdich, F. (2002). "Biosynthesis of terpenes: studies on 1-hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl 4-diphosphate reductase." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12108-12113.
- Batey, D. W. and Eckhert, C. D. (1990). "Identification of FAD, FMN, and riboflavin in the retina by microextraction and high-performance liquid chromatography." Anal Biochem **188**(1): 164-167.
- Bereswill, S., Hinkelmann, S., Kist, M. and Sander, A. (1999). "Molecular analysis of riboflavin synthesis genes in *Bartonella henselae* and use of the ribC gene for differentiation of *Bartonella* species by PCR." J Clin Microbiol **37**(10): 3159-3166.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Bjorklof, K., Zickermann, V. and Finel, M. (2000). "Purification of the 45 kDa, membrane bound NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* (NDH-2) and analysis of its interaction with ubiquinone analogues." FEBS Lett **467**(1): 105-110.
- Blount, K. F. and Breaker, R. R. (2006). "Riboswitches as antibacterial drug targets." Nat Biotechnol **24**(12): 1558-1564.
- Blount, K. F., Wang, J. X., Lim, J., Sudarsan, N. and Breaker, R. R. (2007). "Antibacterial lysine analogs that target lysine riboswitches." Nat Chem Biol **3**(1): 44-49.
- Bocobza, S., Adato, A., Mandel, T., Shapira, M., Nudler, E. and Aharoni, A. (2007). "Riboswitch-dependent gene regulation and its evolution in the plant kingdom." Genes Dev **21**(22): 2874-2879.
- Brown, E. D. and Wood, J. M. (1992). "Redesigned purification yields a fully functional PutA protein dimer from *Escherichia coli*." J Biol Chem **267**(18): 13086-13092.
- Brown, G. M. (1962). "The biosynthesis of folic acid. II. Inhibition by sulfonamides." J Biol Chem **237**: 536-540.
- Burgess, C., O'Connell-Motherway, M., Sybesma, W., Hugenholtz, J. and van Sinderen, D. (2004). "Riboflavin production in *Lactococcus lactis*: potential for in situ production of vitamin-enriched foods." Appl Environ Microbiol **70**(10): 5769-5777.
- Burgess, C. M., Slotboom, D. J., Geertsma, E. R., Duurkens, R. H., Poolman, B. and van Sinderen, D. (2006). "The riboflavin transporter RibU in *Lactococcus lactis*: molecular characterization of gene expression and the transport mechanism." J Bacteriol **188**(8): 2752-2760.

- Capo-chichi, C. D., Gueant, J. L., Feillet, F., Namour, F. and Vidailhet, M. (2000). "Analysis of riboflavin and riboflavin cofactor levels in plasma by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr B Biomed Sci Appl **739**(1): 219-224.
- Cecchini, G., Perl, M., Lipsick, J., Singer, T. P. and Kearney, E. B. (1979). "Transport and binding of riboflavin by *Bacillus subtilis*." J Biol Chem **254**(15): 7295-7301.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. and Hsu, L. (1972). "Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(8): 2110-2114.
- Deka, R. K., Brautigam, C. A., Bidy, B. A., Liu, W. Z. and Norgard, M. V. (2013). "Evidence for an ABC-Type Riboflavin Transporter System in Pathogenic Spirochetes." mBio **4**(1).
- Demain, A. L. (1972). "Riboflavin oversynthesis." Annu Rev Microbiol **26**: 369-388.
- Fischer, M. and Bacher, A. (2005). "Biosynthesis of flavocoenzymes." Nat Prod Rep **22**(3): 324-350.
- Fischer, M. and Bacher, A. (2008). "Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase." Arch Biochem Biophys **474**(2): 252-265.
- Fraaije, M. W. and Mattevi, A. (2000). "Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features." Trends Biochem Sci **25**(3): 126-132.
- Fuller, T. E. and Mulks, M. H. (1995). "Characterization of *Actinobacillus pleuropneumoniae* riboflavin biosynthesis genes." J Bacteriol **177**(24): 7265-7270.
- Geary, T. G., Divo, A. A. and Jensen, J. B. (1985). "Nutritional requirements of *Plasmodium falciparum* in culture. II. Effects of antimetabolites in a semi-defined medium." J Protozool **32**(1): 65-69.
- Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Jomantas, J., Kozlov, Y. I. and Perumov, D. A. (1999). "A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes." Trends in Genetics **15**(11): 439-442.
- Ghisla, S. and Massey, V. (1989). "Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions." Eur J Biochem **181**(1): 1-17.
- Grill, S., Busenbender, S., Pfeiffer, M., Kohler, U. and Mack, M. (2008). "The bifunctional flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase from *Streptomyces davawensis* produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin." J Bacteriol **190**(5): 1546-1553.
- Grill, S., Yamaguchi, H., Wagner, H., Zwahlen, L., Kusch, U. and Mack, M. (2007). "Identification and characterization of two *Streptomyces davawensis* riboflavin biosynthesis gene clusters." Arch Microbiol **188**(4): 377-387.
- Gusarov, I., Kreneva, R. A., Podcharniaev, D. A., Iomantas Iu, V., Abalakina, E. G., Stoinova, N. V., Perumov, D. A. and Kozlov Iu, I. (1997). "Riboflavin biosynthetic genes in *Bacillus amyloliquefaciens*: primary structure, organization and regulation of activity." Mol Biol (Mosk) **31**(3): 446-453.

