



Untersuchungen zur Funktion von Dodecin  
und zu Protein-Protein-Interaktionen von  
Enzymen der Roseoflavinbiosynthese in  
*Streptomyces davawensis* JCM4913

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

der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften  
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte  
DISSERTATION

von

**Dipl.-Biol. Petra Ludwig**

aus  
Bensheim

Dekan:	Prof. Dr. Willem Klopper
Referent:	Prof. Dr. Reinhard Fischer
Korreferent:	Prof. Dr. Matthias Mack
Tag der mündlichen Prüfung:	19.10.2016



Dieses Werk ist lizenziert unter einer Creative Commons Namensnennung –  
Weitergabe unter gleichen Bedingungen 3.0 Deutschland Lizenz  
(CC BY-SA 3.0 DE): <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/3.0/de/>



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>1 Zusammenfassung</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b> .....	<b>3</b>
2.1 Streptomyzeten und <i>Streptomyces davawensis</i> JCM4913 sowie <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2) .....	3
2.2 Riboflavin und Flavoproteine .....	4
2.3 Das Antibiotikum Roseoflavin aus <i>S. davawensis</i> .....	7
2.4 Das Flavinbindeprotein Dodecin .....	9
2.5 Oxidativer Stress in Bakterien .....	11
2.6 Protein-Protein-Interaktionen .....	14
2.7 Ziele der Arbeit .....	17
<b>3 Material</b> .....	<b>19</b>
3.1 Laborgeräte, Chromatographiesäulen und Verbrauchsmaterial .....	19
3.1.1 Laborgeräte .....	19
3.1.2 Chromatographiesäulen .....	20
3.1.3 Verbrauchsmaterial .....	21
3.2 Chemikalien, Enzyme, Komplettsysteme, Marker und Ladepuffer .....	21
3.2.1 Chemikalien .....	21
3.2.2 Enzyme .....	22
3.2.3 Komplettsysteme, Marker und Ladepuffer .....	22
3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide .....	23
3.3.1 Bakterienstämme .....	23
3.3.2 Plasmide .....	25
3.3.3 Oligonukleotide .....	28
3.4 Programme und Datenbanken .....	32
<b>4 Methoden</b> .....	<b>33</b>
4.1 Mikrobiologische Methoden .....	33
4.1.1 Kultivierung von Mikroorganismen .....	33
4.1.2 Heterologe Überproduktion rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i> Rosetta 2(DE3) und <i>E. coli</i> CpXFMN und CpXFAD .....	35
4.1.3 Überproduktion von Proteinen in <i>B. subtilis</i> .....	35
4.1.4 Überproduktion von Proteinen in Streptomyzeten .....	36
4.1.5 Konservierung von Mikroorganismen .....	36
4.1.6 Bestimmung von Trockenmassen .....	37
4.2 Molekularbiologische Methoden .....	37
4.2.1 Transformation von <i>E. coli</i> .....	37
4.2.2 Transformation von <i>B. subtilis</i> .....	39
4.2.3 Transformation von Streptomyzeten mittels Konjugation .....	40

4.2.4	Isolierung chromosomaler und niedermolekularer DNA .....	40
4.2.5	Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomyzeten.....	41
4.2.6	Polymerase-Kettenreaktion.....	43
4.2.7	Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA ..	47
4.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	47
4.2.9	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Sequenzierung von DNA .	48
4.2.10	Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA .....	48
4.2.11	Disruption von <i>BN159_1333</i> in <i>S. davawensis</i> mit Hilfe des „PCR- <i>targeting</i> “ Systems in Streptomyzeten .....	49
4.3	Biochemische Methoden .....	50
4.3.1	Mechanischer Zellaufschluss.....	50
4.3.2	Chromatographische Trennmethode.....	50
4.3.3	Reinigung von Proteinen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen .	52
4.3.4	Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen .....	55
4.3.5	Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE, nativer Gelelektrophorese und Western Blot .....	55
4.3.6	Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie .....	57
4.3.7	Kristallisation von <i>S. davawensis</i> Dodecin.....	57
4.3.8	Extraktion von Metaboliten .....	58
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>60</b>
5.1	Dodecin.....	60
5.1.1	<i>In vivo</i> -Untersuchungen zur Funktion von <i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecin .....	60
5.1.1.1	Phylogenetische Einordnung von <i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecin ...	60
5.1.1.2	Betrachtung der Genomumgebung des Dodecin-Gens in Actinobakterien	62
5.1.1.3	Das Dodecin-Gen aus <i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> wird in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase exprimiert.....	64
5.1.1.4	Konstruktion einer <i>S. davawensis</i> Dodecin-Disruptionsmutante .....	65
5.1.1.5	Dodecin ist nicht an der Roseoflavinresistenz von <i>S. davawensis</i> beteiligt.....	67
5.1.1.6	Die heterologe Expression des Dodecin-Gens aus <i>S. davawensis</i> führt nicht zu einer Roseoflavinresistenz eines rekombinanten <i>B. subtilis</i> -Stammes .....	68
5.1.1.7	<i>S. davawensis</i> Dodecin moduliert den Flavinstoffwechsel.....	71
5.1.1.8	Dodecin ist in der oxidativen Stressantwort von <i>S. davawensis</i> involviert	72
5.1.1.9	Differentielle Metabolomanalysen unter Plumbaginbehandlung weisen auf eine grundsätzliche Stresstoleranz der <i>S. davawensis</i> Dodecin- Disruptionsmutante hin .....	74
5.1.1.10	Differentielle Transkriptomanalysen unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress.....	74
5.1.2	Biochemische Charakterisierung des <i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecins .....	80
5.1.2.1	<i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecin weisen unterschiedliche Proteinstabilitäten auf .....	80

---

5.1.2.2	<i>S. coelicolor</i> Dodecin ist thermostabil und salzstabil.....	81
5.1.2.3	Analyse der dodecameren Proteinstruktur von Dodecin anhand von <i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecin-Punktmutanten .....	82
5.1.2.4	Roseoflavin stabilisiert die dodecamere Struktur des <i>S. davawensis</i> Dodecins unter denaturierenden Bedingungen.....	88
5.1.2.5	<i>S. davawensis</i> und <i>S. coelicolor</i> Dodecin binden neben FMN und RoF auch RoFMN.....	89
5.1.2.6	Kristallstruktur von <i>S. davawensis</i> Dodecin .....	92
5.2	Die Interaktion von Enzymen der Roseoflavinbiosynthese in <i>S. davawensis</i> .....	95
5.2.1	Die Interaktion von <i>S. davawensis</i> EF-Ts und EF-Tu1 als Kontrolleexperiment der PPI-Nachweismethoden.....	96
5.2.2	Putative PPI der <i>S. davawensis</i> Roseoflavinbiosyntheseenzyme .....	100
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>106</b>
6.1	Untersuchungen zur Funktion und zu biochemischen Eigenschaften von Dodecin.....	106
6.1.1	Die Funktion von Dodecin im Flavinstoffwechsel von <i>S. davawensis</i> ....	106
6.1.2	Dodecin steht unter der Regulation der durch Plumbagin induzierten oxidativen Stressantwort in <i>S. davawensis</i> .....	110
6.1.3	Biochemischer Vergleich der Dodecine von <i>S. davawensis</i> JCM4913 und <i>S. coelicolor</i> A3(2).....	119
6.2	Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der Roseoflavin- biosyntheseenzyme in <i>S. davawensis</i> .....	124
6.2.1	Die Eignung von <i>pull-down</i> , SPINE und TAP zur Untersuchung von PPI in <i>S. davawensis</i> .....	124
6.2.2	Die potentiellen Interaktionspartner der RoF-Biosyntheseenzyme RosA und RosB .....	126
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>145</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Bezeichnung</b>
AF	8-Demethylamino-8-amino-riboflavin
AFP	8-Demethyl-8-amino-riboflavin-5'-phosphat
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
K1, K2	Ionenkanal 1, Ionenkanal 2
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation ( <i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> )
MG	Molekulargewicht
Ni <sup>2+</sup> -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure ( <i>nitrilotriacetic acid</i> )
PA	Polyacrylamid
pFA	Paraformaldehyd
PPI	Protein-Protein-Interaktion(en)
RF	Riboflavin
RoF	Roseoflavin
ROS	Reaktive Sauerstoffderivate ( <i>reactive oxygen species</i> )
SPINE	<i>strep-tag-protein-interaction-experiment</i>
TAP	<i>tandem affinity purification</i>
TOF-MS	Flugzeitmassenspektrometer ( <i>time-of-flight mass spectrometry</i> )

# 1 Zusammenfassung

Dodecin ist das bisher kleinste bekannte Flavoprotein, welches verschiedene Flavinspezies binden kann. Im Archaeon *Halobacterium salinarum* dient es zum einen als Riboflavin (RF)-Speicherprotein und zum anderen zur Regeneration reaktiver Flavinderivate. Obwohl die Strukturen vieler bakterieller Dodecine bekannt sind, wurden bisher keine weiteren Untersuchungen zu deren Funktion publiziert. Das Gram-positive Bakterium *Streptomyces davawensis* JCM4913 ist neben *Streptomyces cinnabarinus* der einzig bekannte Organismus, der das antibiotisch wirksame RF-Analogon Roseoflavin (RoF) produziert. RoF wird intrazellulär durch Flavokinasen und FAD-Synthetasen in die Cofaktoranaloge Roseoflavinmononukleotid (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) umgesetzt. Diese binden anstelle der Cofaktoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) an Flavoenzyme, wodurch diese inhibiert werden. Darüber hinaus bindet und blockiert RoFMN den FMN-RNA-Schalter. Dieses genetische Element steuert in vielen Bakterien die Genexpression der RF-Biosyntheseenzyme und RF-Transporter.

Aufgrund der Tatsache, dass Dodecine verschiedene Flavinspezies binden, wurde in dieser Arbeit die Funktion des Dodecins bezüglich der RoF-Resistenz, der RoF-Biosynthese und des Flavinstoffwechsels in *S. davawensis* untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Dodecin weder an der Synthese noch im Hinblick auf die Resistenz von RoF in *S. davawensis* eine Rolle spielt. Vielmehr zeigten Wachstumsversuche mit einer *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante, dass Dodecin eine Funktion als FMN-Speicherprotein übernimmt. Obwohl vermutet wird, dass sich bakterielle Dodecine weniger zur Regeneration reaktiver Flavinderivate eignen, wurde darüber hinaus eine mögliche Rolle des *S. davawensis* Dodecins in der oxidativen Stressantwort untersucht. Hierzu wurden die Superoxidation-generierenden Agenzien Nitrofurantoin, Paraquat und Plumbagin verwendet. Während *S. davawensis* gegenüber Nitrofurantoin und Paraquat resistent ist, war der *S. davawensis* Wildtyp im Gegensatz zur Dodecin-Disruptionsmutante gegenüber Plumbagin sensitiv. Transkriptomanalysen weisen darauf hin, dass die Expression des Dodecin-Gens durch Plumbagin induzierten oxidativen Stress reguliert wird. Der vermutlich durch erhöhte Flavinbindung verursachte Flavinmangel als auch die durch Plumbagin verursachten Zellschäden könnten Gründe für den gegenüber Plumbagin sensitiven Wildtyp sein. Die während Plumbaginbehandlung wachstumsfähige Dodecin-Disruptionsmutante weist dagegen eine unterschiedliche Stressantwort auf.

Darüber hinaus wurde die Proteinstruktur des *S. davawensis* Dodecins im Rahmen dieser Arbeit gelöst. Die Monomere besitzen eine einfache  $\beta\alpha\beta\beta$ -Topologie und sind zu einem hohlkugelförmigen Dodecamer mit sechs Flavinbindetaschen assoziiert. Es wurde gezeigt, dass das dodecamere Dodecin von *S. davawensis* instabiler ist als das des RoF-sensitiven *Streptomyces coelicolor* A3(2). Die Proteininstabilitäten der Streptomyzeten-Dodecine wurden deshalb anhand von dreizehn *S. davawensis* und vier *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten untersucht. Die Analysen ergaben, dass hauptsächlich die ionische Wechselwirkung zwischen Aspartat 10 und Lysin 62 zur thermischen und salzbedingten Instabilität des dodecameren *S. davawensis* Dodecins führt. Der negative Einfluss von Glutamat 44 auf die ionische Wechselwirkung zwischen Glutamat 41 und Arginin 46 als auch eine gestörte Ionenbindung, ein

asymmetrischer Aufbau sowie eine erhöhte Polarität tragen ebenfalls zur gesteigerten Instabilität des Dodecamers bei. Die Bindung von RoF erhöht dagegen die Stabilität des Dodecamers, welche wahrscheinlich die Folge von schwach elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen der Dimethylaminogruppe von RoF und umgebenden Aminosäuren der Flavinbindetasche ist.

In einem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit wurden mögliche Interaktionen von Enzymen der RoF-Biosynthese als auch eine mögliche Verbindung zwischen Enzymen der RF- und der RoF-Biosynthese mittels Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen in *S. davawensis* untersucht. Hierzu wurden verschiedene auf Affinitätschromatographie beruhende Reinigungsmethoden (*pull-down*, *strep-tag-protein-interaction-experiment* (SPINE) und *tandem affinity purification* (TAP)) angewendet und mit Hilfe des Interaktionsnachweises der Elongationsfaktoren EF-Ts und EF-Tu1 erfolgreich validiert. Obwohl mit den RoF-Biosyntheseenzymen RosA und RosB als Köderproteine weder eine Interaktion untereinander noch mit Enzymen der RF-Biosynthese aufgezeigt werden konnte, wurde dennoch ein lösliches ABC Transporter-Bindeprotein als Untereinheit eines möglichen bisher noch unbekanntes Exporters von RoF identifiziert. Darüber hinaus wurde für die Glutamat-abhängige RoF-Biosynthese das Glutamat-Bindeprotein GluB als neues potentiell Speicherprotein des Aminogruppen-Donors gereinigt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Streptomyzeten und *Streptomyces davawensis* JCM4913 sowie *Streptomyces coelicolor* A3(2)

Streptomyzeten sind Gram-positive, aerobe und nicht motile Saprophyten, die ubiquitär in Böden und marinen Sedimenten zu finden sind. Die zur Ordnung der *Actinomycetales* gehörenden Bakterien zeichnen sich besonders durch eine komplexe Zelldifferenzierung aus, bei der eine einzelne filamentöse Hyphe aus einer Spore auskeimt, sofern die gegebenen Umweltbedingungen günstig sind. Durch Ausbildung weiterer Seitenzweige (*branching*) kann die vegetative Hyphe zu einem stark verzweigten Substratmyzel heranwachsen (Hopwood, 2006). Verschlechtern sich die Wachstumsbedingungen, wächst aus dem vegetativen Substratmyzel ein Luftmyzel heran, indem ein Teil des vegetativen Substratmyzels durch einen programmierten Zelltod-ähnlichen Mechanismus abstirbt (Barka *et al.*, 2016). Die Chromosomen von Streptomyzeten sind meist linear, relativ groß (8 Mb-10 Mb) und zeichnen sich durch einen hohen GC-Gehalt von bis zu 72% aus (Kirby & Carton, 2011). Es ist aus einem zentralen Kernbereich (*core*) mit denen für den Primärmetabolismus essentiellen Genen und dem darin liegenden Replikationsursprung (*oriC*) sowie zwei Chromosomenarmen rechts und links des Kernbereichs aufgebaut. Letztere enthalten Gene, die meist nicht essentiell sind und vorwiegend für die Biosyntheseproteine von Sekundärmetaboliten kodieren. Daneben können Streptomyzeten aber auch zusätzlich lineare oder zirkuläre Plasmide besitzen. Diese tragen meist ebenfalls Gene, die für nicht-essentielle Proteine kodieren. Darunter zählen u. a. Synthesenzyme von Sekundärmetaboliten mit antibiotischer, fungizider, herbizider oder anthelmintischer Wirkung als auch von Sekundärmetaboliten, die als Antitumor-Arzneistoffe oder Immunsuppressiva wirken (Barka *et al.*, 2016). Von allen bisher identifizierten bioaktiven Metaboliten werden 45% von Actinomyzeten produziert, worunter Streptomyzeten mit 76% den Hauptanteil synthetisieren (Bérdy, 2005). Daneben zeichnen sich Streptomyzeten aufgrund ihrer saprophytischen Lebensweise auch besonders dadurch aus, dass sie eine hohe Anzahl an Proteinen sekretieren. Zur Aufnahme unlöslicher Eisenpräzipitate (Fe(III)-Verbindungen) sekretieren Streptomyzeten Siderophore, welches hochaffine Eisen-Chelat-Proteine des Sekundärmetabolismus sind (Challis & Hopwood, 2003). Siderophor-Eisen-Chelatkomplexe werden energieabhängig über ABC-Transporter in die Zelle transportiert, wo diese durch Hydrolyse und/oder Reduktion dissoziieren. Oxidierte Eisenionen (Fe<sup>2+</sup>) werden meist sofort von Bacterioferritinen gebunden und gespeichert (Challis & Hopwood, 2003; Patel *et al.*, 2010). Genom- und Proteomanalysen haben ergeben, dass Streptomyzeten mehr als nur eine Art von Siderophoren produzieren können. *S. coelicolor* produziert beispielsweise Desferrioxamin und Coelichilin (Barona-Gómez *et al.*, 2006). Dabei nutzen einige Streptomyzeten auch Siderophore von anderen Streptomyzeten oder sogar Pilzen, um mit anderen Bodenorganismen konkurrieren zu können (Yamanaka *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2015).

Der in dieser Arbeit untersuchte Stamm *Streptomyces davawensis* JCM4913 wurde 1970 im Verlauf eines *screening*-Programms nach neuen Antibiotika aus einer Bodenprobe in der Nähe von Davao City, Philippinen, isoliert (Shinobu, 1974). Das erst 2012 sequenzierte Genom besteht aus einem linearen Chromosom von ca. 9,5 Mb und einem linearen Plasmid von ca. 89 kb (Jankowitsch *et al.*, 2012). Der durchschnittliche

GC-Gehalt beträgt etwa 71%. Es stellte sich heraus, dass *S. davawensis* zu Beginn der stationären Wachstumsphase ein rötliches Pigment in das Nährmedium abgibt, welches aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Riboflavin (RF, Vitamin B<sub>2</sub>) Roseoflavin (RoF) genannt wurde (Otani *et al.*, 1974). Neben *Streptomyces cinnabarinus* ist *S. davawensis* das bisher einzig bekannte Bakterium, welches RoF produziert (Jankowitsch *et al.*, 2012). Obwohl *S. davawensis* bereits 1970 isoliert und kultiviert werden konnte, wurde bisher nur dessen RF- und RoF-Biosynthese sowie dessen RoF-Resistenzmechanismus untersucht (Otani *et al.*, 1974; Matsui *et al.*, 1979; Grill *et al.*, 2007; Grill *et al.*, 2008; Hemberger *et al.*, 2011; Jankowitsch *et al.*, 2011; Pedrolli *et al.*, 2012; Pedrolli *et al.*, 2015a; Schwarz *et al.*, 2016).