- Hanahan, D. (1983). "Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids." J Mol Biol **166**(4): 557-580.
- Hasford, J. and Rizzo, C. (1998). "Linear free energy substituent effect on flavin redox chemistry." J Am Chem Soc **120**(10): 2251-2255.
- Hemberger, S., Pedrolli, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M. and Mack, M. (2011). "RibM from *Streptomyces davawensis* is a riboflavin/roseoflavin transporter and may be useful for the optimization of riboflavin production strains." BMC Biotechnol **11**(1): 119.
- Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W. C., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y. and Tanokura, M. (2006). "Three-dimensional structure of AzoR from *Escherichia coli*. An oxidoreductase conserved in microorganisms." J Biol Chem **281**(29): 20567-20576.
- Ito, K., Nakanishi, M., Lee, W. C., Zhi, Y., Sasaki, H., Zenno, S., Saigo, K., Kitade, Y. and Tanokura, M. (2008). "Expansion of substrate specificity and catalytic mechanism of azoreductase by X-ray crystallography and site-directed mutagenesis." J Biol Chem **283**(20): 13889-13896.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G. and Rees, D. C. (1999). "Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex." Science **284**(5422): 1961-1966.
- Jankowitsch, F., Kuhm, C., Kellner, R., Kalinowski, J., Pelzer, S., Macheroux, P. and Mack, M. (2011). "A novel *N,N*-8-amino-8-demethyl-*D*-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) catalyzing the two terminal steps of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davawensis*." J Biol Chem **286**(44): 38275-38285.
- Jankowitsch, F., Schwarz, J., Ruckert, C., Gust, B., Szczepanowski, R., Blom, J., Pelzer, S., Kalinowski, J. and Mack, M. (2012). "Genome sequence of the bacterium *Streptomyces davawensis* JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseoflavin." J Bacteriol **194**(24): 6818-6827.
- Jeong, H., Barbe, V., Lee, C. H., Vallenet, D., Yu, D. S., Choi, S.-H., Couloux, A., Lee, S.-W., Yoon, S. H., Cattolico, L., Hur, C.-G., Park, H.-S., Ségurens, B., Kim, S. C., Oh, T. K., Lenski, R. E., Studier, F. W., Daegelen, P. and Kim, J. F. (2009). "Genome Sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21(DE3)." J Mol Biol **394**(4): 644-652.
- Juri, N., Kubo, Y., Kasai, S., Otani, S., Kusunose, M. and Matsui, K. (1987). "Formation of roseoflavin from 8-amino- and 8-methylamino-8-demethyl-*D*-riboflavin." J Biochem (Tokyo) **101**(3): 705-711.
- Kil, Y. V., Mironov, V. N., Gorishin, I., Kreneva, R. A. and Perumov, D. A. (1992). "Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region." Mol Gen Genet **233**(3): 483-486.
- Kitagawa, M., Ara, T., Arifuzzaman, M., Ioka-Nakamichi, T., Inamoto, E., Toyonaga, H. and Mori, H. (2005). "Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research." DNA Res **12**(5): 291-299.
- Kohn, L. D. and Kaback, H. R. (1973). "Mechanisms of active transport in isolated bacterial membrane vesicles. XV. Purification and properties of the membrane-bound D-lactate dehydrogenase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **248**(20): 7012-7017.

- Kreneva, R. A. and Perumov, D. A. (1990). "Genetic mapping of regulatory mutations of *Bacillus subtilis* riboflavin operon." Mol Gen Genet **222**(2-3): 467-469.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lee, E. R., Blount, K. F. and Breaker, R. R. (2009). "Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression." RNA Biol **6**(2): 187-194.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H. and Friedrich, T. (1995). "Isolation and characterization of the proton-translocating NADH: ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*." Eur J Biochem **230**(2): 538-548.
- Linster, C. L. and Van Schaftingen, E. (2004). "A spectrophotometric assay of D-glucuronate based on *Escherichia coli* uronate isomerase and mannonate dehydrogenase." Protein Expr Purif **37**(2): 352-360.
- Liu, G., Zhou, J., Fu, Q. S. and Wang, J. (2009). "The *Escherichia coli* azoreductase AzoR is involved in resistance to thiol-specific stress caused by electrophilic quinones." J Bacteriol **191**(20): 6394-6400.
- Liu, G., Zhou, J., Lv, H., Xiang, X., Wang, J., Zhou, M. and Qv, Y. (2007). "Azoreductase from *Rhodobacter sphaeroides* AS1.1737 is a flavodoxin that also functions as nitroreductase and flavin mononucleotide reductase." Appl Microbiol Biotechnol **76**(6): 1271-1279.
- Lopez-Anaya, A. and Mayersohn, M. (1987). "Quantification of riboflavin, riboflavin 5'-phosphate and flavin adenine dinucleotide in plasma and urine by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr **423**: 105-113.
- Lu, Y., Shevtchenko, T. N. and Paulus, H. (1992). "Fine-structure mapping of cis-acting control sites in the lysC operon of *Bacillus subtilis*." FEMS Microbiol Lett **71**(1): 23-27.
- Macheroux, P., Kappes, B. and Ealick, S. E. (2011). "Flavogenomics - a genomic and structural view of flavin-dependent proteins." FEBS J **278**(15): 2625-2634.
- Mansjo, M. and Johansson, J. (2011). "The riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection." RNA Biol **8**(4): 674-680.
- Mansour, N. M., Sawhney, M., Tamang, D. G., Vogl, C. and Saier, M. H. (2007). "The bile/arsenite/riboflavin transporter (BART) superfamily." FEBS J **274**(3): 612-629.
- Massey, V. (1991). In: Flavins and flavoproteins. B. Curti, Ronchi, S. and Zanetti, G. (eds). de Gruyter, Berlin and New York: 59-66.
- Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J. and Hegemann, P. (2009). "*In vivo* generation of flavoproteins with modified cofactors." J Mol Biol **385**(5): 1511-1518.
- Matsui, K., Juri, N., Kubo, Y. and Kasai, S. (1979). "Formation of roseoflavin from guanine through riboflavin." J Biochem (Tokyo) **86**(1): 167-175.
- McIlvaine, T. C. (1921). "A buffer solution for colorimetric comparison." J Biol Chem **49**(1): 183-186.