Im Gegensatz dazu ist *Streptomyces coelicolor* A3(2) aufgrund seiner genetischen Manipulierbarkeit und der Fähigkeit rot- und blau-pigmentierte Antibiotika zu produzieren der repräsentative Modellorganismus der Streptomyzeten (Hopwood, 2007). Das Genom von *S. coelicolor* wurde bereits 2002 sequenziert und besteht aus einem ca. 8,7 Mb großen linearen Chromosom mit einem GC-Gehalt von ca. 72% (Bentley *et al.*, 2002). Wie auch *S. davawensis* besitzt *S. coelicolor* ein zusätzliches lineares Plasmid (SCP1), welches 356 kb lang ist (Bentley *et al.*, 2004). Ein kleineres zirkuläres *low-copy* Plasmid (SCP2) von 31 kb dient u. a. der Übertragung von DNA in eine Rezipientenzelle und trägt zudem Gene zur Biosynthese von Antibiotika sowie eines Resistenzmarkers (Schrempf *et al.*, 1975; Bibb *et al.*, 1977; Troost *et al.*, 1979). Neben den rot pigmentierten Prodigininen und dem blau pigmentiertem Actinorhodin synthetisiert *S. coelicolor* auch andere spezielle Metabolite mit antibiotischer Aktivität. Hierzu gehören beispielsweise grau gefärbte Sporenpigmente, das braun pigmentierte Methylenmyocin und ungefärbte Calcium-abhängige ionophore Antibiotika, deren zur Biosynthese nötigen Gencluster auf dem Chromosom und auf SCP1 kodiert sind (Wright & Hopwood, 1976; Rudd & Hopwood, 1979; Lakey *et al.*, 1983; Davis & Chater, 1990; Cerdeño *et al.*, 2001). Genomanalysen ausgewählter Streptomyzeten zeigten, dass *S. coelicolor* mit *S. davawensis* sehr nah verwandt ist (Jankowitsch *et al.*, 2012). Im Gegensatz zu *S. davawensis* ist dieser jedoch gegenüber RoF sensitiv, was beide Stämme für vergleichende Untersuchungen besonders interessant macht.

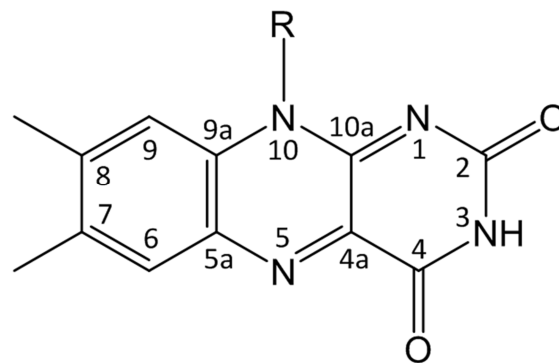
## 2.2 Riboflavin und Flavoproteine

Riboflavin (RF, 7,8-Dimethyl-10-(1'-D-ribityl)-isoalloxazin) wurde erstmals 1879 von A. Wynter Blyth als gelbes Pigment aus Milch isoliert. Die Chemiker Richard Kuhn und Paul Karrer konnten jedoch erst 1934 bzw. 1935 die Struktur des für alle Organismen essentiellen Flavins (Vitamin B<sub>2</sub>) aufklären (Massey, 2000). RF kann von Pflanzen, Pilzen und den meisten Mikroorganismen, darunter auch Streptomyzeten, synthetisiert werden. Tiere und Menschen sowie die Mikroorganismen Spirochäten, Mycoplasmen und Rickettsien sind darauf angewiesen, RF über die Nahrung und verschiedene Transportsysteme aufzunehmen (Vitreschak *et al.*, 2002). Ausgangssubstrate für die RF-Biosynthese sind ein Molekül Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und zwei Moleküle Ribulose-5-phosphat, welche in einer Reihe enzymatischer Reaktionen über eine bifunktionelle GTP-Cyclohydrolase/3,4-Dihydroxy-2-butanon-4-phosphat-Synthase (RibA), eine bifunktionelle RF-spezifische Deaminase/Reduktase (RibG), eine Lumazin-Synthase (RibH) und eine RF-Synthase (RibB) umgesetzt werden (Fischer & Bacher, 2005). Dabei haben Untersuchungen in *Bacillus subtilis* gezeigt, dass die



terminalen Biosyntheseenzyme Lumazin-Synthase und RF-Synthase einen Multienzymkomplex bilden und das sogenannte *substrate channeling* zum Transfer von Intermediaten nutzen (Kis & Bacher, 1995) (siehe auch Kapitel 2.5). Das in der Natur frei vorkommende oder an Proteinen gebundene RF ist ein direktes Vorläufermolekül zur Synthese der Cofaktoren Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadeninindinukleotid (FAD). Die enzymatischen Reaktionen werden nacheinander durch eine Flavokinase und eine FAD-Synthetase katalysiert (Bacher, 1991). Die Biosynthese von RF wird durch die intrazelluläre Konzentration von FMN *feedback*-reguliert. FMN bindet hierbei an den FMN-RNA-Schalter in der 5'-UTR (*untranslated region*) der *rib*-mRNA (*messenger* RNA), was zu einem vorzeitigen Translationsstopp der RF-Syntheseenzyme führt (Vitreschak *et al.*, 2002).

Während bisherige Studien darauf hinweisen, dass RF nur als bevorzugte Speicherform dient, sofern es nicht sofort weiter umgesetzt wird (Monaco, 1997; Grininger *et al.*, 2009; Rao *et al.*, 2016) und biologisch inaktiv zu sein scheint, dienen FMN und FAD als aktive Flavocoenzyme. Enzyme, die Flavine als Cofaktoren verwenden, werden als Flavoenzyme bezeichnet und bilden etwa 0,1-3,5% aller zellulären Proteine (Macheroux *et al.*, 2011). Flavoenzyme sind an einer Reihe verschiedenster Redoxreaktionen und anderer physiologischer Prozesse beteiligt, wie z. B. Energieproduktion (Zellatmung), DNA-Reparatur, Proteinfaltung, Entgiftung, Phototropismus, Biolumineszenz, Apoptose bzw. programmierter Zelltod usw. (Fischer & Bacher, 2005; Joosten & van Berkel, 2007). Doch nur etwa 10% aller Flavoenzyme sind Oxidoreduktasen (Macheroux *et al.*, 2011). Grundstruktur der Flavocoenzyme ist dabei allen das trizyklische Isoalloxazin-Ringsystem (7,8-Dimethylisoalloxazin), das den chromophoren Teil der Flavine darstellt und ihnen die spezifische Farbe und Fluoreszenz verleiht (Abb. 1).



**Abbildung 1: Chemische Grundstruktur des trizyklischen Isoalloxazin-Ringsystems aller Flavine.** Die katalytische Aktivität der Flavine wird durch die Reduktion und Oxidation der Stickstoffatome N(1) und N(5) des Ringsystems gegeben. Flavine unterscheiden sich hauptsächlich durch unterschiedliche Zuckerreste (R) an N(10) voneinander.

Das Ringsystem leitet sich vom Pteridin her und ist ein amphoterisches und amphipatisches Molekül. Der amphipatische Charakter wird durch einen lipophilen aromatischen Dimethylbenzen-Anteil und einen hydrophilen Pyrimidin-Kern hervorgerufen (Edmondson & Ghisla, 1999; Fraaije & Mattevi, 2000). Die reaktiven Angriffspunkte des Isoalloxazin-Ringsystems sind die Stickstoffatome N(1) und N(5), welche ihnen die katalytische Aktivität verleiht. Hierdurch sind sie fähig, Dehydrogenierungen, Ein- und Zwei-Elektronen-Übertragungen, Oxygenierungen und

Hydroxylierungen zu katalysieren sowie Licht zu emittieren (Massey, 1995). Diese Reaktionen sind reversibel und verlaufen dabei über einen radikalen Semiquinon-Zustand (Ghisla & Massey, 1989; Bornemann, 2002). Flavine unterscheiden sich hauptsächlich durch einen Zuckerrest am N(10)-Atom des Isoalloxazin-Ringsystems (Edward, 2014). Bei der Synthese von FMN wird die Ribityl-Seitenkette von RF phosphoryliert, während diese bei der Synthese von FAD zusätzlich mit Hilfe eines weiteren Phosphats aus Adenosintriphosphat (ATP) adenyliert wird. Diese Seitenkette verankert die Flavine in einer tiefen Bindetasche der meisten Proteine, so dass die jeweiligen Reaktionen unter der Proteinoberfläche abseits des umgebenden Lösungsmittels ablaufen können (Edmondson & Ghisla, 1999; Fraaije & Mattevi, 2000). Bei einigen Proteinen werden die aktiven Zentren zusätzlich durch eine flexible Domäne wie einer mobilen Proteinschleife (*loop*) oder Seitenkette verschlossen oder das aktive Zentrum ist als enger Bindungskanal aufgebaut, in dem nur das Substrat nicht jedoch das Lösungsmittel Platz hat (Fraaije & Mattevi, 2000). Das Redoxpotential der proteingebundenen Flavine kann dabei im Vergleich freier Flavine (-200 mV) sehr variieren (-400 mM bis +60 mM). Dies hängt davon ab, ob die Flavine kovalent oder nicht-kovalent gebunden sind und welche Ladung und Hydrophobizität die Flavinbindetasche aufweist (Fraaije & Mattevi, 2000). Nur etwa 10% der Flavocoenzyme sind kovalent gebunden, wobei dies meist nur für FAD der Fall ist (Mewies *et al.*, 1998; Macheroux *et al.*, 2011). Der Vorteil der enzymgebundenen Flavocoenzyme FMN und FAD ist, dass diese im Enzym selbst wieder nach Reduktion regeneriert werden können. Andere Elektronen-Überträger wie Nicotinamidadeninucleotid (NAD) oder Nicotinamidadeninucleotidphosphat (NADP) müssen von einem weiteren Enzym reoxidiert werden (Ghisla & Massey, 1989). Als Vermittler zwischen Zwei- und Ein-Elektronen-Überträgern spielen Flavocoenzyme darüber hinaus eine wichtige Rolle im Elektronentransfer der Zellatmung, der Photosynthese und in vielen Oxygenase-Systemen. Beispiele hierfür sind die Phthalat-Dioxygenase-Reduktase aus *Pseudomonas cepacia* und die im Endoplasmatischen Reticulum lokalisierte NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (Gassner *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1997; Miura, 2001). In zwei einzelnen Schritten werden die Elektronen von reduziertem NADH/NADPH (+ H<sup>+</sup>) auf ein Eisen-Schwefel-Zentrum bzw. eine Häm-Gruppe transferiert, die jeweils immer nur ein Elektron aufnehmen können.

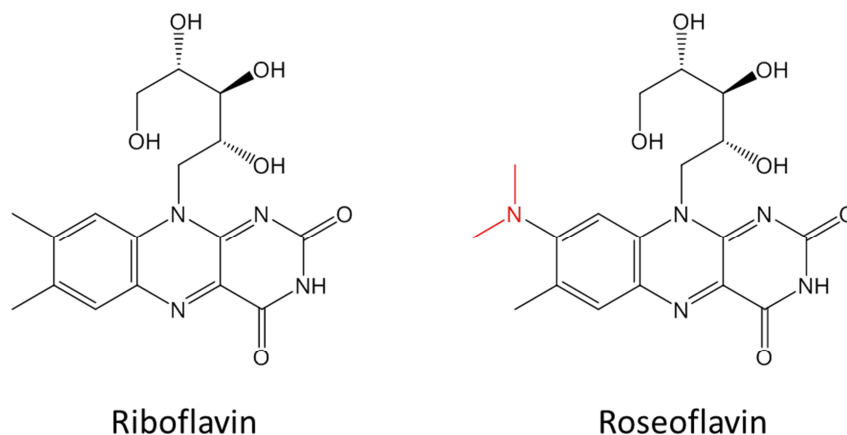
Flavocoenzyme sind aber auch in einigen Photorezeptoren zu finden, die auf UV-A/Blau Licht im Bereich von 320-500 nm reagieren (Christie *et al.*, 2012). Als Chromophor ist hierbei FMN in Proteinen mit LOV-Domänen (*Light, Oxygen, or Voltage sensing*) gebunden, während FAD in Proteinen mit BLUF-Domänen (*Blue-Light-Utilizing FAD*) gebunden wird. Beiden Domänen ist gemein, dass sie abhängig vom Redoxzustand der Flavocoenzyme unter Lichtanregung eine Konformationsänderungen durchlaufen, die andere Proteindomänen aktivieren, wie z. B. Histidin-Kinasen, DNA-Bindedomänen und Phosphodiesterasen (Becker *et al.*, 2011; Christie *et al.*, 2012). Hierdurch werden Gene und Proteine reguliert, die u. a. für den Phototropismus, die Öffnung von Blattstomata, die lichtinduzierte Chloroplastenbewegung, das Pflanzenwachstum unter schwachem Licht oder die zirkadiane Uhr zuständig sind (Fischer & Bacher, 2008; Christie *et al.*, 2012). FMN wird in LOV-Domänen von fünf antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und zwei  $\alpha$ -Helices eingefasst. In der BLUF-Domänen-Grundstruktur sind zwei  $\alpha$ -Helices gegenüber einem Gerüst aus  $\beta$ -Faltblättern angeordnet. Während der Hauptanteil des Adenosins von FAD in Richtung

Proteinoberfläche weist, wird das Isoalloxazin-Ringsystem zwischen den  $\alpha$ -Helices eingespannt. Die Regeneration des jeweiligen Grundzustands kann für beide Domänen zwischen zehn Sekunden und mehreren Minuten andauern. Phototropine wie NPH1 aus *Arabidopsis thaliana* waren die ersten Proteine mit LOV-Domänen, die identifiziert wurden, während AppA aus *Rhodobacter sphaeroides* der erste Photorezeptor mit BLUF-Domäne war (Huala *et al.*, 1997; Christie *et al.*, 1998; Christie *et al.*, 1999; Masuda & Bauer, 2002).

Andere Flavoenzyme verwenden Flavocoenzyme zur Übertragung von Photonen. Beispiele hierfür sind DNA-Photolyasen, die eine wichtige Rolle in der lichtabhängigen DNA-Reparatur spielen, als auch bakterielle Luciferasen, die für die Biolumineszenz von Organismen zuständig sind (Miura, 2001; Greer & Szalay, 2002; Dunlap, 2014). Letztere katalysieren unter oxischen Bedingungen die Oxidation von reduziertem FMN und langkettigen aliphatischen Aldehyden. Hierdurch wird neben der Bildung von Wasser und Fettsäuren blau-grünes Licht mit einer Wellenlänge von 490 nm emittiert. Das oxidierte FMN wird anschließend durch eine NADH:FMN-Oxidoreduktase regeneriert und steht für eine neue Luciferase-Reaktion zur Verfügung (Dunlap, 2014).

### 2.3 Das Antibiotikum Roseoflavin aus *S. davawensis*

Roseoflavin (RoF, 8-Dimethylamino-8-demethyl-D-riboflavin) ist ein Derivat von RF, welches sich nur durch eine zusätzliche Dimethylamino-Gruppe am C(8)-Atom des Isoalloxazin-Ringsystems unterscheidet (Abb. 2). Neben Bacimethrin (Vitamin B<sub>1</sub>-Analogon) und Ginkgotoxin (Vitamin B<sub>6</sub>-Analogon) ist es das einzig bekannte natürlich vorkommende Vitaminanalogon mit antibiotischer Aktivität (Nishimura & Tanaka, 1963; Otani *et al.*, 1974; Fiehe *et al.*, 2000; Cooper *et al.*, 2014).



**Abbildung 2: Chemische Strukturen von Riboflavin und Roseoflavin.** Roseoflavin unterscheidet sich von Riboflavin nur durch eine zusätzliche Dimethylamino-Gruppe am C(8) des Isoalloxazin-Ringsystems.

*S. davawensis* und *S. cinnabarinus* sind bisher die einzig bekannten Mikroorganismen, die fähig sind, RoF zu produzieren (Jankowitsch *et al.*, 2012). Bereits 1979 konnte mit Hilfe von Fütterungsexperimenten anhand von radioaktiv-markiertem RF gezeigt werden, dass RoF aus RF synthetisiert wird (Matsui *et al.*, 1979). Die Beigabe von erhöhten RF-Mengen in das Nährmedium von *S. davawensis* stimulierte zudem die

RoF-Produktion (Schwarz *et al.*, 2016). Neueste Studien haben ergeben, dass FMN und nicht RF das Vorläufermolekül der RoF-Biosynthese ist (Jhulki *et al.*, 2016; Schwarz *et al.*, 2016). Hierbei wird FMN in Anwesenheit des Cofaktors Thiamin und des Aminogruppen-Donors Glutamat unter oxidischen Bedingungen mit Hilfe einer 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphatsynthase (RosB) in 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat (AFP) umgesetzt (Schwarz *et al.*, 2016). Eine bisher noch nicht identifizierte Phosphatase dephosphoryliert AFP zu 8-Demethylamino-8-aminoriboflavin (AF). RosA, welches zunächst das erste identifizierte Enzym der RoF-Biosynthese war und eine S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Dimethyltransferase ist, katalysiert schließlich die bereits 1987 analysierten Reaktionsschritte von AF über 8-Demethyl-8-methylaminoriboflavin (MAF) zur RoF (Juri *et al.*, 1987; Jankowitsch *et al.*, 2011). Interessant dabei ist, dass die für die RoF-Biosyntheseenzyme kodierenden Gene *rosA* und *rosB* im Genom von *S. davawensis* nicht in einem Gencluster vorliegen, wie es beispielsweise für die meisten Syntheseenzyme von Antibiotika der Fall ist (Ohnuki *et al.*, 1985; Vara *et al.*, 1989; Yanai & Murakami, 2004; Li *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2009; Schwarz *et al.*, 2016).

Untersuchungen zur antibiotischen Wirksamkeit von RoF haben gezeigt, dass nur Bakterien gegenüber dem RF-Analogen sensitiv sind, die ein Flavinaufnahmesystem besitzen (Vogl *et al.*, 2007). Hierzu zählen beispielsweise *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* aber auch andere Streptomyzeten wie *S. coelicolor*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces albus* und *Streptomyces avermitilis* (Otani *et al.*, 1974; Pedrolli *et al.*, 2012). Bei den Flavinaufnahmesystemen handelt es sich vorwiegend um RF-Transporter, die unter Bakterien weit verbreitet sind (Gutiérrez-Preciado *et al.*, 2015). Die normalerweise aus RF die Cofaktoren FMN und FAD produzierenden Enzyme Flavokinase und FAD-Synthetase sind ebenfalls in der Lage, RoF in die Flavinanaloga Roseoflavinmononukleotid (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) umzuwandeln (Grill *et al.*, 2008; Pedrolli *et al.*, 2011). Diese Cofactoranaloga können ebenso wie die natürlichen Cofaktoren FMN und FAD an Flavoenzyme binden und diese inhibieren (Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Die Azobenzen-Reduktase AzoR aus *Escherichia coli* bindet beispielsweise RoFMN mit höherer Affinität als FMN, wodurch deren Aktivität um 70% reduziert wird (Langer & Nakanishi *et al.*, 2013). RoFMN bindet darüber hinaus an den FMN-RNA-Schalter der *rib*-mRNA und verursacht hierdurch eine RF-Auxotrophie (Lee *et al.*, 2009; Ott *et al.*, 2009; Pedrolli *et al.*, 2012). Die antibiotische Wirksamkeit von RoF bzw. dessen Cofactoranaloga ist deshalb auf ihre vielseitigen Angriffspunkte zurückzuführen. *S. davawensis* ist jedoch gegenüber seines eigenen Antibiotikums RoF resistent, obwohl dieser ebenfalls einen FMN-RNA-Schalter in der 5'-UTR der *rib*-mRNA aufweist. Sequenz- und Mutationsanalysen wiesen nach, dass ein einzelnes Nukleotid (A61) in der Sequenz des *S. davawensis* FMN-RNA-Schalters für die RoF-Resistenz verantwortlich ist (Pedrolli *et al.*, 2012). Im Gegensatz zum *S. coelicolor* FMN-RNA-Schalter bindet der *S. davawensis* FMN-RNA-Schalter RoFMN nicht, wodurch die RF-Biosynthese weiterhin durch intrazelluläres FMN reguliert werden kann. Da, wie bereits erwähnt, jedoch auch die *S. davawensis* Flavokinase und FAD-Synthetase RoF zu RoFMN und RoFAD umsetzt (Grill *et al.*, 2008), ist nicht auszuschließen, dass auch zelleigene Flavoenzyme von *S. davawensis* durch die Cofactoranaloga inhibiert werden. RoF wird unter Laborbedingungen von *S. davawensis* zu Beginn der spät exponentiellen bzw. früh stationären Wachstumsphase mit steigender Konzentration (bis 21 µM) in den

Überstand des Nährmediums abgegeben (Schwarz *et al.*, 2016). Es wird daher angenommen, dass ein bisher noch unbekannter RoF-Exporter dafür sorgt, dass RoF aus der Zelle transportiert wird, bevor dieses in RoFMN und RoFAD umgesetzt werden kann (Jankowitsch *et al.*, 2012).

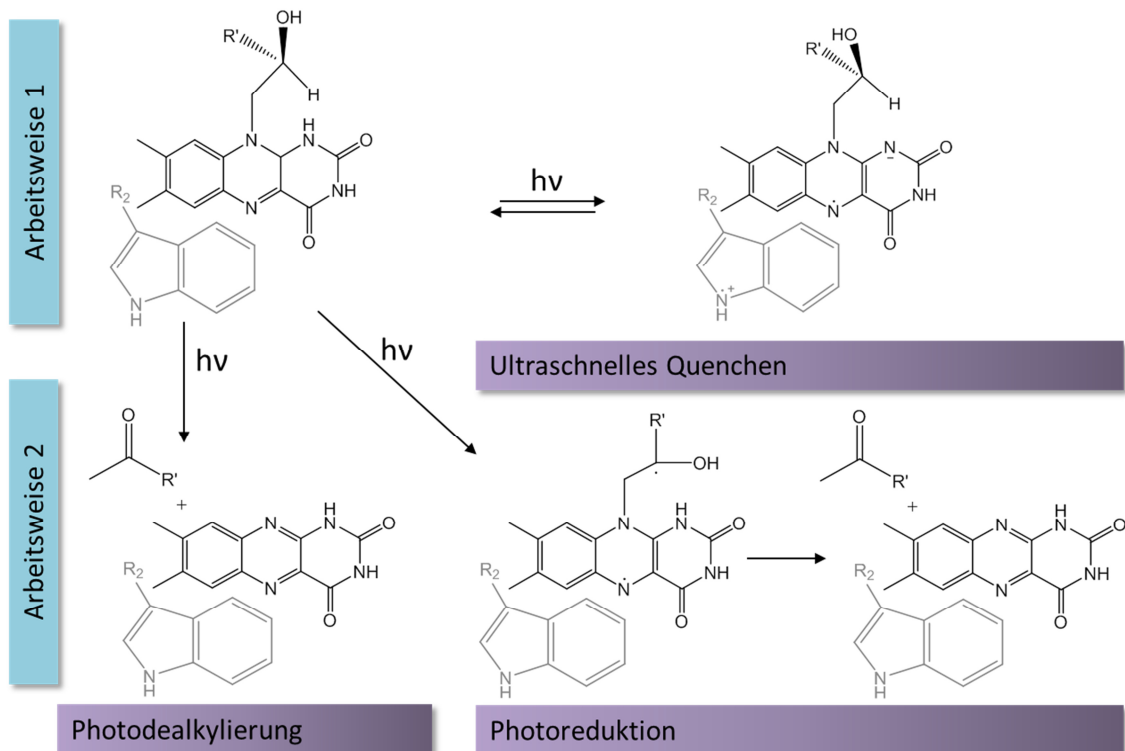
## 2.4 Das Flavinbindeprotein Dodecin

Dodecine sind mit 68-73 Aminosäuren die bisher kleinsten bekannten Proteine, die Flavine binden. Genomanalysen ergaben, dass Dodecine nur in einigen Bodenbakterien, pathogenen Bakterien als auch Archaeen vertreten sind (Grininger *et al.*, 2009). Die erst 2003 entdeckten Dodecine weisen alle trotz Zugehörigkeit zu verschiedenen Lebensdomänen eine hohe Strukturähnlichkeit auf. Die monomere Untereinheit ist aus drei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer  $\alpha$ -Helix aufgebaut ( $\beta_1\alpha\beta_2\beta_3$ ), die sich über Interaktionen des  $\beta_2$ -Faltblatts zu einem Trimer anordnen können. Vier Trimere können sich bei Bindung von Flavinen und über Interaktionen des  $\beta_1$ -Faltblatts zu einer dodecameren Struktur anordnen, die eine fast perfekte hohlförmige Kugel bilden (Bieger *et al.*, 2003; Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a).

Dodecine sind im Gegensatz zu anderen Flavoproteinen in der Lage, viele verschiedene Flavine zu binden, wie z. B. RF, FMN, FAD, Lumichrom, Lumiflavin sowie das von *S. davawensis* produzierte RoF (Grininger *et al.*, 2006a; Grininger *et al.*, 2006b; Meissner *et al.*, 2007; Grininger *et al.*, 2009; Mathes *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011a). Dies liegt daran, dass die Bindung der Flavine in der Dodecin-Bindetasche hauptsächlich über das Isoalloxazin-Ringsystem und nahezu unabhängig vom Substituenten am N(10) verläuft (Grininger *et al.*, 2008). Dennoch haben Untersuchungen ergeben, dass archaeale Dodecine bevorzugt RF und bakterielle Dodecine bevorzugt FMN binden (Meissner *et al.*, 2007; Grininger *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011a). Die Bindung von RF als prosthetische Gruppe war bis vor kurzem jedoch nur in Eukaryoten bekannt (Barquera *et al.*, 2002). Die Isoalloxazin-Ringsysteme der Flavine werden dabei in der Dodecin-Bindetasche zwischen zwei konservierten Tryptophanen zweier benachbarter Monomere antiparallel angeordnet gebunden, so dass sie Teil einer aromatischen Tetrade sind. Mit einem Protein-Flavinbindungsverhältnis von 1:1 weisen Dodecine somit die höchste Flavinbeladung aller bisher bekannten Flavoproteine auf. FAD wird im Gegensatz zu anderen Flavinen jedoch in einem Bindungsverhältnis von 1:2 gebunden. Hierbei bilden das Isoalloxazin-Ringsystem und der Adenosylrest von FAD in einer gestapelten Anordnung mit den konservierten Tryptophanen die aromatische Tetrade (Grininger *et al.*, 2006b). Dodecine binden Flavine dabei nur in der oxidierten Form und geben diese wieder frei, wenn diese reduziert sind (Grininger *et al.*, 2008). Darüber hinaus ist das *Thermus thermophilus* Dodecin ebenfalls in der Lage, neben FMN auch Coenzym A zu binden (Meissner *et al.*, 2007). Aufgrund der verschiedenen Flavinaffinitäten und bifunktionellen Bindungseigenschaften wird daher vermutet, dass archaeale und bakterielle Dodecine möglicherweise unterschiedliche Funktionen übernehmen.

Untersuchungen in *H. salinarum* haben darauf hingewiesen, dass Dodecin in Archaeen zu Beginn ungünstiger Wachstumsbedingungen als potentiell RF-Speicherprotein fungiert. Verbessern sich die Bedingungen, wird RF wieder zur Synthese von FMN und FAD frei gegeben (Grininger *et al.*, 2009). Bisher wurde angenommen, dass sogenannte RF-Bindeproteine nur zur Speicherung von RF zuständig sind (Ushijima *et al.*, 1989).

Grininger *et al.* zeigten jedoch, dass das *H. salinarum* Dodecin darüber hinaus auch in der Aufgabe involviert ist, die Zelle als „RF-Falle“ vor lichtinduzierten reaktiven RF-Derivaten zu schützen (Grininger *et al.*, 2009). Indem das Isoalloxazin-Ringsystem von RF tief in der Bindetasche von Dodecin gebunden wird, kann das angeregte RF im Inneren des Dodecins durch Quenchen wieder in seinen Grundzustand überführt werden. Hierbei findet höchstwahrscheinlich ein Elektronentransfer vom konservierten Tryptophan auf N(5) des Isoalloxazin-Ringsystems mit einem gekoppelten Protonentransfer von umgebenden Wassermolekülen statt (Staudt *et al.*, 2012). Die Rückübertragung von Elektron und Proton führt anschließend wieder zum anfänglichen Grundzustand des Flavins als auch des Tryptophans. Dies konnte nicht nur bereits für RF-Bindeproteine sondern auch für andere Flavoproteine mit BLUF-Domäne oder Cryptochrome und DNA-Photolyasen gezeigt werden (Gauden *et al.*, 2007; Mataga *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2011b).



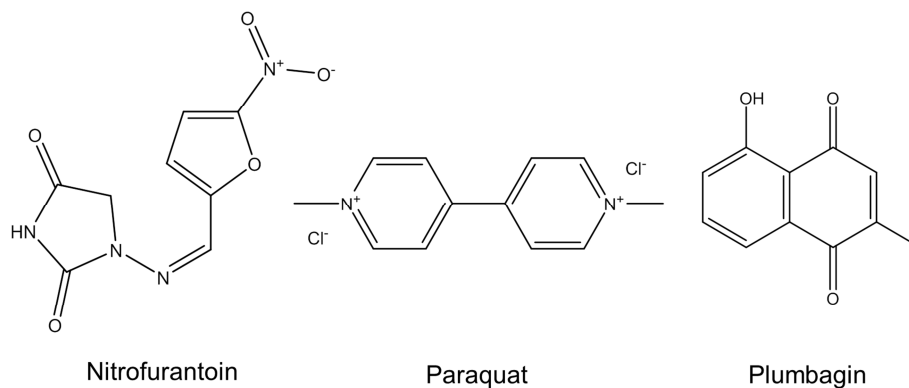
**Abbildung 3: Abbau lichtinduzierter reaktiver Riboflavin (RF)-Derivate in *H. salinarum* Dodecin (Grininger *et al.*, 2009).** Nach Bindung des angeregten RF-Moleküls wird dessen Grundzustand wieder erreicht, indem das zu quenchende Elektron über den Indolrest des Isoalloxazin-Ring-bindenden Tryptophans in der Bindetasche von Dodecin abgeleitet wird (Arbeitsweise 1). In einer für die Zelle neutralen und zum Quenchen parallel stattfindenden Reaktion kann das angeregte RF-Molekül auch entweder durch Photodealkylierung oder Photoreduktion zu Lumichrom abgebaut werden (Arbeitsweise 2).

In einer zweiten zum Quenchen parallel stattfindenden Reaktion kann das angeregte RF im archaealen Dodecin auch durch gerichtete Photoreduktion oder Photodealkylierung zu Lumichrom abgebaut werden. Da Lumichrom von *H. salinarum* Dodecin mit höherer Affinität als RF gebunden wird, ist diese Reaktion für die Zelle neutral (Grininger *et al.*, 2009). Der Wirkmechanismus des *H. salinarum* Dodecins ist in Abbildung 3 dargestellt. Obwohl Dodecine bereits von biotechnologischem Interesse sind und beispielsweise als potentielle Arzneimittel- und Chemikalientransporter bzw. zur Herstellung von

Oberflächen mit elektrochemisch veränderbaren Eigenschaften untersucht werden (Grininger *et al.*, 2008; Nöll *et al.*, 2009; Gutiérrez Sánchez *et al.*, 2015), wurden bisher keine *in vivo*-Untersuchungen zur Funktion bakterieller Dodecine durchgeführt. Vergleichende Strukturanalysen gaben jedoch Hinweis darauf, dass bakterielle Dodecine FMN weniger effizient quenchen als archaeale Dodecine RF (Staudt *et al.*, 2012). Dennoch wird angenommen, dass Dodecine aufgrund ihres weit verbreiteten Vorkommens in pathogenen Bakterien und Bodenbakterien im Allgemeinen neben der Funktion Flavine zu speichern, auch im Schutz vor radikalem oder oxidativem Stress involviert sein könnten (Bieger *et al.*, 2003).

## 2.5 Oxidativer Stress in Bakterien

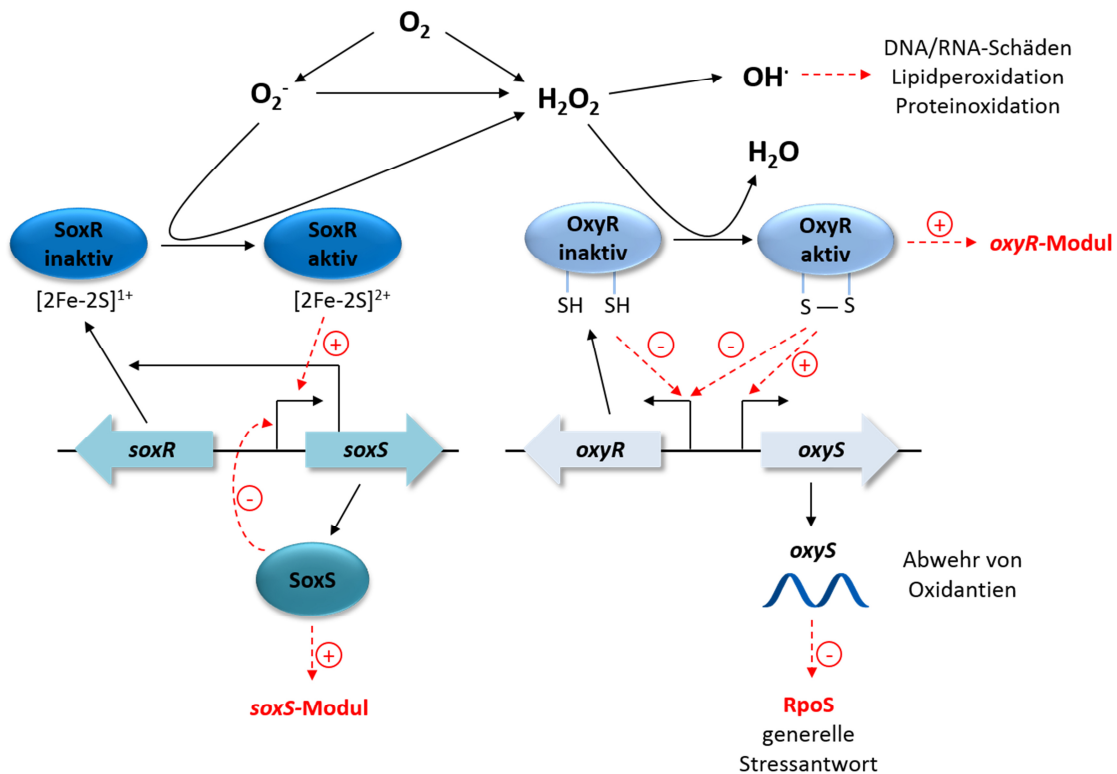
Die aerobe Lebensweise von Bakterien hat immer zur Folge, dass toxische und hoch reaktive Sauerstoffderivate (*reactive oxygen species*, ROS) als Nebenprodukte der aeroben Atmung oder der Oxidation von Nährstoffen zur Energiegewinnung entstehen. Darunter zählen Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ), das Superoxidanionradikal ( $\text{O}_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und das Hydroxylradikal ( $\text{OH}^\cdot$ ). In *Escherichia coli* werden beispielsweise 87% der gesamten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration durch die Atmungskette produziert (González-Flecha & Demple, 1995). Aber auch extrazelluläre Stimuli können oxidativen Stress auslösen. Hierzu gehören vor allem Licht aber auch beispielsweise  $\text{O}_2^-$ -generierende Chemikalien wie Paraquat (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridinium), Nitrofurantoin ((*E*)-*N*-(5-Nitro-2-furfuryliden)-1-aminohydantoin) oder das vom Bleiwurz synthetisierte Plumbagin (5-Hydroxy-2-methyl-1,4-naphthochinon) (Abb. 4).