- Miura, R. (2001). "Versatility and specificity in flavoenzymes: Control mechanisms of flavin reactivity." Chem Rec **1**(3): 183-194.
- Nakanishi, M., Yatome, C., Ishida, N. and Kitade, Y. (2001). "Putative ACP phosphodiesterase gene (*acpD*) encodes an azoreductase." J Biol Chem **276**(49): 46394-46399.
- Oswald, T. and Rinas, U. (1996). "Chloramphenicol resistance interferes with purification of histidine-tagged fusion proteins from recombinant *Escherichia coli*." Anal Biochem **236**(2): 357-358.
- Otani, S., Matsui, K. and Kasai, S. (1997). "Chemistry and biochemistry of 8-aminoflavins." Osaka City Med J **43**(2): 107-137.
- Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S. and Miura, R. (1974). "Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*." J Antibiot (Tokyo) **27**(1): 88-89.
- Ott, E., Stolz, J., Lehmann, M. and Mack, M. (2009). "The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*." RNA Biol **6**(3): 276-280.
- Otto, M. K., Jayaram, M., Hamilton, R. M. and Delbruck, M. (1981). "Replacement of riboflavin by an analogue in the blue-light photoreceptor of *Phycomyces*." Proc Natl Acad Sci U S A **78**(1): 266-269.
- Pedrolli, D. B., Matern, A., Wang, J., Ester, M., Siedler, K., Breaker, R. and Mack, M. (2012). "A highly specialized flavin mononucleotide riboswitch responds differently to similar ligands and confers roseoflavin resistance to *Streptomyces davawensis*." Nucleic Acids Res **40**(17): 8662-8673.
- Pedrolli, D. B., Nakanishi, S., Barile, M., Mansurova, M., Carmona, E. C., Lux, A., Gartner, W. and Mack, M. (2011). "The antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-amino-riboflavin from *Streptomyces davawensis* are metabolized by human flavokinase and human FAD synthetase." Biochem Pharmacol **82**(12): 1853-1859.
- Ryan, A., Laurieri, N., Westwood, I., Wang, C. J., Lowe, E. and Sim, E. (2010). "A novel mechanism for azoreduction." J Mol Biol **400**(1): 24-37.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. (2001). Molecular cloning. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, M. A., Jimenez, A. and Revuelta, J. L. (2000). "Molecular characterization of *FMN1*, the structural gene for the monofunctional flavokinase of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **275**(37): 28618-28624.
- Schmincke-Ott, E. and Bisswanger, H. (1981). "Dihydrolipoamide dehydrogenase component of the pyruvate dehydrogenase complex from *Escherichia coli* K12. Comparative characterization of the free and the complex-bound component." Eur J Biochem **114**(2): 413-420.
- Serganov, A., Huang, L. and Patel, D. J. (2009). "Coenzyme recognition and gene regulation by a flavin mononucleotide riboswitch." Nature **458**(7235): 233-237.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V. and Mann, M. (2006). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**(6): 2856-2860.