**Abbildung 4: Chemische Strukturen der Superoxidanionradikal-generierenden Oxidantien Nitrofurantoin, Paraquat und Plumbagin.**

Die Toxizität von ROS wird hauptsächlich durch DNA/RNA-Schäden, Lipidperoxidation und Proteinoxidation hervorgerufen (Cabiscol *et al.*, 2000). Um dem entgegen zu wirken und die Schäden so gering wie möglich zu halten, reagieren Bakterien mit verschiedenen komplexen genetischen Antworten sowie Abwehrmechanismen auf den durch ROS induzierten oxidativen Stress. Besonders relevant sind hierbei das OxyR-Regulon und das SoxRS-System, welche durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw.  $\text{O}_2^-$  induziert werden (Abb. 5). Das dimere OxyR ist ein transkriptionales Regulatorprotein mit zwei intramolekular konservierten Cysteinen pro Monomer, die unter oxidativen Bedingungen eine Disulfidbrücke ausbilden. Das oxidierte OxyR aktiviert die

Expression von etwa 20-30 Genen, deren Produkte in der Schutzfunktion gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  involviert sind. Hierzu gehören beispielsweise die Gene von Katalasen (*katG*), Glutathion-Reduktasen (*gorA*), Alkylhydroperoxid-Reduktasen (*ahpCF*), DNA-Bindeproteinen sowie auch das Gen der regulatorischen RNA *oxyS*. Letztere steuert wiederum die Translation des Sigmafaktors RpoS, welcher die generelle Stressantwort in Bakterien reguliert. Während in *E. coli* die OxyR vermittelte Stressantwort durch die OxyR-Reduktion mittels Glutharedoxin 1 attenuiert wird, reguliert OxyR in *S. coelicolor* seine Genexpression selbst (den Hengst & Buttner, 2008). Das Regulatorprotein SoxR wird aktiviert, indem ein intramolekulares Eisen-Schwefel-Zentrum durch  $\text{O}_2^-$  oxidiert wird. SoxR induziert daraufhin die Genexpression des zweiten Regulators SoxS, welcher in *E. coli* über 100 Gene induziert, die ebenfalls Schutzproteine kodieren (Blanchard *et al.*, 2012). Beispiele hierfür sind die Superoxid-Dismutase (*sodA*), das DNA-Reparaturprotein Endonuklease IV (*nfo*), Fumarase C (*fumC*) und Aconitase (*acnA*).

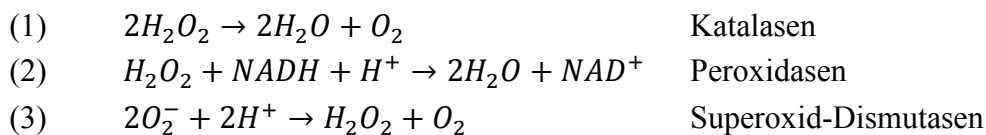


**Abbildung 5: SoxRS- und OxyRS-Regulationssystem als Antwort auf oxidativen Stress in Bakterien (abgewandelt nach Lengeler *et al.*, 1999).** Superoxidanionradikale ( $\text{O}_2^-$ ) aktivieren den Transkriptionsfaktor SoxR, der die Expression von *soxS* reguliert. Durch Autoregulation reprimiert SoxS seine eigene Expression und aktiviert zudem weitere Proteine des *soxS*-Moduls. Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) aktiviert den Transkriptionsfaktor OxyR, welcher die Expression von Genen des *oxyR*-Moduls und der *oxyS* RNA reguliert. Die regulatorische *oxyS* RNA reguliert die Translation des Sigmafaktors RpoS und verbindet so die oxidative Stressantwort mit der generellen Stressantwort. Für die mittels Fenton-Reaktion aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  entstehenden und sehr reaktiven Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\cdot$ ) gibt es keine bakterielle Stressantwort.



Der Transkriptionsfaktor Fur (*ferric uptake regulator*) wird von beiden Regulationssystemen aktiviert (Zheng *et al.*, 1999). Fur nutzt oxidierte Eisenionen ( $\text{Fe}^{2+}$ ) als Corepressor und reguliert selbst wiederum die Genexpression weiterer in der oxidativen Stressantwort involvierten Proteine. *S. coelicolor* weist insgesamt vier Fur-ähnliche Proteine auf, die u. a. Gene von Katalasen und drei Superoxid-Dismutasen regulieren (den Hengst & Buttner, 2008). Da intrazelluläres  $\text{Fe}^{2+}$  mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  über eine Fenton-Reaktion zur Bildung von sehr reaktivem  $\text{OH}^\cdot$  führt, reprimiert Fur unter oxidativen Bedingungen auch die Genexpression von Siderophoren (Cornelis *et al.*, 2011). Für dennoch entstehendes  $\text{OH}^\cdot$  gibt es kein spezifisches Sensorsystem. Diese Radikale sind so reaktiv, dass sie sofort Proteine, Lipide oder Nukleinsäuren schädigen, die sich in näherer Umgebung befinden. Um intrazelluläres  $\text{Fe}^{2+}$  deshalb der Fenton-Reaktion zu entziehen, wird über Siderophore importiertes Eisen sofort von Bacterioferritin oder Ferritin gebunden (Cabiscol *et al.*, 2000).

Durch vorzeitigen Abbau von  $\text{O}_2^-$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  mittels spezieller Enzyme soll ebenfalls die Bildung von schädlichem  $\text{OH}^\cdot$  verhindert werden. Katalasen, Peroxidasen und Superoxid-Dismutasen bauen ROS hierbei zu Wasser, Sauerstoff und für die Zelle weniger schädlichem  $\text{H}_2\text{O}_2$  ab (Reaktionsgleichungen 1-3).



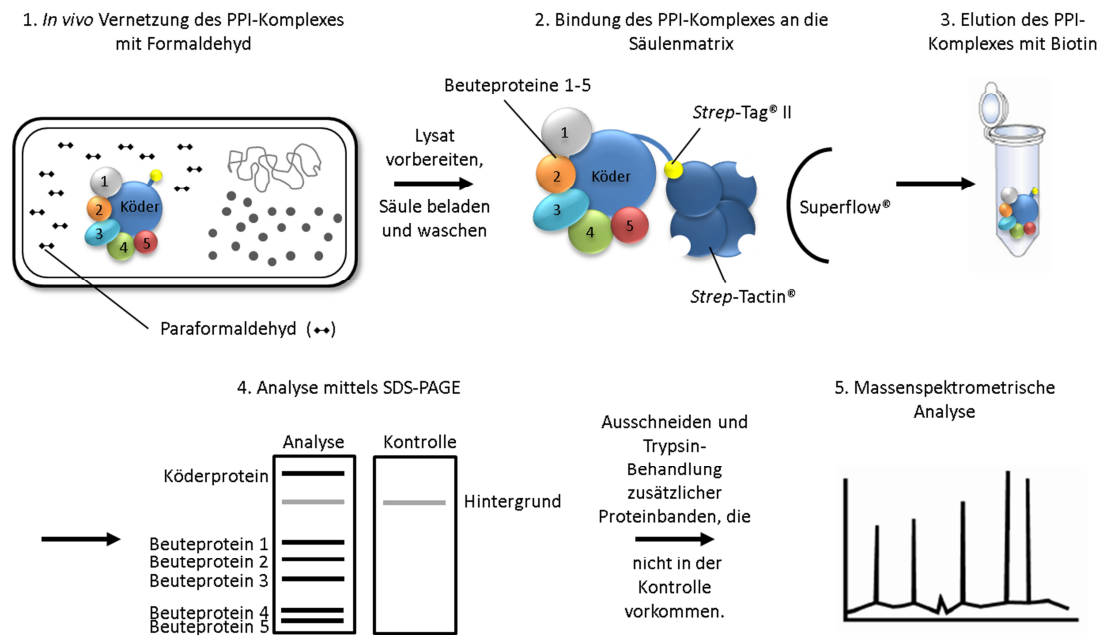
Daneben produzieren Bakterien auch Thiolverbindungen von geringem Molekulargewicht, die den durch oxidativen Stress gleichzeitig induzierten Disulfidstress verringern sollen. Hierzu gehören Thioredoxin und Glutathion. Während Glutathion in Pflanzen, Tieren, Gram-negativen und einigen Gram-positiven Bakterien zur Oxidation von Disulfidbrücken verwendet wird, produzieren Actinobakterien ausschließlich Mycothiol (Newton *et al.*, 2008). Allen drei Oxidoreduktionssystemen ist jedoch gemein, dass sie Disulfidbrücken über einen Elektronentransfer mittels NADPH als Elektronen-Donor oxidieren (den Hengst & Buttner, 2008). Ergothionein ist ebenfalls ein Thiolpuffer, der von Actinobakterien verwendet wird, und inhibiert beispielsweise die eisenabhängige Bildung von  $\text{OH}^\cdot$  aus  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Akanmu *et al.*, 1991). Studien wiesen darauf hin, dass Ergothionein in *S. coelicolor* in der oxidativen Stressantwort möglicherweise sogar eine wichtigere Rolle einnehmen könnte als Mycothiol (Nakajima *et al.*, 2015). Die Synthese von Ergothionein wird im Actinobakterium *Mycobacterium tuberculosis* durch den putativen Transkriptionsregulator WhiB3 reguliert (Saini *et al.*, 2016). Whi-Proteine wurden zunächst in *S. coelicolor* entdeckt und kommen ausschließlich in Actinobakterien vor (Chater, 1972; den Hengst & Buttner, 2008). Bisher ist dennoch unklar, ob Angehörige der Wbl (*WhiB-like*)-Proteine ausschließlich Transkriptionsfaktoren oder auch Disulfid-Reduktasen sind (den Hengst & Buttner, 2008; Crack *et al.*, 2009). Wbl-Proteine besitzen jedoch nicht nur im oxidativen Stress eine Rolle, sondern in Streptomyzeten ebenfalls in der Sporulation, der Zellteilung, der Synthese verschiedener Antibiotika als auch in Antibiotika-Resistenzmechanismen (Chater, 1972; Kang *et al.*, 2007; Bush *et al.*, 2016; Yoo *et al.*, 2016).

## 2.6 Protein-Protein-Interaktionen

Studien haben ergeben, dass das Cytoplasma einer durchschnittlichen prokaryotischen Zelle nicht homogen ist, sondern sowohl Bereiche hoher Viskosität als auch Bereiche geringer Viskosität aufweist (Spitzer & Poolman, 2013). Hierbei befinden sich die viskosen Bereiche vor allem unterhalb der Cytoplasmamembran, wo Ausstülpungen des Nukleoids mit der inneren Membran verbunden sind. Der auch als Cytogel bezeichnete Bereich sorgt auf diese Weise für eine räumliche Nähe der Prozesse der Replikation, Transkription, als auch der Ribosomenbiogenese und Translation. In diesem der Cytoplasmamembran sehr nahem Bereich werden auch die Lokalisation und Translokation vieler Membranproteine und peripheren Proteine gewährleistet (Woldringh, 2002; Driessen & Nouwen, 2008; Montero Llopis *et al.*, 2012). Im eigentlichen Cytosol ist die Viskosität sehr gering. Dort befinden sich vor allem Metabolite, Proteine und Nukleinsäuren, weniger jedoch größere Makromoleküle (Spitzer & Poolman, 2013). Um die nun in diesen Bereichen schnell diffundierenden Intermediate bzw. Metabolite eines Stoffwechselweges zwischen den daran beteiligten Enzymen weiterzureichen, ordnen sich manche Proteine als Multiproteinkomplexe an. Der direkte Transfer von Intermediaten zwischen den aktiven Zentren der beteiligten Enzyme wird als *substrate channeling* bezeichnet (Milani *et al.*, 2003). Indem die aktiven Zentren der Enzyme so allosterisch miteinander verbunden sind, können die einzelnen Reaktionen schnell und koordiniert ablaufen und chemisch instabile Intermediate geraten nicht in Kontakt mit dem umgebenden Lösungsmittel. Zudem wird verhindert, dass Intermediate nicht von anderen Enzymen gebunden werden und so zu einem ungünstigen Gleichgewicht der Stoffwechselreaktion führen können. All diese Aspekte erhöhen zum einen die Effizienz und zum anderen die Produktmenge der jeweiligen Reaktionen und Diffusionsprozesse (Huang *et al.*, 2001; Wheeldon *et al.*, 2016). Bei denen dem *substrate channeling* zugrunde liegenden Mechanismen handelt es sich um intramolekulare Proteintunnel, elektrostatische Weitergabe von Intermediaten, die kovalente Bindung von Intermediaten an einen schwingenden Arm oder die räumliche Organisation bzw. Anordnung der einzelnen Enzyme im Multiproteinkomplex oder der verschiedenen aktiven Zentren bifunktioneller Enzyme (Wheeldon *et al.*, 2016). Beispiele hierfür sind die bifunktionelle Tryptophan-Synthase (intramolekularer Tunnel), der Enzymkomplex aus Malat-Dehydrogenase und Citrat-Synthase des Citratzyklus (elektrostatische Weitergabe) sowie der Multienzymkomplex Pyruvat-Dehydrogenase. Letzterer besteht aus mehreren Untereinheiten der Enzyme E1, E2 und E3 und katalysiert die oxidative Carboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-Coenzym A. Die Pyruvat-Dehydrogenase kombiniert hierbei die Mechanismen eines schwingenden Lipoamidarmes und einer geordneten Enzymorganisation (Smolle & Lindsay, 2006; Wang *et al.*, 2014).

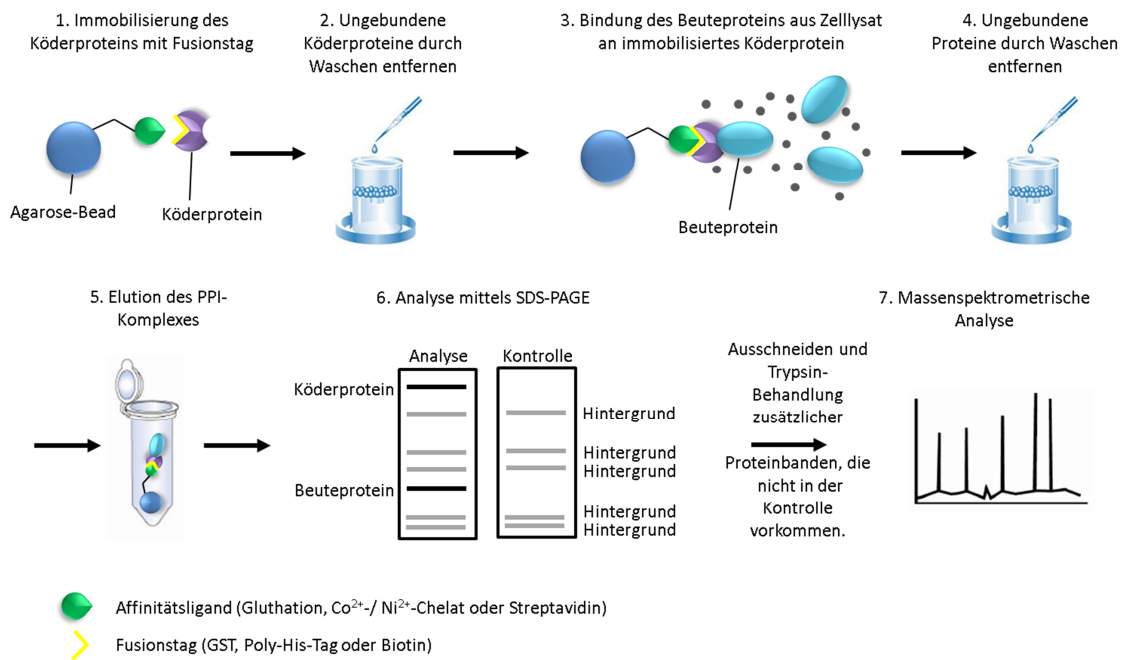
Zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) können abhängig von der Stärke der PPI als auch von der Bekanntheit der interagierenden Proteine verschiedene biochemische Nachweismethoden angewendet werden. Der direkte Nachweis von transienten PPI *in vivo* wird durch fluoreszenzbasierte Verfahren wie das der bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und das des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) ermöglicht (Golemis & Adams, 2005; Hu *et al.*, 2002). Proteinvernetzende Agenzien (*crosslinker*) helfen zudem, transiente PPI zu fixieren und einen Nachweis *in vivo* zu erleichtern (Sinz, 2010; Sutherland *et al.*, 2008). Dieses Verfahren wird beispielsweise auch beim *strep-tag-protein-interaction-*

*experiment* (SPINE) genutzt (Herzberg *et al.*, 2007), welches auf dem Verfahren der Affinitätschromatographie beruht (Abb. 6).



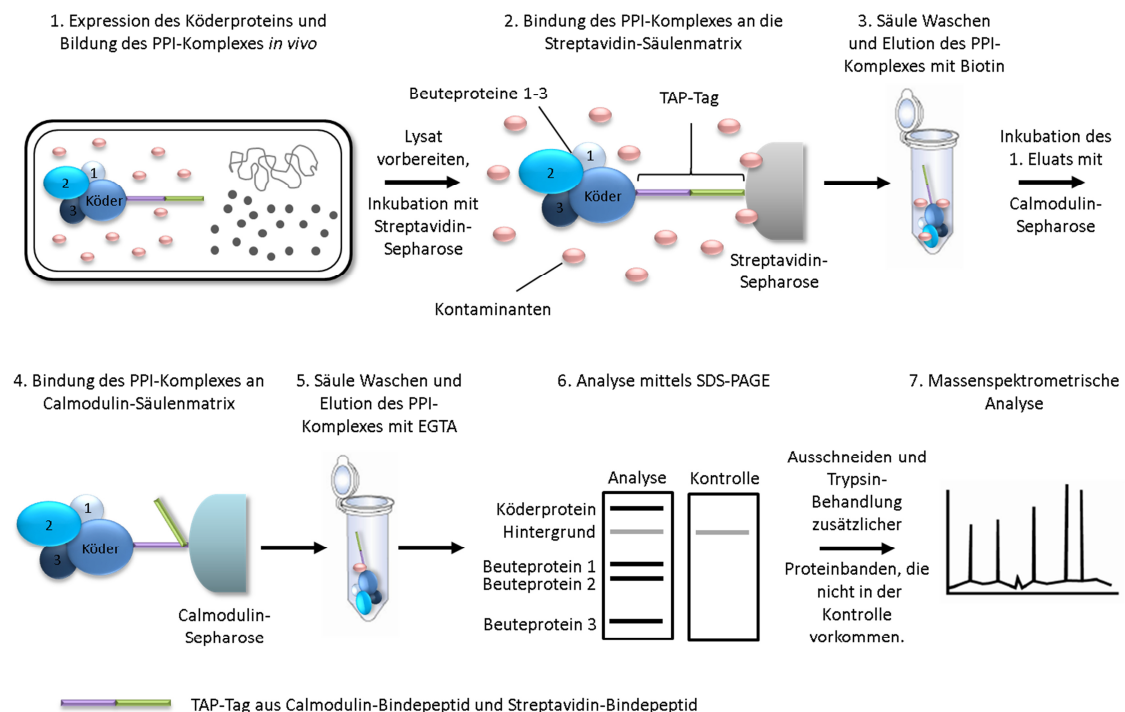
**Abbildung 6: Prinzip des strep-tag-protein-interaction-experiment (SPINE) (abgewandelt nach IBA, 2012).** Das Köderprotein mit Strep-Fusionstag wird *in vivo* produziert und interagierende Proteine in einem Abstand von 2 Å werden durch Zugabe von Paraformaldehyd in einer Momentaufnahme des Proteoms quervernetzt. Nach Reinigung des Proteinkomplexes werden die Proteine gelelektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und nicht in der Kontrolle auftretende Proteinbanden massenspektrometrisch identifiziert.

Andere Methoden der Affinitätschromatographie wie der *pull-down*-Versuch (Abb. 7) und die *tandem affinity purification* (TAP) (Abb. 8) eignen sich meist nur für starke und permanente PPI. Mit Hilfe eines Köderproteins können interagierende Proteine gereinigt werden, indem das Köderprotein mit einem Fusionstag entweder gereinigt zum Rohextrakt von Zellen zugegeben (*pull-down*) oder *in vivo* in einer Zellkultur produziert wird (TAP, SPINE) (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001; Rahaus *et al.*, 2003; Fu, 2004; Herzberg *et al.*, 2007; Lamberti *et al.*, 2011). Hierbei eignet sich der *pull-down* eher zum anfänglichen *screening* unbekannter PPI oder zur Bestätigung von PPI, die bereits durch andere Nachweismethoden gezeigt wurden. Das TAP-Verfahren verspricht aufgrund zwei aufeinanderfolgender nativer Reinigungsschritte hochspezifisch zu sein. Gereinigte noch aktive Proteine können hierbei direkt für weitere Untersuchungen eingesetzt werden. Das TAP-Verfahren ist heutzutage neben dem *two-hybrid*-Verfahren das am häufigsten genutzte Hochdurchsatzverfahren zur Identifizierung von PPI (Williamson & Sutcliffe, 2010).



**Abbildung 7: Prinzip des pull-down-Versuchs (abgewandelt nach Thermo Fisher Scientific, 2016).**

Das Köderprotein wird mit Hilfe eines Fusionstags an eine Affinitätsmatrix immobilisiert und mit Rohextrakt einer Zellkultur inkubiert. Mit dem Köderprotein interagierende Proteine werden eluiert und gelelektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nicht in der Kontrolle auftretende Proteinbanden werden massenspektrometrisch identifiziert.



**Abbildung 8: Prinzip der tandem affinity purification (TAP) (abgewandelt nach Puig et al., 2001).**

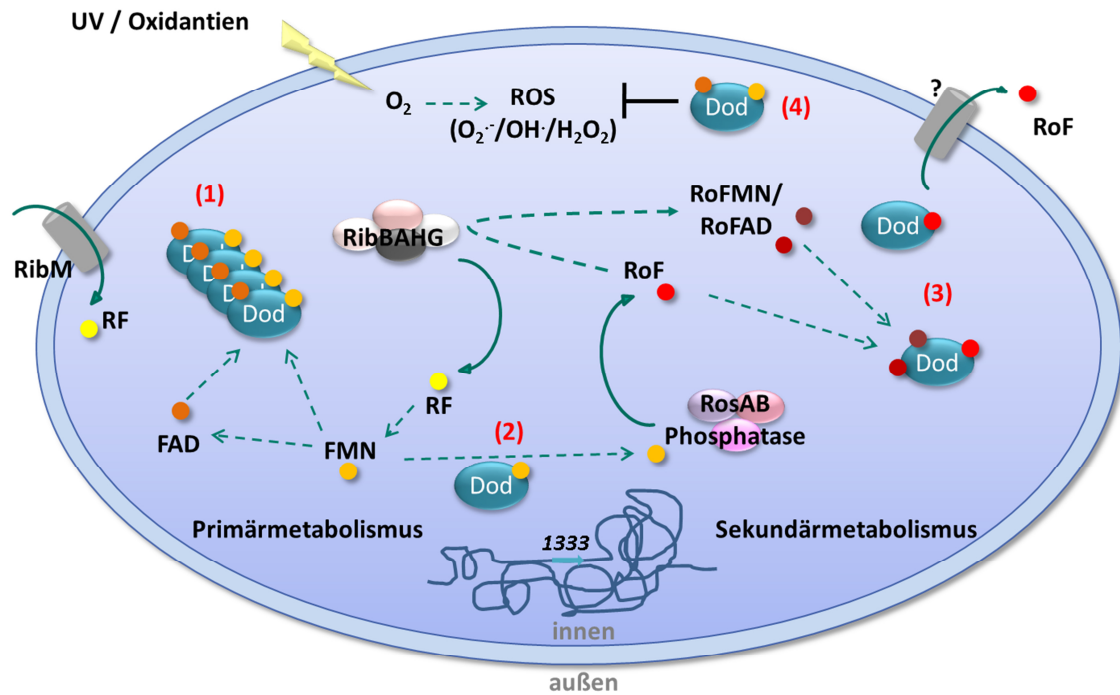
Das Köderprotein wird *in vivo* unter nativen Bedingungen mit einem Fusionstag produziert. Mit dem Köderprotein interagierende Proteine werden mit Hilfe zwei aufeinanderfolgender nativer Reinigungsschritte gereinigt und gelelektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nicht in der Kontrolle auftretende Proteinbanden werden massenspektrometrisch identifiziert.

Daneben werden aber auch immer häufiger massenspektrometrische Methoden angewendet (Golemis & Adams, 2005). Sind die interagierenden Proteine bereits bekannt, können beispielsweise die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) oder das Verfahren der *MicroScale Thermophoresis* (NanoTemper Technologies) genutzt werden, um thermodynamische Untersuchungen zur Assoziation bzw. Dissoziation der Proteine durchzuführen (Ramsay *et al.*, 1986; Wienken *et al.*, 2010).

## 2.7 Ziele der Arbeit

Seit der Entdeckung und der Aufklärung des Synthesewegs von RF wurden stets neue Flavoproteine identifiziert, analysiert und deren Strukturen und Funktionen beschrieben (Massey, 2000). Dodecin, welches verschiedene Flavinspezies binden kann, wurde erst 2003 im archaealen Bodenbakterium *H. salinarum* entdeckt (Bieger *et al.*, 2003). Das nur in Bodenbakterien, pathogenen Bakterien und Archaeen auftretende Dodecin wurde seitdem größtenteils nur strukturell und biochemisch erforscht. Untersuchungen zur Funktion *in vivo* wurden nur im archaealen *H. salinarum* selbst durchgeführt. Diese deuten darauf hin, dass Dodecin als bifunktionelles Flavoprotein ein RF-Speicherprotein darstellt und darüber hinaus an der Regeneration von reaktivem RF beteiligt ist (Grininger *et al.*, 2009). Trotz hoher Strukturähnlichkeit wird angenommen, dass Dodecine in Bakterien eine andere Funktion übernehmen (Meissner *et al.*, 2007; Staudt *et al.*, 2012).

Vergleichende Sequenzanalysen mittels *NCBI Protein BLAST* ergaben, dass Dodecin in fast allen bisher sequenzierten Arten der Gattung *Streptomyces* vorhanden ist. *S. davawensis* JCM4913 synthetisiert neben denen für alle Organismen essentiellen Flavinen RF, FMN und FAD auch das antibiotisch wirksame RF-Analogon RoF sowie dessen Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD. Obwohl *S. davawensis* durch einen spezialisierten FMN-RNA-Schalter gegenüber RoF resistent ist, sind dessen Flavoproteine dennoch potentielle Zielmoleküle von RoFMN und RoFAD (Pedrolli *et al.*, 2012; Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Da die Funktion von Dodecin in Bakterien bisher noch nicht *in vivo* analysiert wurde, sollte in dieser Arbeit eine mögliche Schutz- und Speicherfunktion von Dodecin bezüglich der RoF-Resistenz, der RoF-Biosynthese und im Rahmen einer oxidativen Stressantwort in *S. davawensis* untersucht werden (Abb. 9). Hierzu wurde eine *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante generiert und vergleichende Wachstumsversuche sowie differentielle Transkriptomanalysen mit dem *S. davawensis* Wildtyp und dem RoF-sensitiven *S. coelicolor* A3(2) in Anwesenheit von RoF und oxidativem Stress induzierenden Chemikalien durchgeführt. Für nähere Erkenntnisse wurde auch die Proteinkristallstruktur des *S. davawensis* Dodecins gelöst. Mit Hilfe verschiedener Punktmutanten von gereinigtem *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin sollten neben der Funktion auch die unterschiedlichen Proteinstabilitäten der Wildtyp-Dodecine beider Streptomyzeten untersucht werden.



***Streptomyces davawensis* JCM4913**

**Abbildung 9: Mögliche Funktionen des Flavinbindeproteins Dodecin im Primär- und Sekundärmetabolismus von *S. davawensis* JCM4913.** (1) Dodecin als Flavinspeicherprotein von FMN und/oder FAD, (2) Dodecin als FMN-Lieferant für die Roseoflavin (RoF)-Biosynthese, (3) Dodecin zur Inaktivierung antibiotisch wirksamen RoF, RoFMN und RoFAD und (4) Dodecin als Schutzprotein vor reaktiven Sauerstoffderivaten (ROS) während der oxidativen Stressantwort. Dodecin wird durch das Gen *BN159\_1333* (1333) auf dem linearen Chromosom von *S. davawensis* kodiert.

In einem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollte zudem die Interaktion von bisher bekannten Enzymen der RoF-Biosynthese in *S. davawensis* untersucht werden. Protein-Protein-Interaktionen (PPI) und die Bildung von Multienzymkomplexen ermöglichen eine schnelle und meist energieeffiziente direkte Weitergabe von Stoffwechselintermediaten (*substrate channeling*). Untersuchungen haben gezeigt, dass RF bzw. FMN das Ausgangssubstrat der RoF-Biosynthese in *S. davawensis* ist (Schwarz *et al.*, 2016). Da die Bildung eines Multienzymkomplexes von an der RF-Synthese beteiligten Enzymen Lumazin-Synthase und RF-Synthase bekannt ist (Fischer & Bacher, 2005), lag die Vermutung nahe, dass dies möglicherweise auch für Enzyme der RoF-Biosynthese der Fall sein könnte. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob in *S. davawensis* nicht sogar Enzyme der RF- als auch der RoF-Synthese mittels PPI in Kontakt stehen könnten. Es sollte geklärt werden, ob eine direkte Verbindung der Flavinbiosynthesen von Primär- und Sekundärmetabolismus in *S. davawensis* besteht. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden in dieser Arbeit drei verschiedene *in vivo*- als auch *in vitro*-PPI-Nachweismethoden angewendet. Die Effizienz der jeweiligen Nachweismethoden sollte hierzu durch den PPI-Nachweis der Elongationsfaktoren EF-Ts und EF-Tu validiert werden.

## 3 Material

### 3.1 Laborgeräte, Chromatographiesäulen und Verbrauchsmaterial

#### 3.1.1 Laborgeräte

**Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte**

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav <sup>®</sup> Dampfsterilisator 75 S	H+P Labortechnik, Habermos
Brutschrank	Modell 600	Memmert GmbH & Co. KG, Büchenbach
Elektroporationsgerät	Gene Pulser <sup>®</sup> II, mit Pulser Controller Plus	Bio-Rad, München
Evaporator	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Fotodokumentationssystem	Molecular Imager <sup>®</sup> GelDoc <sup>™</sup> XR, Quantity One 1D-Analysis Software	Bio-Rad, München
FPLC-System	ÄKTApurifier (P-900, UPC-900) ÄKTAmicro (P-900, pHIC-900, UV-900, P-905, A-905)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Heizbad	IKA <sup>®</sup> 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
HPLC-System	LaChrom <sup>®</sup> : L7120, L7200, L7455 (DAD), D7000/ Säulenofen: BF0-04	Merck-Hitachi/ W.O. electronics, Langenzersdorf
Hybridisierungs-ofen	Shake'n'Stack	Hybaid, Ashford, UK
Inkubationsschüttler	Certomat <sup>®</sup> 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
Massenspektrometer zur Metabolitenanalyse	LaChrom <sup>®</sup> : L 7100 HPLC-Pump  MPS2 Autosampler  6550 iFunnel Q-TOF	Merck-Hitachi/ W.O. electronics, Langenzersdorf Gerstel GmbH & Co. KG, Mühlheim Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Massenspektrometer zur Proteinanalyse	Autoflex III Mass Spectrometer	Bruker Daltonics Inc., Billerica, USA
Reinstwassererzeugung	Milli-Q <sup>®</sup> Gradient	Millipore GmbH, Schwalbach
RNA-Sequenziergerät	Illumina HiSeq1500	Illumina Inc., San Diego, USA

Thermocycler	C1000™ Thermal Cycler, dual 48/48 CFX Touch™ Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad, München
Sicherheitswerkbank	Variolab Mobilien W 90	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG, Wangen
Spannungsquellen	Power Pac 200, Power Pac 300	Bio-Rad, München
Spektralphotometer	Ultrospec™ 3100 pro  DU® 640 Spectrophotometer mit High Performance Temperature Controller	Amersham Biosciences, Freiburg Beckmann Coulter Krefeld
Spektralphotometer zur Messung von RNA- und DNA-Konzentrationen	NanoVue  Nanodrop 2000  Xpose® Reader	GE Healthcare, Little Chalfont, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA Trinean, Gent, Belgien
Turning wheel	Rotator SB 3	Stuart, Staffordshire, UK
Ultrazentrifuge	Avanti® J-30 I Centrifuge	Beckmann Coulter, Krefeld
UV-Quervernetzung	Ultraviolet Cross Linker UVP CL-1000	UVP, Cambridge, UK
Vertikale Gelelektrophorese	Mini-Protean® Tetra System, XCell SureLock® Mini-Cell	Bio-Rad, München  Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellaufschlussysteme	French Press  FastPrep-24™ 5G Instrument	Constant Systems Limited, Northants, UK MP Biomedicals, Santa Ana, Kalifornien, USA
Zentrifugen	Eppendorf 5415 R Heraeus Fresco 21 Heraeus Multifuge® 3 S-R	Eppendorf, Hamburg Heraeus, Hanau Heraeus, Hanau

### 3.1.2 Chromatographiesäulen

**Tabelle 2: Säulen und Säulenmaterial**

<b>Trennprinzip</b>	<b>Säulen, Säulenmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Metallchelate-Affinität	HisTrap™ HP, 5ml, #17-5248-01  HisPur™ Ni-NTA Resin, #88222	GE Healthcare, Little Chalfont, UK Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Streptavidin-/ Calmodulin-Affinität	Gravity flow Strep-Tactin® Sephacrose® Column, 5ml #2-1202-051 Poly-Prep Chromatography Columns, 0,8 x 4cm, #731-1550 Streptavidin Sepharose® High Performance, #17-5113-01 Calmodulin Affinity Resin, #214303- 52	IBA GmbH  Bio-Rad, München  GE Healthcare, Little Chalfont, UK Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA



Größenausschluss (SEC)	HisTrap™ Desalting, #17-1069-01 Superdex 200 Increase 10/300 GL, #28990944	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Reverse Phase	Kinetex® 2.6 µM Biphenyl 100 Å LC Column 150 x 2,1mm #00F-4622-AN	Phenomenex, Aschaffenburg

### 3.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial wurde, sofern 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, sofern 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 angegeben bezogen.

**Tabelle 3: Bezugsquellen verschiedener spezieller Chemikalien**

Chemikalie	Bestellnummer	Bezugsquelle
D-Desthiobiotin	2-1000-005	IBA GmbH, Göttingen
Roseoflavin	51093-55-1	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

### 3.2.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden ausschließlich von der Firma Fermentas (St. Leon-Roth) bezogen. Weitere Enzyme und deren Bezugsquellen sind in Tabelle 4 angegeben.