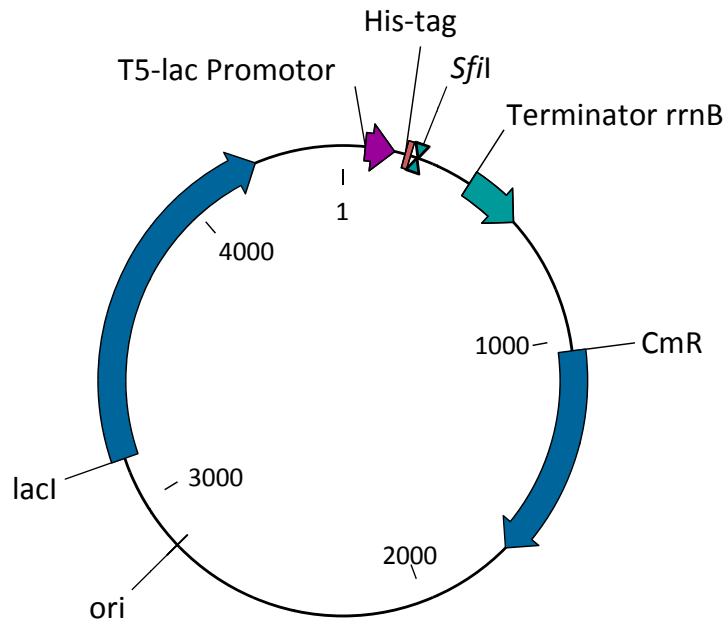
- Shinkai, S., Kameoka, K., Honda, N., Ueda, K., Manabe, O. and Lindsey, J. (1986). "Spectral and reactivity studies of roseoflavin analogs: correlation between reactivity and spectral parameters." Bioorganic chemistry **14**: 119-133.
- Spitzer, E. D., Jimenez-Billini, H. E. and Weiss, B. (1988). "beta-Alanine auxotrophy associated with *dfp*, a locus affecting DNA synthesis in *Escherichia coli*." J Bacteriol **170**(2): 872-876.
- Stahmann, K. P., Revuelta, J. L. and Seulberger, H. (2000). "Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata*, or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production." Appl Microbiol Biotechnol **53**(5): 509-516.
- Sudarsan, N., Cohen-Chalamish, S., Nakamura, S., Emilsson, G. M. and Breaker, R. R. (2005). "Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine." Chem Biol **12**(12): 1325-1335.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(9): 4350-4354.
- Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J., Pictet, R., Tischer, E., Rutter, W. J. and Goodman, H. M. (1977). "Rat insulin genes: construction of plasmids containing the coding sequences." Science **196**(4296): 1313-1319.
- van der Rest, M. E., Frank, C. and Molenaar, D. (2000). "Functions of the membrane-associated and cytoplasmic malate dehydrogenases in the citric acid cycle of *Escherichia coli*." J Bacteriol **182**(24): 6892-6899.
- Vasudevan, S. G., Shaw, D. C. and Armarego, W. L. (1988). "Dihydropteridine reductase from *Escherichia coli*." Biochem J **255**(2): 581-588.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. and Gelfand, M. S. (2002). "Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation." Nucleic Acids Res **30**(14): 3141-3151.
- Vogel, G. (2003). "Ronald Plasterk profile. TV fame and RNA glory." Science **301**(5638): 1311-1312.
- Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stulke, J., Mack, M. and Stolz, J. (2007). "Characterization of riboflavin (vitamin B<sub>2</sub>) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*." J Bacteriol **189**(20): 7367-7375.
- Walsh, C. (1980). "Flavin coenzymes: at the crossroads of biological redox chemistry." Acc Chem Res **13**(5): 148-155.
- Walsh, C., Fisher, J., Spencer, R., Graham, D. W., Ashton, W. T., Brown, J. E., Brown, R. D. and Rogers, E. F. (1978). "Chemical and enzymatic properties of riboflavin analogues." Biochemistry **17**(10): 1942-1951.
- Walz, A. C., Demel, R. A., de Kruijff, B. and Mutzel, R. (2002). "Aerobic sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli* binds to the cytoplasmic membrane through an amphipathic alpha-helix." Biochem J **365**(Pt 2): 471-479.

- Winkler, W. C., Cohen-Chalamish, S. and Breaker, R. R. (2002). "An mRNA structure that controls gene expression by binding FMN." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15908-15913.
- Xayaphoummine, A., Bucher, T. and Isambert, H. (2005). "Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W605-610.
- Yorita, K., Misaki, H., Palfey, B. A. and Massey, V. (2000). "On the interpretation of quantitative structure-function activity relationship data for lactate oxidase." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(6): 2480-2485.
- Zenno, S., Koike, H., Tanokura, M. and Saigo, K. (1996). "Gene cloning, purification, and characterization of NfsB, a minor oxygen-insensitive nitroreductase from *Escherichia coli*, similar in biochemical properties to FRase I, the major flavin reductase in *Vibrio fischeri*." J Biochem **120**(4): 736-744.
- Zheng, Y.-J. and Ornstein, R. L. (1996). "A Theoretical Study of the Structures of Flavin in Different Oxidation and Protonation States." J Am Chem Soc **118**(39): 9402-9408.