**Tabelle 4: Verwendete Enzyme**

Enzym	Bestellnummer	Hersteller
$\alpha$ -Amylase Rohalase A3 von <i>Bacillus subtilis</i> (EC 3.2.1.1)	13452	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
FastAP <sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline Phosphatase	EF0651	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
KAPA HiFi <sup>TM</sup> DNA-Polymerase	07-KK2100	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Lysozym	4403	Merck KGaA, Darmstadt
Proteinase K	A3830	AppliChem, Darmstadt
RiboLock RNase Inhibitor	EO0381	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase A (DNase-frei)	A3832	AppliChem, Darmstadt
RNase-free DNase Set	79254	Qiagen, Hildesheim
T4-DNA-Ligase	EL0011	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
T4-Polynukleotid-Kinase	EK0031	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 3.2.3 Komplettsysteme, Marker und Ladepuffer

**Tabelle 5: Verwendete Komplettsysteme (Kit-Systeme)**

Kit-System	Bestellnummer	Hersteller
GeneJET <sup>TM</sup> Gel Extraction Kit	K0691	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneJET <sup>TM</sup> PCR Purification Kit	K0701	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneJET <sup>TM</sup> Plasmid Miniprep Kit	K0502	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Genomic DNA Purification Kit	K0512	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Invitrogen <sup>TM</sup> Platinum <sup>TM</sup> Taq DNA polymerase	10966-018	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for with dsDNase	K1671	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit	200521	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)	MRZMB126	Illumina Inc., San Diego, USA
RNeasy Mini Kit	74104	Qiagen, Hilden
SERVA Gel <sup>TM</sup> Native Gel Starter Kit	43204.01	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TrueSeq Stranded mRNA Library Prep Kit	RS-122-2101	Illumina Inc., San Diego, USA

Tabelle 6: DNA-Marker, RNA-Marker, Protein-Marker und Ladepuffer

Marker/ Puffer	Bestellnummer	Hersteller
6x DNA Loading Dye	R0611	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	SM0241	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	SM1351	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	SM1811	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder, ready-to-use	SM1833	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RiboRuler™ High Range RNA Ladder, ready-to-use	SM1823	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
2x RNA Loading Dye	R0641	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

### 3.3 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

#### 3.3.1 Bakterienstämme

Tabelle 7: Verwendete Bakterienstämme

Stamm/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Herkunft
<i>Streptomyces davawensis</i> JCM4913	Wildtyp, JSCC-Stamm Nr. 768	Japan Society for Culture Collections (JSCC), <i>Streptomyces</i>
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Wildtyp, DSMZ-Stamm Nr. 40783	Deutsche Stammsammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ)
<i>Streptomyces davawensis</i> <i>rosA::acc(3)IV</i> ( <i>S. davawensis</i> $\Delta$ <i>rosA</i> )	Wildtyp mit disruptiertem Gen <i>rosA</i> (BN159_8032)	(Jankowitsch <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces davawensis::pSETrpstsfTAP</i>	Wildtyp mit integriertem <i>rpstsf</i> -Operon und TAP-Tag unter Kontrolle des natürlichen Promotors	diese Arbeit
<i>Streptomyces davawensis::pIJtsfTAP</i>	Wildtyp mit integriertem Gen <i>tsf</i> und TAP-Tag unter Kontrolle des induzierbaren <i>tipA</i> -Promotors	diese Arbeit
<i>Streptomyces davawensis::pSETrpstsfStrep</i>	Wildtyp mit integriertem <i>rpstsf</i> -Operon und Strep II-Tag unter Kontrolle des natürlichen Promotors	diese Arbeit
<i>Streptomyces davawensis::pIJtsfStrep</i>	Wildtyp mit integriertem Gen <i>tsf</i> und Strep II-Tag unter Kontrolle des induzierbaren <i>tipA</i> -Promotors	diese Arbeit

<i>Streptomyces davawensis::pSETrosAStrep</i>	Wildtyp mit integriertem Gen <i>rosA</i> und Strep II-Tag unter Kontrolle des natürlichen Promotors	diese Arbeit
<i>Streptomyces davawensis::pIJrosAStrep</i>	Wildtyp mit integriertem Gen <i>rosA</i> und Strep II-Tag unter Kontrolle des induzierbaren <i>tipA</i> -Promotors	diese Arbeit
<i>Streptomyces davawensis 1333::acc(3)IV, Klon 4 und 9 (S. davawensis Δ1333.4 bzw. S. davawensis Δ1333.9)</i>	Wildtyp mit disruptiertem Dodecin-Gen <i>BN159_1333</i>	diese Arbeit
<i>Streptomyces coelicolor::pSET1333his<sub>6</sub></i>	<i>Streptomyces coelicolor</i> mit integriertem <i>Streptomyces davawensis</i> Dodecin-Gen <i>BN159_1333</i> und His <sub>6</sub> -Tag	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i> Rosetta 2(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) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Escherichia coli</i> ET12567 (pUB307)	<i>dam-13::Tn9(Chl<sup>R</sup>), dcm-6, hsdM,</i> konjugatives Plasmid mit Kan <sup>R</sup> (pUB307)	(Flett <i>et al.</i> , 1997)
<i>Escherichia coli</i> Top10	F- <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> XL10 Gold	<i>endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet<sup>R</sup> [F<sup>+</sup> proAB lacI<sup>+</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>R</sup> Amy Cam<sup>R</sup>)]</i>	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
<i>Escherichia coli</i> DH10b	F <sup>-</sup> <i>endA1 recA1 galE15 galK16 nupG rpsL ΔlacX74 φ80lacZΔM15 araD139 Δ(ara,leu)7697 mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ<sup>-</sup></i>	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Escherichia coli</i> DH10b pESAC13.4 bzw. pESAC13.9	<i>Escherichia coli</i> DH10b mit verschiedenen in pESAC13 eingefügten subgenomischen Fragmenten aus <i>Streptomyces davawensis</i> ( <i>BN159_1333</i> tragend)	Bio S&T Inc., Montréal, Québec, Canada
<i>Escherichia coli</i> DH10b pESAC13.4_1333:: <i>acc(3)IV</i> bzw. pESAC13.9_1333:: <i>acc(3)IV</i>	<i>Escherichia coli</i> DH10b, Disruptioni des Gens <i>BN159_1333</i> durch eine Apramycin-Resistenzkassette	diese Arbeit

<i>Escherichia coli</i> GM2163	F <sup>-</sup> , <i>araC14</i> , <i>leuB6</i> (Am), <i>fhuA13</i> , <i>lacY1</i> , <i>tsx-78</i> , <i>glnV44</i> (AS), <i>galK2</i> (Oc), <i>galT22</i> , $\lambda$ , <i>mcrA0</i> , <i>dcm-6</i> , <i>hisG4</i> (Oc), <i>rfbC1</i> , <i>rpsL136</i> (strR), <i>dam-13::Tn9</i> , <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thiE1</i> , <i>mcrB9999</i> , <i>hsdR2</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	F <sup>-</sup> , $\phi$ 80d/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> <sup>-</sup> , <i>hsdR17</i> ( $r_K^- m_K^+$ ), <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>deoR</i> , $\Delta$ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169	(Hanahan, 1983)
<i>Escherichia coli</i> CmpX13	<i>E. coli</i> BL21 DE3 <i>manX::pnuX</i>	(Mathes <i>et al.</i> , 2009)
<i>Escherichia coli</i> CpXFMN	<i>E. coli</i> CmpX13, <i>ribC</i> ; zusätzliche Kopie von <i>FMN1</i> aus <i>S. pombe</i>	(Langer & Hashimoto <i>et al.</i> , 2013)
<i>Escherichia coli</i> CpXFAD	<i>E. coli</i> CmpX13, <i>ribC</i> ; zusätzliche Kopie von <i>ribF</i> (Flavokinase/FAD-Synthetase)	(Langer & Hashimoto <i>et al.</i> , 2013)
<i>Bacillus subtilis</i> Marburg 168	<i>trpC2</i> ; Wildtyp	Universität Marburg

### 3.3.2 Plasmide

**Tabelle 8: Verwendete Plasmide**

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pET24a(+)	Expressionsplasmid mit IPTG-induzierbarem Promotor, <i>lacI</i> , T7-Promotor	Merck KGaA, Darmstadt
pET24a(+) <i>tsf</i>	pET24a(+)-Derivat mit dem Gen <i>tsf</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i>	diese Arbeit
pET24a(+) <i>tuf1</i>	pET24a(+)-Derivat mit dem Gen <i>tuf1</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i>	diese Arbeit
pET24(+) <i>I333</i>	pET24a(+)-Derivat mit dem Gen <i>BN159_1333</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i>	diese Arbeit
pET24(+) <i>SCO0915</i>	pET24a(+)-Derivat mit dem Gen <i>SCO0915</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i>	diese Arbeit
pET24a(+) <i>rosA</i>	pET24a(+)-Derivat mit dem Gen <i>rosA</i> ( <i>BN159_8032</i> ) aus <i>Streptomyces davawensis</i>	(Jankowitsch <i>et al.</i> , 2011)
pSET152	<i>acc(3)IV</i> (Apr <sup>R</sup> ), <i>oriT</i> (RK2), pUC18 Origin, <i>int</i> <sup>oC31</sup>	(Bierman <i>et al.</i> , 1992)
pSET1333	pSET152-Derivat mit <i>BN159_1333</i> und natürlichem Promotor aus <i>Streptomyces davawensis</i>	diese Arbeit

pSET <i>rpstsfTAP</i>	pSET152-Derivat mit dem Operon <i>rpstsf</i> und natürlichem Promotor aus <i>Streptomyces davawensis</i> und TAP-Tag	diese Arbeit
pSET <i>rpstsfStrep</i>	pSET152-Derivat mit dem Operon <i>rpstsf</i> und natürlichem Promotor aus <i>Streptomyces davawensis</i> und Strep II-Tag	diese Arbeit
pSET <i>rosAStrep</i>	pSET152-Derivat mit dem Gen <i>rosA</i> und seinem natürlichen Promotor aus <i>Streptomyces davawensis</i> und Strep II-Tag	diese Arbeit
pIJ6902	<i>ter fd</i> , <i>t0</i> , P <sub><i>tipA</i></sub> , <i>tsr</i> , <i>acc(3)IV</i> (Apr <sup>R</sup> ), pUC18 Origin, <i>oriT</i> (RP4), <i>int</i> <sup>ΦC31</sup> , <i>attP C31</i>	(Huang <i>et al.</i> , 2005) (AJ937361)
pIJ6902 <i>tsfTAP</i>	pIJ6902-Derivat mit dem Gen <i>rps</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i> und TAP-Tag	diese Arbeit
pIJ6902 <i>tsfStrep</i>	pIJ6902-Derivat mit dem Gen <i>rps</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i> und Strep II-Tag	diese Arbeit
pIJ6902 <i>rosAStrep</i>	pIJ6902-Derivat mit dem Gen <i>rosA</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i> und Strep II-Tag	diese Arbeit
pUB307	konjugatives Plasmid (Kan <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> )	(Bennett <i>et al.</i> , 1977)
pIJ773	Plasmid zur Herstellung der Apramycin-Resistenzkassette: <i>aac(3)IV</i> flankiert von FRT-sites, <i>oriT</i>	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pIJ790	λ RED Plasmid, <i>cat</i> (Cln <sup>R</sup> ), <i>ParaBAD</i> , temperatursensitive Replikation	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pESAC13	<i>E. coli-Streptomyces</i> Artificial Chromosome pPAC-S1-Derivat mit <i>oriT</i> aus dem RK2 Replikon, Kan <sup>R</sup>	(Sosio <i>et al.</i> , 2000)
pR9406	pUB307-Derivat, Helferplasmid für die Konjugation, <i>oriT</i> , Carb <sup>R</sup>	David Figurski, Columbia University, NY
pHT01	Expressionsvektor mit IPTG-induzierbarem P <i>grac</i> -Promotor, <i>lacI</i> , ColE1 <i>ori</i> , Cam <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	MoBiTec GmbH, Göttingen
pHT01<1333 <sub>Bs</sub> >	pHT01-Derivat mit dem Gen <i>BN159_1333</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i> kodiert in <i>Bacillus subtilis</i> <i>codon-usage</i>	diese Arbeit

pHT01<I333 <sub>Bs</sub> his <sub>6</sub> >	pHT01-Derivat mit dem Gen <i>BN159_I333</i> aus <i>Streptomyces davawensis</i> und His <sub>6</sub> -Tag kodiert in <i>Bacillus subtilis codon-usage</i>	diese Arbeit
pHT01<SCO0915 <sub>Bs</sub> >	pHT01-Derivat mit dem Gen <i>SCO0915</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i> kodiert in <i>Bacillus subtilis codon-usage</i>	diese Arbeit
pHT01<SCO0915 <sub>Bs</sub> his <sub>6</sub> >	pHT01-Derivat mit dem Gen <i>SCO0915</i> aus <i>Streptomyces coelicolor</i> und His <sub>6</sub> -Tag kodiert in <i>Bacillus subtilis codon-usage</i>	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(D10E)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation D10E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(E17D)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation E17D	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(D20E)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation D20E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(N28T)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation N28T	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(H35R)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation H35R	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(N36K)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation N36K	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(E44Q)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation E44Q	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(N50E)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation N50E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(M61L)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation M61L	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(K62A)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation K62A	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(D68E)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Punktmutation D68E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>I333(D10E, K62A)</i>	pET24a(+) <i>I333</i> -Derivat mit Doppelpunkt-mutationen D10E und K62A	diese Arbeit
pET24a(+) <i>SCO0915(D20E)</i>	pET24a(+) <i>SCO0915</i> -Derivat mit Punktmutation D20E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>SCO0915(Q44E)</i>	pET24a(+) <i>SCO0915</i> -Derivat mit Punktmutation Q44E	diese Arbeit
pET24a(+) <i>SCO0915(K62A)</i>	pET24a(+) <i>SCO0915</i> -Derivat mit Punktmutation K62A	diese Arbeit
pET24a(+) <i>SCO0915(Q44E, K62A)</i>	pET24a(+) <i>SCO0915</i> -Derivat mit Doppelpunktmutationen Q44E und K62A	diese Arbeit

### 3.3.3 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden auf Grundlage der bekannten Gensequenzen von *S. davawensis* JCM4913 und *S. coelicolor* A3(2) sowie die der Plasmide erstellt und von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser zu einer Konzentration von 100µM gelöst.

**Tabelle 9: Verwendete Oligonukleotide**

Primername	Sequenz (5' → 3')	Anwendung
T7	TAATACGACTCACTATAGG G	Sequenzierung von pET24a(+)
T7 term	CTAGTTATTGCTCAGCGGT	Sequenzierung von pET24a(+)
PpIJ6902-fw	GGATCGGGGATCTGGGCTG AGGG	Sequenzierung von pIJ6902
PpIJ6902-rv	CGCTGAAACTGTTGAAAGT TGTTTAGCAAAAC	Sequenzierung von pIJ6902
PpSET152-fw	CGATTAAGTTGGGTAACGC CAGG	Sequenzierung von pSET152
PpSET152-rv	GCAGTGAGCGCAACGCAAT TAATG	Sequenzierung von pSET152
PpHT01-fw	AGCGGAAAAGAATGATGTA AGCGT	Sequenzierung von pHT01
PpHT01-rv	TCCTAATAAGCCGATATTA GCCTC	Sequenzierung von pHT01
Pseqrps-rv	GCACGGTCATGTTTCGTCGG TACG	Sequenzierung des <i>rpstsf</i> - Operons von <i>S. davawensis</i>
Pseqtsf-rv	CAGGCCTGATCAGTCAGCG TTG	Sequenzierung des <i>rpstsf</i> - Operons von <i>S. davawensis</i>
PseqrosA-fw	CTCGGTCAGATTCTGTGAG G	Sequenzierung des Gens <i>rosA</i> von <i>S. davawensis</i>
PtsfNdeI-fw	ATATATCATATGGCGAACT ACACCGCCGCCGACGTCAA G	Klonierung des Gens <i>tsf</i> von <i>S. davawensis</i> aus pET24a(+) in pET24a(+) bzw. in pIJ6902 ( <i>NdeI</i> )
PtsfXhoI-rv	ATATATCTCGAGGATGCCG ACCTTGATGCGCGTGAAG	Klonierung des Gens <i>tsf</i> von <i>S. davawensis</i> in pET24a(+) ( <i>XhoI</i> )
PtufINdeI-fw	ATATATCATATGGCGAAGG CGAAGTTCGAGCGGACTAA GC	Klonierung des Gens <i>tufI</i> von <i>S. davawensis</i> in pET24a(+) ( <i>NdeI</i> )
PtufIXhoI-rv	ATATATAAGCTTCTTGTTGA TCTTGGTGACCTGGCCGGC GC	Klonierung des Gens <i>tufI</i> von <i>S. davawensis</i> pET24a(+) ( <i>XhoI</i> )
PtsfTAPXbaI-rv	ATATATTCTAGATTAGCGG GCGCCGAGCCAGGCC	Klonierung des Gens <i>tsf</i> von <i>S. davawensis</i> in pIJ6902 zum Anfügen des TAP-Tags ( <i>XbaI</i> )
PrpsEcoRI-fw	ATATATGAATTCCTCCGCCA GGCTCCCCGCGCCCC	Klonierung des <i>rpstsf</i> -Operons von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des TAP-Tags ( <i>EcoRI</i> )



PtsfBamHI-rv	ATATATCTGGATCCCGATG CCGACCTTGATGCGCGTGA AGCG	Klonierung des <i>rpstsf</i> -Operons von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des TAP-Tags ( <i>Bam</i> HI)
PprosAEcoRI-fw	ATATATGAATTCTCGATCAC CCTAGAGTCGCCC	Klonierung des <i>rosA</i> -Promotors von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Eco</i> RI)
PprosAKpnI-rv	ATATATGGTACCGCTTCGA ATATGTCGTGCCG	Klonierung des <i>rosA</i> -Promotors von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Kpn</i> I)
ProsAKpnI-fw	ATATATGGTACCGAGAGAG GACCCATGCCG	Klonierung des Gens <i>rosA</i> von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Kpn</i> I)
ProsABamHI-rv	ATATATGGATCCCGCCGGC CGTGCC	Klonierung des Gens <i>rosA</i> von <i>S. davawensis</i> in pSET152 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Bam</i> HI)
ProsANdeI-fw	ATATATCATATGCGGCCGG AACCGACCGAGACCCCCG	Klonierung des Gens <i>rosA</i> von <i>S. davawensis</i> in pIJ6902 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Nde</i> I)
ProsAHindIII-rv	ATATATAAGCTTGCCGGCC GTGCCGCGGCATTC	Klonierung des Gens <i>rosA</i> von <i>S. davawensis</i> in pIJ6902 zum Anfügen des Strep II-Tags ( <i>Hind</i> III)
Strep-Linker-fw	AGCTTGGCGCCTGGTCCCA CCCGCAGTTCGAGAAGGGC GCCTAAT	Linker für Strep II-Tag ( <i>Hind</i> III, <i>Xba</i> I)
Strep-Linker-rv	CTAGATTAGGCGCCCTTCTC GAACTGCGGGTGGGACCAG GCGCCA	Linker für Strep II-Tag ( <i>Xba</i> I, <i>Hind</i> III)
P1333NdeI-fw	ATATATCATATGTCGAACC ACACCTACCGGGTCACGGA C	Klonierung des Gens <i>BN159_1333</i> mit His <sub>6</sub> -Tag ( <i>Nde</i> I) von <i>S. davawensis</i>
P1333XhoI-rv	ATATATCTCGAGACCGGTC TCGTCCAGGCGGAAGCC	Klonierung des Gens <i>BN159_1333</i> mit His <sub>6</sub> -Tag ( <i>Xho</i> I) von <i>S. davawensis</i>
PSCO0915NdeI-fw	ATATATCATATGTCGAACC ACACCTACCGGGTCACCGA GG	Klonierung des Gens <i>SCO0915</i> mit His <sub>6</sub> -Tag ( <i>Nde</i> I) von <i>S. coelicolor</i>
PSCO0915XhoI-rv	ATATATCTCGAGGTCGGAC TCCTCCAGGCGGAAGCCG	Klonierung des Gens <i>SCO0915</i> mit His <sub>6</sub> -Tag ( <i>Xho</i> I) von <i>S. coelicolor</i>
SdDod(D10E)-fw	GGTGCCGACGATCTCCGTG ACCCGG	Punktmutation von D10E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(D10E)-rv	CCGGGTCACGGAGATCGTC GGCACC	Punktmutation von D10E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(E17D)-fw	GTCCACGCCGTCGGGCGAG GTGC	Punktmutation von E17D in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(E17D)-rv	GCACCTCGCCGACGGCGT GGAC	Punktmutation von E17D in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>

SdDod(D20E)-fw	CGGATCGCCTGCTCCACGC CCTC	Punktmutation von D20E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(D20E)-rv	GAGGGCGTGGAGCAGGCGA TCCG	Punktmutation von D20E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N28T)-fw	GAGGCCCGGGTGATGCCGT TACGGATC	Punktmutation von N28T in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N28T)-rv	GATCCGTAACGGCATCACC CGGGCCTC	Punktmutation von N28T in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(H35R)-fw	CCAGTCCAGGTTGCGCAGG GTCTGCGA	Punktmutation von H35R in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(H35R)-rv	TCGCAGACCCTGCGCAACC TGGACTGG	Punktmutation von H35R in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N36K)-fw	GAACCAGTCCAGCTTGTGC AGGGTCTGCG	Punktmutation von N36K in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N36K)-rv	CGCAGACCCTGCACAAGCT GGACTGGTTC	Punktmutation von N36K in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(E44Q)-fw	GGCCGCGTACCTGGACCAC CTCGAA	Punktmutation von E44Q in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(E44Q)-rv	TTCGAGGTGGTCCAGGTAC GCGGCC	Punktmutation von E44Q in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N50E)-fw	CGATCTGCCCGTCCTCGAG CTGGCCGCGT	Punktmutation von N50E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(N50E)-rv	ACGCGGCCAGCTCGAGGAC GGGCAGATCG	Punktmutation von N50E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(M61L)-fw	GAAGCCGACCTTCAGGGTC ACCTGCCAGT	Punktmutation von M61L in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(M61L)-rv	ACTGGCAGGTGACCCTGAA GGTCGGCTTC	Punktmutation von M61L in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(K62A)-fw	GGCGGAAGCCGACCGCCAT GGTCACCTGCC	Punktmutation von K62A in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(K62A)-rv	GGCAGGTGACCATGGCGGT CGGCTTCCGCC	Punktmutation von K62A in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(D68E)-fw	GAGACCGGTCTCCTCCAGG CGGAAG	Punktmutation von D68E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
SdDod(D68E)-rv	CTCCGCCTGGAGGAGACC GGTCTC	Punktmutation von D68E in <i>BN159_1333</i> von <i>S. davawensis</i>
ScoelDod(D20E)-fw	CGGACGGCCTGCTCGACTC CGTC	Punktmutation von D20E in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
ScoelDod(D20E)-rv	GACGGAGTCGAGCAGGCCG TCCG	Punktmutation von D20E in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
ScoelDod(Q44E)-fw	GCCGCGCACCTCCGTCACC TCGA	Punktmutation von Q44E in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
ScoelDod(Q44E)-rv	TCGAGGTGACGGAGGTGCG CGGC	Punktmutation von Q44E in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
ScoelDod(K62A)-fw	GCGGAAGCCGAGCGCGAGG CCGACCTGC	Punktmutation von K62A in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
ScoelDod(K62A)-rv	GCAGGTGCGCCTCGCGCTC GGCTTCCGC	Punktmutation von K62A in <i>SCO0915</i> von <i>S. coelicolor</i>
P1333DC-fw	ACGGTGGAGTGACGCGTGT GCGAGAGGAGACCCACAT <u>GATTCCGGGGATCCGTCGAC</u> C	<i>Knock-out</i> des Gens <i>BN159_1333</i> ( <u>Start-Codon</u> , <i>FRTsitedown</i> )
P1333DC-rv	AGCGCGCTCAGCCGGTCAC GCTCAGCCCAGCCGCGCTC <u>ATGTAGGCTGGAGCTGCTTC</u>	<i>Knock-out</i> des Gens <i>BN159_1333</i> ( <u>Stopp-Codon</u> , <i>FRTsiteup</i> )

P1333SCO-fw	GCGCTGGACCTGGCCGTCG ACTTC	Insertionsnachweis der Apramycinkassette anstelle von <i>BN159_1333</i>
P1333SCO-rv	CGCACCAAGTTGGAGATCC TCCGCCG	Insertionsnachweis der Apramycinkassette anstelle von <i>BN159_1333</i>
gltA408bp-fw	ACACCGCCGCCTATAAATC CGC	Nachweis <i>gltA</i> Transkript in <i>S. davawensis</i>
gltA408bp-rv	ACGGGTGGCCGATGGACTT CTT	Nachweis <i>gltA</i> Transkript in <i>S. davawensis</i>
Sc-gltA408bp-fw	ACACCGCCGCCTACAAATC CGC	Nachweis <i>gltA</i> Transkript in <i>S. coelicolor</i>
Sc-gltA408bp-rv	ACGGGTGGCCGATCGACTT CTT	Nachweis <i>gltA</i> Transkript in <i>S. coelicolor</i>
1333-207bp-fw	ACCACACCTACCGGGTCAC GGA	Nachweis des <i>BN159_1333</i> Transkripts in <i>S. davawensis</i>
1333-207bp-rv	AACCGGTCTCGTCCAGGCG GAA	Nachweis des <i>BN159_1333</i> Transkripts in <i>S. davawensis</i>
SCO0915-207bp-fw	ACCACACCTACCGGGTCAC CGA	Nachweis des <i>SCO0915</i> Transkripts in <i>S. coelicolor</i>
SCO0915-207bp-rv	AGTCGACTCCTCCAGGCG GAA	Nachweis des <i>SCO0915</i> Transkripts in <i>S. coelicolor</i>

### 3.4 Programme und Datenbanken

In dieser Arbeit wurden folgende Programme und Datenbanken verwendet:

**Tabelle 10: Verwendete Programme und Datenbanken**

Programm/ Datenbank	Anwendung	Referenz
Adobe Photoshop CS2	Bildbearbeitung	<a href="https://www.adobe.com/de/products/photoshop.html">https://www.adobe.com/de/products/photoshop.html</a>
Bowtie 2 2.2.9	Mapping von RNA-Sequenzierungsdaten gegen Referenzsequenzen	(Langmead & Salzberg, 2012) <a href="http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml">http://bowtie-bio.sourceforge.net/bowtie2/index.shtml</a>
ChemDraw Professional 15.0	Zeichnen chemischer Strukturformeln	CambridgeSoft (PerkinElmer Inc., Waltham, USA) <a href="http://cambridgesoft.com">http://cambridgesoft.com</a>
Citavi 5	Literaturverwaltung	<a href="http://www.citavi.de/de/index.html">http://www.citavi.de/de/index.html</a>
CLC Workbench	DNA-Sequenzanalyse	<a href="http://www.clcbio.com/index.php?id=92">http://www.clcbio.com/index.php?id=92</a>
Clustal Omega (EMBL-EBI)	Multiple Sequenz-Alignments	<a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a>
ImageJ	Bildbearbeitung, Bildanalyse	(Schindelin <i>et al.</i> , 2015) <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html">http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html</a>
KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)	Metabolitenrecherche, Zuweisung von Stoffwechselwegen	(Ogata <i>et al.</i> , 1999) <a href="http://www.genome.jp/kegg/">http://www.genome.jp/kegg/</a>
mFold	RNA-Strukturanalyse	(Zuker, 2003) <a href="http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold">http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold</a>
Matlab R2014a	Metaboliten-Datenanalyse	The Mathworks, Natick <a href="http://de.mathworks.com/">http://de.mathworks.com/</a>
Pathway Projector	Zusammenhänge von Stoffwechselwegen	(Kono <i>et al.</i> , 2009) <a href="http://www.g-language.org/PathwayProjector/">http://www.g-language.org/PathwayProjector/</a>
OriginPro 9.1G	Datenanalyse, Graphische Darstellungen	<a href="http://www.originlab.de/">http://www.originlab.de/</a>
QuickChange Primer Design	Planung von Oligonukleotiden für <i>site-directed</i> Mutagenese	<a href="http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp">http://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp</a>
ReadXplorer	Differentielle Transkriptomanalyse	(Hilker <i>et al.</i> , 2014) <a href="https://www.uni-giessen.de/fbz/fb08/Inst/bioinformatik/software/ReadXplorer">https://www.uni-giessen.de/fbz/fb08/Inst/bioinformatik/software/ReadXplorer</a>
Trimmomatic 0.36	Trimming von RNA-Sequenzen nach RNA-Sequenzierung	(Bolger <i>et al.</i> , 2014) <a href="http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic">http://www.usadellab.org/cms/?page=trimmomatic</a>
TubercuList	<i>M. tuberculosis</i> Gen- und Enzymrecherche	<a href="http://tuberculist.epfl.ch/index.html">http://tuberculist.epfl.ch/index.html</a>
UniProt	Identifizierung von Proteinen aus massenspektrometrischen Analysen	(UniProt Consortium, 2007) <a href="http://www.uniprot.org/">http://www.uniprot.org/</a>
VARNA	Erstellung von RNA-Sekundärstrukturen	(Darty <i>et al.</i> , 2009) <a href="http://varna.lri.fr/index.php?lang=en&amp;page=home&amp;css=varna">http://varna.lri.fr/index.php?lang=en&amp;page=home&amp;css=varna</a>

## 4 Methoden

### 4.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.1.1 Kultivierung von Mikroorganismen

Nährmedien, die zur Kultivierung von *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* und Streptomyzeten verwendet wurden, sind in den folgenden Tabellen beschrieben. Zur Herstellung von Nährböden wurde den Nährmedien 1,5-2,0% (w/V) Agar-Agar zugesetzt. Soweit nicht anders angegeben wurden die Nährmedien durch Autoklavieren bei 121°C und 1 bar Überdruck dampfsterilisiert.

**Tabelle 11: Verwendete Nährmedien für *E. coli***

Name	Quelle	Zusammensetzung
Lennox broth (LB)-Medium	(Bertani, 1951; Sambrook & Russell, 2001)	10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 15 g/l Agar-Agar; pH 7,2
SOC	(Hanahan, 1983)	20 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,5 g/l NaCl und 0,19 g/l KCl in H <sub>2</sub> O dest. lösen, auf 1L H <sub>2</sub> O dest. auffüllen. Sterile Zugabe von 20 mM Mg <sup>2+</sup> -Lösung, 20 mM D(+)-Glucose und bei Bedarf 50 µM Riboflavin. Mg <sup>2+</sup> -Lösung: 1 M MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O, 1 M MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O dest. lösen und sterilfiltrieren.

**Tabelle 12: Verwendete Nährmedien für *B. subtilis***

Name	Quelle	Zusammensetzung
T Base	(Harwood & Cutting, 1990)	2 g/l (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 18,3 g/l K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O, 6 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g/l Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O in H <sub>2</sub> O dest. lösen.
SpC-Medium	(Harwood & Cutting, 1990)	20 ml/l T Base, 0,2 ml/l 50% (w/v) Glucose, 0,3 ml/l 1,2% (w/v) MgSO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O, 0,4 ml/l 10% (w/v) Hefeextrakt, 0,5 ml 1% (w/v) Casaminosäuren direkt vor Gebrauch steril zugeben.
SpII-Medium	(Harwood & Cutting, 1990)	200 ml/l T Base, 2 ml/l 50% (w/v) Glucose, 14 ml/l 1,2% (w/v) MgSO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O, 2 ml/l 10% (w/v) Hefeextrakt, 2 ml 1% (w/v) Casaminosäuren, 1 ml/l 0,1 M CaCl <sub>2</sub> direkt vor Gebrauch steril zugeben.
SpII-Medium + EGTA	(Harwood & Cutting, 1990)	200 ml SpII ohne CaCl <sub>2</sub> mit 4 ml EGTA-Lösung (0,1 M, pH 8,0) steril mischen, in Aliquots bei -20°C langfristig lagerungsfähig.

**Tabelle 13: Verwendete Nährmedien für Streptomyzeten**

Name	Quelle	Zusammensetzung
Mannitol-Sojamehl (MS)-Medium	(Hobbs <i>et al.</i> , 1989)	20 g/l Sojamehl, 20 g/l D-Mannitol, 20 g/l Agar-Agar mit Leitungswasser auffüllen, pH 7,2.
Difco nutrient agar (DNA)	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)	8 g/l Difco nutrient broth Puder, 20 g/l Agar-Agar mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen.
Tryptone soya broth (TSB, CASO Bouillon)	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)	17 g/l Pepton aus Casein, 3 g/l Pepton aus Sojamehl, 2,5 g/l D(+)-Glucose, 5 g/l NaCl, 2,5 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen, pH 7,3.
2x YT-Medium	(Kieser <i>et al.</i> , 2000)	16 g/l Trypton, 10 g/l Hefeextrakt, 5g/l NaCl mit H <sub>2</sub> O dest. auffüllen.
Yeast starch (YS)-Medium		10 g/l lösliche Kartoffelstärke, 2 g/l Hefeextrakt in H <sub>2</sub> O dest. lösen, pH 7,2.

**Tabelle 14: Verwendete Antibiotika.** Die Stammlösungen der Antibiotika wurden mit einem 0,22 µM Spritzenfilter steril filtriert und bei -20°C gelagert.

Antibiotikum	Stammlösung	Verwendete Konzentration
Ampicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	100 µg/ml
Apramycin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	50 µg/ml
Carbenicillin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	100 µg/ml
Chloramphenicol	68 mg/ml bzw. 10 mg/ml in Ethanol absolut	34 µg/ml für <i>E. coli</i> 5 µg/ml für <i>B. subtilis</i>
Kanamycin	100 mg/ml in H <sub>2</sub> O dest.	50 µg/ml
Nalidixinsäure	100 mg/ml in 0,15 M NaOH	20 µg/ml
Thiostrepton	100 mg/ml in DMSO	200 µg/ml bzw. 50 µg/ml

*Escherichia coli* wurde unter oxidischen Bedingungen in LB-Medium in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C oder 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Genexpression wurde *E. coli* bei 20°C bzw. 30°C kultiviert (siehe Kapitel 4.1.2). Zur Kultivierung auf Nährböden wurden den Medien 1,5-2% (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 30°C oder 37°C im Brutschrank.

*Bacillus subtilis* wurde unter oxidischen Bedingungen in LB-Medium in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 37°C und 150 rpm bzw. 200 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Zur Kultivierung auf Nährböden wurde dem LB-Medium 1,5% (w/v) Agar-Agar zugesetzt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C im Brutschrank.

Streptomyzeten wurden unter oxidischen Bedingungen und unter Lichtausschluss in YS-Medium oder TSB-Medium in Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C und 180 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Für die Inokulation von Flüssigmedien wurden entweder 1·10<sup>6</sup> Sporen/ml bzw. 1·10<sup>8</sup> Sporen/ml oder ein Plattenausschnitt von 1 cm<sup>2</sup> einer mit Sporen überzogenen MS-Agarplatte zugeben. Zur Kultivierung von Streptomyzeten auf Nährböden wurde entweder MS-Medium oder *Difco nutrient broth*-Agar (DNA) verwendet.

Zur Selektion antibiotikumsresistenter *E. coli*-, *B. subtilis*- oder Streptomyzetenstämme wurden den Medien entsprechende Antibiotika zugesetzt.

#### 4.1.2 Heterologe Überproduktion rekombinanter Proteine in *E. coli* Rosetta 2(DE3) und *E. coli* CpXFMN und CpXFAD

Zur heterologen Überproduktion von Streptomyzeten-Proteinen wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta 2(DE3) der Firma Novagen verwendet, der das Plasmid pRARE2 trägt. Dieses Plasmid trägt Gene für tRNAs selten in *E. coli* gebräuchlicher Codons und gewährleistet so die von Streptomyzeten-Genen. Als Expressionsplasmid wurde pET24a(+) (Novagen) verwendet. Mit diesem Expressionsplasmid ist es möglich, Proteine mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag zu versehen. Die in dieser Arbeit untersuchten Streptomyzeten-Gene wurden alle mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Nde*I und *Xho*I in pET24a(+) ligiert.

Für die Expressionsexperimente wurden pro Protein jeweils viermal 250 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (pRARE) und Kanamycin (pET24a(+)) mit einer über Nacht gewachsenen Kultur auf OD<sub>600</sub> 0,05 beimpft und bei 37°C und 180 rpm kultiviert. Die Proteinüberproduktion wurde bei OD<sub>600</sub> 0,6 mit 1 mM IPTG über einen Zeitraum von 4-5 Stunden bei 30°C induziert. Anschließend wurden die Kulturen in mehreren Schritten jeweils 5 min bei 14.330 x g und 4°C zentrifugiert. Die Zellsedimente wurden in kaltem Aufschlusspuffer A (Tab. 28) resuspendiert, vereint und nochmals zentrifugiert (5 min, 14.330 x g, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellsedimente bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert.

Die Überproduktion des Elongationsfaktors EF-Tu1 in *E. coli* Rosetta 2(DE3) wurde bei OD<sub>600</sub> 0,5 mit 1 mM IPTG induziert. Anschließend wurden die Zellen über Nacht bei 20°C und 180 rpm inkubiert.

Die Überproduktion des Proteins Dodecin in *E. coli* Rosetta 2(DE3) wurde nach (Grininger *et al.*, 2006a) durchgeführt. Hierfür wurde die Überproduktion erst bei OD<sub>600</sub> 1,2 mit 1 mM IPTG induziert. Die Kulturen wurden anschließend drei Stunden bei 20°C und 180 rpm inkubiert.

Wurde Dodecin in *E. coli* CpXFMN und CpXFAD überproduziert, wurden die Kulturen bei 37°C und 180 rpm in LB-Medium bis OD<sub>600</sub> 0,4 inkubiert und die Überproduktion mit 1 mM IPTG gestartet. Zeitgleich wurde den Kulturen 50 µM RF bzw. RoF zugegeben, um das Dodecin *in vivo* mit Flavinen zu beladen. Nach Induktion wurden die Kulturen über Nacht bei 30°C in einem abgedunkelten Schüttelinkubator bis zur stationären Wachstumsphase inkubiert.