## Aus dieser Arbeit entstandene Publikationen

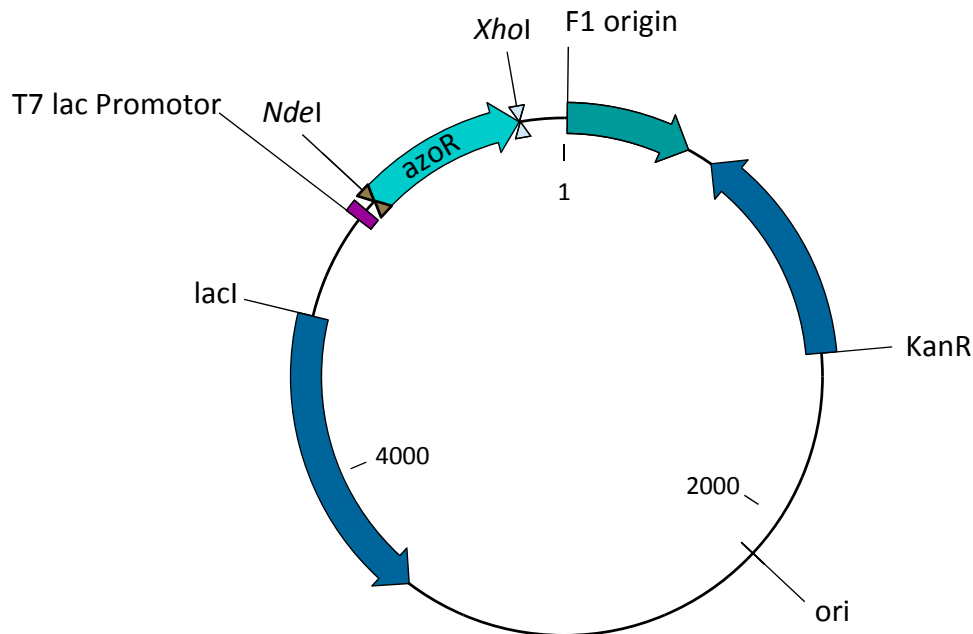
- Langer S.**, Hashimoto M., Hobl B., Mathes T. and Mack M. (2013) "Flavoproteins are cellular targets for the antibiotic roseoflavin in *Escherichia coli*" J Bacteriol
- Langer S.**, Nakanishi S., Mathes T., Knaus T., Binter A., Macheroux P., Mase T., Miyakawa T., Tanokura M., and Mack M. (2013)"The flavoenzyme azobenzene reductase AzoR from *Escherichia coli* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*" Biochemistry 28 28
- Pedrolli D.B., Jankowitsch F., Schwarz J., **Langer S.**, Nakanishi S., Frei E., Mack M. (2013). "Riboflavin analogs as antiinfectives: Occurrence, mode of action, metabolism and resistance." Curr Pharm Des. 19(14):2552-60
- Pedrolli D.B., Jankowitsch F., **Langer S.**, Nakanishi S., Schwarz J., Mathes T. and Mack M. "The antibiotics roseoflavin and 8-amino-riboflavin from *Streptomyces davawensis*: Mechanism of action, resistance and biosynthesis." In: Flavins and Flavoproteins 2011. Proceedings of the Seventeenth International Symposium, Berkeley, USA (Miller, S. ed.) Lulu, Raleigh, NC, USA 515-520.

## 8 Anhang



**Abbildung 8.1: pCA24N-gfp.**

Grundvektor der ASKA-Library. ORFs sind über *SfiI* in das Plasmid integriert und tragen einen N-terminalen His<sub>6</sub>-tag. Das Plasmid trägt eine Chloramphenicolresistenz (CmR) und ist IPTG-induzierbar.



FEATURES	Location/Qualifiers
T7-Promoter	16..59
Gene azoR	103..707
His6-Tag	713..730

## ORIGIN

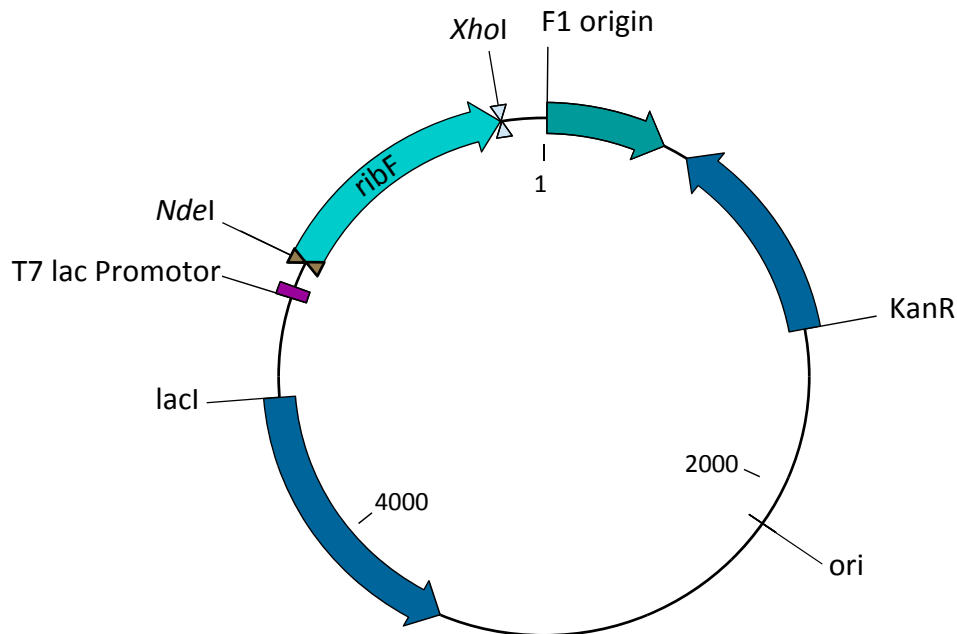
```

1 TCGATCCCGC GAAATTAATA CGACTCACTA TAGGGGAATT GTGAGCGGAT AACAATTCCC
61 CTCTAGAAAT AATTTTGT TT AACTTTAAGA AGGAGATATA CATATGAGCA AGGTATTAGT
121 TCTTAAATCC AGCATCCTGG CAGGGTACTC TCAGTCTAAT CAGTTGTCCG ATTATTTTGT
181 TGAACAATGG CGCGAAAAGC ACTCCGCTGA TGAAATCACC GTTCGCGACC TGGCTGCAAA
241 TCCGATCCG GTACTGGATG GCGAACTGGT TGGCGCTCTG CGTCCGAGCG ATGCGCCGCT
301 GACTCCCGGT CAGCAGGAAG CTCTGGCACT TTCCGATGAG TTGATTGCCG AGCTGAAAGC
361 CCACGACGTT ATCGTTATTG CGGCACCGAT GTATAACTTC AACATCTCGA CTCAGTTGAA
421 AAACATATTT GACCTGGTTG CCCGCGCAGG CGTTACTTTC CGCTATACCG AGAACGGTCC
481 GGAAGGTCTG GTAACGGGTA AAAAAAGCCAT CGTTATTACC AGCCGCGGCG GGATCCACAA
541 AGATGGACCA ACGGACCTGG TGACGCCGTA TCTGTCCACG TTCCTCGGCT TTATCGGCAT
601 TACCGATGTG AAATTTGTCT TCGCCGAAGG GATCGCATA CAGTCCGAAA TGGCAGCGAA
661 AGCACAGTCT GACGCAAAAAG CAGCCATCGA CAGCATTGTT TCTGCACTCG AGCACCACCA
721 CCACCACCAC TGAGATCCGG CTGCTAACAA AGCCCG

```

**Abbildung 8.2: pET24a(+)-azoR.**

Plasmid zur Expression von AzoR mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag. Das Plasmid trägt eine Kanamycinresistenz (KanR) und ist IPTG-induzierbar. In der Sequenz sind der T7-Promotor (grün), das Gen *azoR* (blau) und der His<sub>6</sub>-Tag (rot) markiert. Die verwendeten Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* sind unterstrichen.



FEATURES	Location/Qualifiers
T7-Promoter	34..78
His6-Tag	133..150
Gene ribF	181..1122

## ORIGIN

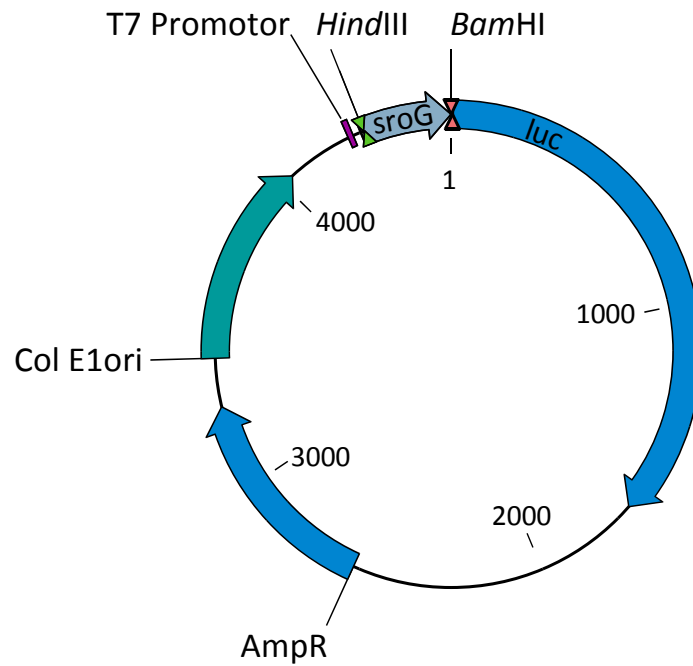
```

1  GCGTAGAGGA TCGAGATCTC GATCCCGCGA AATTAATACG ACTCACTATA GGGGAATTGT
61  GAGCGGATAA CAATTCCCCT CTAGAAATAA TTTTGTTTAA CTTTAAGAAG GAGATATAACC
121 ATGGGCAGCA GCCATCATCA TCATCATCAC AGCAGCGGCC TGGTGCCGCG CGGCAGCCAT
181 ATGAAGCTGA TACGCGGCAT ACATAATCTC AGCCAGGCC CGCAAGAAGG GTGTGTGCTG
241 ACTATTGGTA ATTTTCGACGG CGTGCATCGC GGTCATCGCG CGCTGTTACA GGGCTTGCAG
301 GAAGAAGGGC GCAAGCGCAA CTTACCGGTG ATGGTGATGC TTTTGAACC TCAACCACTG
361 GAACTGTTTG CTACCGATAA AGCCCCGCGA CGGCTGACCC GGCTGCGGGA AAAACTGCGT
421 TACCTTGCAG AGTGTGGCGT TGATTACGTG CTGTGCGTGC GTTTCGACAG GCGTTCGCGC
481 GCGTTAACCG CGCAAATTTT CATCAGCGAT CTTCTGGTGA AGCTTTGCG CGTAAAATTT
541 CTTGCCGTAG GTGATGATTT CCGCTTTGGC GCTGGTCGTG AAGGCGATTT CTTGTTATTA
601 CAGAAAGCTG GCATGGAATA CGGCTTCGAT ATCACCAGTA CGCAAATTTT TTGCGAAGGT
661 GGCGTGCGTA TCAGCAGCAC CGCTGTGCGT CAGGCGCTGG CGGATGACAA TCTGGCTCTG
721 GCAGAAAGTT TACTGGGGCA CCCGTTTGCC ATCTCCGGGC GTGTAGTCCA CGGTGATGAA
781 TTAGGGCGCA CTATAGGTTT CCCGACGGCG AATGTACCGC TACGCCGTCA GGTTCCTCCG
841 GTGAAAGGGG TTTATGCGGT AGAAGTGCTG GGCCTCGGTG AAAAGCCGTT ACCCGGCGTG
901 GCAAACATCG GAACACGCCC AACGTTGTC GGTATTCGCC AGCAGCTGGA AGTGCATTTG
961 TTAGATGTTG CAATGGACCT TTACGGTCGC CATATACAAG TAGTGCTGCG TAAAAAATA
1021 CGCAATGAGC AGCGATTTGC GTCGCTGGAC GAACTGAAAG CGCAGATTGC GCGTGATGAA
1081 TTAACCGCCC GCGAATTTTT TGGGCTAACA AAACCGGCTT AACTCGAGCA CCACCACCAC
1141 CACCACTGAG ATCCG

```

**Abbildung 8.3: pET28a(+)-ribF-NHis.**

Plasmid zur Expression von RibF mit N-terminalem His<sub>6</sub>-Tag. Das Plasmid trägt eine Kanamycinresistenz (KanR) und ist IPTG-induzierbar. In der Sequenz sind der T7-Promotor (grün), das Gen *ribF* (blau) und der His<sub>6</sub>-Tag (rot) markiert. Die verwendeten Schnittstellen *NdeI* und *XhoI* sind unterstrichen.



FEATURES	Location/Qualifiers
-35_signal	40..45
-10_signal	63..68
Aptamer	75..223
Anti-Sequenz	82..90
Terminator Sequestor	266..323
Anti-Sequenz	282..289
RBS	310..316
Gene ribB	327..980

## ORIGIN

```

1 aaggtaagt cataaaccag aattatgtga agctatgCGT tGctgCCgct aatcattagc
61 gttatagtgga atcccttat tctcagggcg gggcgaaatt cccaccgCGc ggtaaataca
121 ctCagttgaa agcccgcgag cGctttgggt gcgaactcaa aggacagcag atccggtgta
181 attccggggc cgacgggttag agtccggatg ggagagagta acgattctgt cgggcatgga
241 ccgctcaccg ttattttggc tatatgCGc cactcctaag actgCCctga tttggtaac
301 cataatttca gtgaggtttt tttaccatga atcagaCGct actttcctct tttggtacgc
361 ctttcgaacg tGttgaaaat gcactggctg cGctgCGtga aggacgCGgt gtaattggtgc
421 ttgatgatga agaccgtgaa aacgaaggtg atatgatctt cccgCGcagaa accatgactg
481 ttgagcagat ggcgctgacc attcgccacg gtagcggtat tGtttgctg tgcattactg
541 aagatcgcCG taaacaactc gatctgCCaa tgatggtaga aaataacacc agcgcctatg
601 gcaccggttt taccgtgacc attgaagcag ctgaaggtgt gactaccggt gttctgCGc
661 ctgaccgtat tacgaccgtt cgcgcagcga ttgCGatgg cGcaaaaccg tcagatctga
721 atcgtcctgg ccacgttttc ccacttcgCG ctcaggcagG tgggtgactg acgCGtgCGc
781 gtcatactga agcaactatt gatctgatga cGctggcagG ctttaaaccg gctggtgtac
841 tGtgtgagct gactaatgac gatggcacga tggcGctgC accagagtgt attgagtttG
901 ccaataaaca caatatggCG ctCGtgacta ttgaagacct ggtggcatac cGtcagGCac
961 atgagcGtaa agccagctga aaaccgctgc ttaatttact gccttaa

```

**Abbildung 8.4: pT7luc<sup>mod</sup>-sroG.**

Plasmid für die Untersuchung des Riboswitches *sroG* im *in vitro* Transkriptions-/Translations-Test bzw. im *in vivo* Testsystem. Das Plasmid trägt das Gen für die Firefly Luciferase (*luc*), eine Ampicillinresistenz (*AmpR*) und ist IPTG-induzierbar. In der Sequenz sind das Aptamer (orange), der Terminator-Sequestor (lila), die Anti-Sequenzen (im Kasten), das -10 (grün) und -35 Signal (grün) markiert. Rot hinterlegt ist der Transkriptionsstart. Das Gen *ribB* ist blau markiert und die RBS unterstrichen.

**Tabelle 8.1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Flavoenzyme aus *Escherichia coli* zur Überproduktion und Beladung mit Cofaktoranaloga.**

Die Plasmide wurden über die ASKA-Library bezogen, die Plasmide mit allen ORFs (open reading frame) aus *E. coli* anbietet (Kitagawa et al. 2005).

Genname	ASKA-Nummer	EC Nummer	Enzymname (englisch)
aroC	JW2326	4.2.3.5	chorismate synthase
azoR	JW1409	1.7.1.6	azobenzene reductase
cysJ	JW2734	1.8.1.2	sulfite reductase (NADPH), alpha-subunit
dadA	JW1178	1.4.99.1	D-amino-acid dehydrogenase
dfp	JW5642	6.3.2.5	phosphopantothenate-cystein ligase
dld	JW2121	1.1.1.28	D-lactate dehydrogenase
fadH	JW3052	1.3.1.34	2,4-dienoyl-CoA reductase (NADPH)
fpr	JW3895	1.18.1.2	ferredoxin-NADP+ reductase
frdA	JW4115	1.3.1.6	fumarate reductase (NADH)
fre	JW3820	1.5.1.30/1.5.1.29	flavin reductase/FMN reductase
gcl	JW0495	4.1.1.47	tartronate-semialdehyde synthase
glf	JW2021	5.4.99.9	UDP-galactopyranose mutase
glpA	JW2235	1.1.99.5	sn-glycerol-3-phosphat dehydrogenase (anaerobic), large subunit
glpD	JW3389	1.1.99.5	sn-glycerol-3-phosphat dehydrogenase (aerobic)
gor	JW3467	1.8.1.7	glutathione reductase
hmp	JW2536	1.14.12.17	nitric oxide dioxygenase
ilvB	JW3646	2.2.1.6	acetolactate synthase I, large subunit
ispH	JW0027	1.17.1.2	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphat reductase
lpd	JW0112	1.8.1.4	dihydrolipoyl dehydrogenase
mdh	JW3205	1.1.3.3	malate dehydrogenase
metF	JW3913	1.5.1.20	methylenetetrahydrofolate reductase [NAD(P)H]
mgo	JW2198	1.1.99.16	malate dehydrogenase
murB	JW3940	1.1.1.158	UDP-N-acetylmuramate dehydrogenase
nadB	JW2558	1.4.3.16	L-aspartate oxidase
ndh	JW1095	1.6.99.3	NADH dehydrogenase
nfnB	JW0567	1.5.1.34	6,7-dihydropteridine reductase
nirB	JW3328	1.7.1.4	nitrite reductase [NAD(P)H]
norV	JW2680	1.18.1.1	rubredoxin-NAD+ reductase
norW	JW2681	1.18.1.1	rubredoxin-NAD+ reductase
nuoF	JW2279	1.6.5.3	NADH dehydrogenase (ubiquinone)



---

pdxH	JW1630	1.4.3.5	pyridoxal 5'-phosphate synthase
poxB	JW0855	1.2.2.2	pyruvate dehydrogenase
putA	JW0999	1.5.99.8	proline dehydrogenase
pyrD	JW0928	1.3.3.1	dihydroorotate oxidase
sdhA	JW0713	1.3.99.1	succinate dehydrogenase, flavoprotein subunit
ssuD	JW0918	1.14.14.5	alkanesulfonate monooxygenase
trxB	JW0871	1.8.1.9	thioredoxin-disulfide reductase
uxaC	JW3063	5.3.1.12	glucuronate isomerase
wrbA	JW0989	1.6.5.2	NADP(H) dehydrogenase (quinone)
ycdH	JW5138	1.14.13.3	4-hydroxyphenylacetate 3-monooxygenase
yieF	JW3691	1.6.5.2	chromate reductase, synonym von NADP(H) dehydrogenase

## 9 Curriculum vitae

### Personalien

Name	Simone Nicole Langer
Geburtsdatum	22.03.84
Geburtsort	Friedrichshafen

### Schule und Hochschulausbildung

07/03	Abitur am Montfort-Gymnasium Tettngang
10/03 - 09/08	Biologiestudium an der Universität Karlsruhe (TH)
03/08 - 09/08	Diplomarbeit mit dem Thema "Vorkommen von Antibiotika-resistenzgenen in Oberflächenwasser und Transport in der Bodenpassage", durchgeführt am Technologiezentrum Wasser (TZW) Karlsruhe
18.09.08	Abschluss als Diplom-Biologin
08/09 - 07/13	Promotion am Karlsruher Institut für Technologie (KIT) mit dem Thema "Flavoenzyme aus <i>Escherichia coli</i> als mögliche Zielmoleküle für das Riboflavinanalogon Roseoflavin aus <i>Streptomyces davawensis</i> "

### Teilnahme an Tagungen und Konferenzen

04/11	VAAM-Jahrestagung in Karlsruhe; Poster "Flavoenzymes of <i>Escherichia coli</i> as targets for the riboflavin analog roseoflavin of <i>Streptomyces davawensis</i> "
10/12	PhD-Symposium "Horizons in Molecular Biology" in Göttingen; Poster "Azor of <i>Escherichia coli</i> as a target for the antibiotic roseoflavin produced by <i>Streptomyces davawensis</i> "

## 10 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Übernahme des Referats und Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Betreuung meiner Arbeit an der Hochschule Mannheim, die Überlassung des Themas und die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Prof. Dr. Masaru Tanokura und seiner Arbeitsgruppe an der Universität Tokio für die Strukturanalyse von AzoR sowie Prof. Dr. Peter Macheroux und Dr. Alexandra Binter von der Universität Graz für die Messung des Redoxpotentials von AzoR.

Dr. Tilo Mathes von der Humboldt-Universität Berlin danke ich für die Bereitstellung der Stämme *E. coli* CpXFMN und CpXFAD und Dr. Masayuki Hashimoto von der Shinshu-Universität in Nagano danke ich für die Bereitstellung von *E. coli* CmpX13  $\Delta$ sroG.

Ich bedanke mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen am Institut für technische Mikrobiologie und am Institut für Biochemie, mit denen ich eine schöne Zeit verbracht habe und die mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden sind.

Ich bedanke mich bei allen Korrekturlesern für ihre Unterstützung.

Und nicht zuletzt danke ich besonders meinen Eltern, die mich immer unterstützt und motiviert haben.