#### 4.1.3 Überproduktion von Proteinen in *B. subtilis*

Zur Überproduktion von Proteinen in *B. subtilis* wurde der Stamm Marburg 168 (Wildtyp) verwendet. Als Expressionsplasmid wurde pHT01 (MoBiTec) angewendet, der den IPTG-induzierbaren *Pgrac*-Promotor verwendet. Die in dieser Arbeit untersuchten Streptomyzeten-Dodecin-Gene wurden mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sma*I in die *multiple cloning site* des Vektors ligiert. Die Gene wurden zuvor an die *B. subtilis* codon usage durch den Service GeneArt™ GeneOptimizer™ adaptiert und durch den GeneArt™ Synthesis Service (Thermo Scientific, Schwerte) synthetisiert.

Für Expressionsexperimente in Nährmedium wurden 30 ml LB-Medium mit Chloramphenicol (pHT01) mit einem Inokulum von einem frisch gewachsenen Ausstrich des entsprechenden Stammes auf einem LB-Nährboden beimpft und bei 37°C und 200 rpm über Nacht kultiviert. Als Hauptkulturen wurden 50 ml LB-Medium mit

Chloramphenicol mit einer über Nacht gewachsenen Kultur auf OD<sub>600</sub> 0,05 beimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Den Kulturen wurde von Beginn an entweder kein DMSO oder 125 µl DMSO bzw. 125 µl in DMSO gelöstes 20 mM Riboflavin (RF) bzw. 20 mM Roseoflavin (RoF) (50 µM Endkonzentration) zugegeben. Die Induktion der Protein-überproduktion erfolgte mit 1 mM IPTG bei OD<sub>600</sub> 0,1.

Für die Expressionsexperimente auf Nährböden wurden zunächst Kulturen in LB-Medium mit Chloramphenicol über Nacht bei 37°C und 200 rpm kultiviert. Von diesen wurde die Zellzahl/ml mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und Verdünnungen von ca. 1·10<sup>6</sup> Zellen/ml in LB-Medium angesetzt. Anschließend wurden ca. 50.000 Zellen auf LB-Nährböden mit und ohne 1 mM IPTG sowie mit und ohne DMSO als auch mit 10 µM, 50 µM und 250 µM RoF getropft. Zusätzlich wurde jeder Stamm mit der Impföse dreimal auf dem gleichen Nährboden ausgestrichen. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert.

#### 4.1.4 Überproduktion von Proteinen in Streptomyzeten

Zur Überproduktion von Proteinen in *S. davawensis* wurde das integrative Expressionsplasmid pIJ6902 (Huang *et al.*, 2005) verwendet, das den Thiostrepton-induzierbaren *tipA*-Promotor (P<sub>tipA</sub>) verwendet. Die untersuchten Streptomyzetengene wurden jeweils mit Hilfe der Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XbaI* in die *multiple cloning site* des Plasmids ligiert. Die so erhaltenen Plasmide wurden über Konjugation in *S. davawensis* eingeführt. Zur Verifizierung der chromosomalen Integration der Plasmide wurden putativ positive Klone mit Apramycin selektiert, von diesen genomische DNA isoliert und die Integration mittels PCR nachgewiesen.

Für die Expressionsversuche wurden jeweils 200 ml TSB-Medium mit 1·10<sup>8</sup> Sporen/ml beimpft und die Proteinproduktion mit 25 µg/ml Thiostrepton induziert. Die Kulturen wurden bei 180 rpm und 30°C abgedunkelt inkubiert. Über einen Zeitraum von sieben Tagen wurde den Kulturen jeweils weitere 5 µl einer 50 mg/ml Thiostrepton-Lösung zugegeben, um die Proteinüberproduktion aufrechtzuerhalten (Sinsreekul *et al.*, 2010). Anschließend wurde das Myzel in mehreren Zentrifugationsschritten jeweils 10 min bei 14.330 x g und 4°C sedimentiert. Das Myzel wurde in für die weiteren Versuche entsprechendem Aufschlusspuffer (Tab. 34, Tab. 33) resuspendiert, in einem Zentrifugenröhrchen vereint und nochmals zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Myzelsedimente bis zum Aufschluss bei -20°C gelagert.

#### 4.1.5 Konservierung von Mikroorganismen

Zur Stammhaltung von *E. coli* und *B. subtilis* wurden 670 µl einer in LB-Medium gewachsenen Kultur mit 330 µl einer 60%-igen Glycerinlösung gemischt und bei -80°C gelagert.

Zur Konservierung von Streptomyzetenstämmen wurden Sporensuspensionen hergestellt. Hierzu wurden zunächst 0,5-1 ml einer TSB- oder YS-Flüssigkultur auf MS-Agarplatten ausplattiert und ca. 96 Stunden bei 30°C inkubiert, bis die Nährböden gänzlich mit Luftmyzel/Sporen bedeckt waren. Auf die Platten wurden 5 ml einer sterilen 0,1%-igen Tween-20 Lösung pipettiert, die Sporen mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Suspension 1 min bei höchster Einstellung auf einem Vortexmischer gemischt und durch eine mit steriler Watte gefüllten Spritze in ein neues und steriles 50 ml



Zentrifugenröhrchen filtriert, um Reste von Nährboden und Substratmyzel von den Sporen zu trennen. Die Suspension wurde schließlich 15 min bei 14.330 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Sporensediment in 500-700 µl 20% Glycerinlösung aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

#### 4.1.6 Bestimmung von Trockenmassen

**Tabelle 15: Puffer zur Bestimmung von Trockenmassen**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5	81,2 ml 1 M K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 18,8 ml 1 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , mit H <sub>2</sub> O bidest. auf 1 l auffüllen, pH 7,5

Zur Bestimmung des Trockengewichtes einer Streptomyzetenkultur wurden über Nacht Zentrifugenröhrchen aus Glas bei 100°C inkubiert, in einem Exsikkator ausgekühlt und auf fünf Nachkommastellen genau ausgewogen. Von einer möglichst homogen gewachsenen Kultur wurden 10 ml in das vorgewogene Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 6.744 x g und 4°C zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde vorsichtig und ohne Myzel abgenommen. Das Myzelsediment wurde in 10 ml kaltem Kaliumphosphatpuffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das Myzel über Nacht bei 100°C getrocknet und ebenfalls in einem Exsikkator ausgekühlt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen mit dem getrockneten Myzel gewogen und das Trockengewicht nach folgender Gleichung berechnet, wobei  $T_m$  die Trockenmasse in g/l,  $M_{(RG+M)}$  das Gewicht des Zentrifugenröhrchens inklusive des Myzels in g und  $M_{RG}$  das Gewicht des Zentrifugenröhrchens (Leergewicht) in g ist.

$$T_m = (M_{(RG+M)} - M_{RG}) \cdot 100$$

## 4.2 Molekularbiologische Methoden

### 4.2.1 Transformation von *E. coli*

Die Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach der Calciumchlorid-Methode. Hierzu wurden 50 ml LB-Medium in einem Erlenmeyerkolben mit Schikanen mit einer über Nacht gewachsenen Kultur auf OD<sub>600</sub> 0,03 beimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Sobald die Kultur OD<sub>600</sub> 0,3-0,4 erreichte, wurde diese in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 10 min bei 6.744 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 20 ml einer sterilen und eiskalten 0,1 M Calciumchlorid-Lösung durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen nochmals zentrifugiert (10 min, 6.744 x g, 4°C) und der Überstand erneut verworfen. Das Zellsediment wurde anschließend in 2 ml eiskalter 0,1 M Calciumchlorid/10% Glycerin-Lösung resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigen Stickstoff gegeben. Die dauerhafte Lagerung erfolgte anschließend bei -80°C (Cohen *et al.*, 1972; Sambrook & Russell, 2001).

Zur Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mittels Hitzeschock wurden für einen Transformationsansatz 50 µl Zellsuspension auf Eis aufgetaut und mit 100 ng Plasmid-DNA oder 5 µl eines Ligationsansatzes gemischt. Nach 30 min Inkubation auf

Eis wurden die Zellen für 30 s bei 42°C in ein Wasserbad gehalten und anschließend sofort 2 min lang auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit 250 µl auf 37°C vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden 20 µl und 200 µl Transformationsansatz auf LB-Nährböden, welche mit zur Selektion benötigten Antibiotika versetzt waren, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die gewachsenen Kolonien wurden nochmals auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika vereinzelt und auf die Aufnahme der DNA mittels Kolonie-PCR, Plasmidpräparation und anschließender Restriktionsanalyse bzw. Sequenzierung geprüft.

Zur Transformation sehr großer Plasmide wurden elektrokompente *E. coli*-Zellen verwendet. Hierzu wurde der gewünschte *E. coli*-Stamm in 50 ml LB-Medium mit evtl. zur Selektion notwendigen Antibiotika über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Kultur wurde mit LB-Medium auf 1 l verdünnt, auf vier 1 l Erlenmeyerkolben verteilt und bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator bis OD<sub>600</sub> 0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen 30 min in einem Eiswasserbad inkubiert und in vorgekühlten sterilen Zentrifugenbechern 15 min bei 7.755 x g und 4°C zentrifugiert. Das Zellsediment wurde nach Abnahme des Überstandes in 500 ml eiskaltem destilliertem Wasser resuspendiert und nochmals zentrifugiert (15 min, 7.755 x g, 4°C). Anschließend wurde das Zellsediment in 250 ml eiskalter 10% (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, erneut zentrifugiert (15 min, 7.755 x g, 4°C), wiederum in 10 ml eiskalter 10% Glycerinlösung resuspendiert und nach Vereinen der vier Zellsuspensionen nochmals 15 min bei 4.215 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Zellsediment in 1 ml eiskalter 10% Glycerinlösung resuspendiert, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und sofort in flüssigen Stickstoff gegeben. Für die langfristige Aufbewahrung wurden die Zellen anschließend bei -80°C gelagert (Elvin & Bingham, 1991; Sambrook & Russell, 2001; Miller & Nickoloff, 1995).

Zur Transformation mittels Elektroporation wurden 50 µl elektrokompente *E. coli*-Zellen 10 min auf Eis aufgetaut, in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 0,2 cm Elektrodenabstand überführt und mit 200-400 ng Plasmid-DNA gemischt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte die Elektroporation bei 2,5 kV, 25 µF und 200 Ω in einem „Gene Pulser II“ (Bio-Rad Laboratories). Die Zellen wurden sofort mit 500 µl SOC-Medium (Raumtemperatur) in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Stunde bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Je Transformationsansatz wurden 20 µl und 200 µl auf LB-Nährböden mit entsprechenden zur Selektion benötigten Antibiotika ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden nochmals auf LB-Nährböden mit entsprechenden Antibiotika vereinzelt und mittels Kolonie-PCR auf die Aufnahme der Plasmid-DNA verifiziert.

Die Konjugation (*triparental mating*) elektrokompenter *E. coli*-Zellen wurde in dieser Arbeit gewählt, um DNA-Fragmente größer 100 kb von einer Spenderzelle (Donor) auf eine Empfängerzelle (Rezeptor) durch direkten Zell-Zellkontakt zu übertragen. Hierzu wurde der *E. coli*-Stamm GM2163 als Rezeptor und die *E. coli*-Stämme DH5α pR9406 und DH10b pESAC13.4 bzw. pESAC13.9 als Donoren eingesetzt. Die für den Gentransfer benötigten Proteine werden dabei durch die sich auf dem konjugativen Helferplasmid pR9406 befindenden Gene kodiert. Die drei *E. coli*-Stämme wurden in jeweils 30 ml LB-Medium mit zur Selektion entsprechend notwendigen Antibiotika mit 1% einer über Nacht bei 37°C und 200 rpm gewachsenen Kultur beimpft. Die Kulturen wurden bei 37°C und 200 rpm bis OD<sub>600</sub> 0,4 inkubiert, in sterile Zentrifugenröhrchen

überführt und 10 min bei 6.744 x g und 4°C zentrifugiert. Nachdem der Überstand vorsichtig abgenommen wurde, wurden die Zellen in 10 ml LB-Medium resuspendiert, um die sich im Zellsediment noch befindlichen Antibiotika zu entfernen, und anschließend erneut zentrifugiert (10 min, 6.744 x g, 4°C). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Die Zellsedimente der drei Stämme wurden in jeweils 500 µl LB-Medium aufgenommen und miteinander gemischt. Zur Konjugation wurden jeweils 30 µl der Zellsuspension auf LB-Nährböden ohne Antibiotika pipettiert. Nachdem die Zellsuspensionstropfen angetrocknet waren, wurden die Kulturen über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert, damit der Genaustausch ohne störende Antibiotika zwischen den *E. coli*-Stämmen stattfinden konnte. Zur Selektion der gewünschten *E. coli*-Stämme mit den Plasmiden pR9406 und pESAC13.4 bzw. pESAC13.9 wurden die über Nacht gewachsenen Kolonien nochmals auf LB-Nährböden mit Chloramphenicol (GM2163), Carbenicillin (pR9406) und Kanamycin (pESAC13.4/9) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Verifizierung positiver *E. coli* Klone erfolgte mittels Kolonie-PCR.

#### 4.2.2 Transformation von *B. subtilis*

Die Herstellung und Transformation kompetenter *B. subtilis*-Zellen erfolgte nach der *two-step transformation*-Methode (Harwood & Cutting, 1990). Hierzu wurde der gewünschte *B. subtilis*-Stamm auf einen LB-Nährboden ausgestrichen und über Nacht bei 30°C im Brutschrank kultiviert. 20 ml frisch angesetztes und vorgewärmtes SpC-Medium wurden mit der Plattenkultur auf OD<sub>600</sub> 0,5 beimpft und bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die optische Dichte wurde halbstündlich gemessen, um den Übergang von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase zu ermitteln. Nachdem die Zellen von der exponentiellen in die stationäre Wachstumsphase übergingen, was daran beobachtet werden konnte, dass sich die optische Dichte über 20-30 min nicht veränderte, wurden 200 ml vorgewärmtes SpII-Medium mit 2 ml der stationärer Kultur beimpft und weiter bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Nach 90 min Inkubation wurden die Zellen 5 min bei 6.744 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in sterilen Zentrifugenröhrchen aufbewahrt. Das Zellsediment wurde mit 18 ml des Mediumüberstandes resuspendiert, 2 ml steriles Glycerin hinzu gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Aliquots aufgeteilt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und für eine längerfristige Aufbewahrung bei -80°C gelagert (Harwood & Cutting, 1990).

Zur Transformation wurden 0,5 ml gefrorene kompetente *B. subtilis*-Zellen so schnell wie möglich in einem 37°C Wasserbad aufgetaut und sofort mit einem Volumen SpII-Medium + EGTA vorsichtig gemischt (Harwood & Cutting, 1990). 0,2-0,5 ml der aufgetauten Zellen wurden in ein steriles Reagenzglas überführt und 0,5 µg Plasmid-DNA zugegeben, gemischt und 30 min bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Jeweils 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf LB-Nährböden mit Chloramphenicol (pHT01) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Die gewachsenen Kolonien wurden nochmals auf LB-Nährböden mit Chloramphenicol ausgestrichen und auf die Aufnahme der Plasmid-DNA mittels Kolonie-PCR getestet.

### 4.2.3 Transformation von Streptomyzeten mittels Konjugation

Zur Übertragung von Plasmid-DNA von *E. coli* auf Streptomyzeten wurde in dieser Arbeit die Konjugation angewendet. Hierzu wurden die Stämme *E. coli* ET12567 mit dem Helferplasmid pUB307 bzw. *E. coli* GM2163 mit dem Helferplasmid pR9406 verwendet. Beide selbst transmissiblen Plasmide tragen die für den DNA-Transfer notwendigen Transferegene (*tra*-Gene). Die *E. coli*-Stämme selbst sind methylierungs-sensitiv, weshalb nur nicht-methylierte Plasmid-DNA für die Transformation eingesetzt werden konnte, da diese sonst von den wirtseigenen Restriktionsendonukleasen abgebaut würden.

Zunächst wurde einer der zur Konjugation verwendeten *E. coli*-Stämme mit der gewünschten Plasmid-DNA mittels Elektroporation transformiert und auf LB-Nährböden mit zur Selektion notwendigen Antibiotika über Nacht bei 37°C inkubiert. 30 ml LB-Medium mit selektiven Antibiotika wurden mit 1% einer 10 ml bei 37°C und 200 rpm über Nacht gewachsenen Kultur beimpft und bei 37°C und 200 rpm bis OD<sub>600</sub> 0,3-0,4 inkubiert. Die Kultur wurde in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt, 10 min bei 6.744 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellsediment wurde mit 10 ml LB-Medium resuspendiert und nochmals zentrifugiert (10 min, 6.744 x g, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in 500 µl LB-Medium resuspendiert. Währenddessen wurden 50 µl Streptomyzeten-Sporensuspension (ca. 1·10<sup>8</sup> Sporen) in 500 µl 2x YT-Medium aufgenommen, 10 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert und anschließend bei Raumtemperatur abgekühlt. Die ausgekeimten Sporen wurden mit den gewaschenen *E. coli*-Zellen gemischt, kurz zentrifugiert und ca. 900 µl des Mediumüberstandes abgenommen. Das Zellsediment wurde in den restlichen 100 µl Medium resuspendiert und auf einem MS-Nährboden mit 10 mM MgCl<sub>2</sub> ausplattiert. Nach ca. 16 Stunden Inkubation bei 30°C wurde der MS-Nährboden mit 1 ml einer sterilen Lösung aus destilliertem Wasser, 0,5 mg Nalidixinsäure und dem zur Selektion notwendigem Antibiotikum gleichmäßig überschichtet und weitere 4-8 Tage bei 30°C inkubiert. Sporen einzeln gewachsener Streptomyzeten-Kolonien (Exkonjuganten) wurden in zwei weiteren Vereinzlungsschritten auf MS-Nährböden, die mit 50 µg/ml Nalidixinsäure und dem zur Selektion notwendigen Antibiotikum versetzt waren, ausgestrichen und so von den zur Konjugation verwendeten *E. coli*-Zellen gereinigt.

### 4.2.4 Isolierung chromosomaler und niedermolekularer DNA

**Tabelle 16: Puffer zur Isolierung chromosomaler DNA aus Streptomyzeten**

Puffer	Zusammensetzung
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0
Lysepuffer	TE-Puffer, 1,2% Triton-X, 20 mg/ml Lysozym

Zur Isolierung hoch qualitativer chromosomaler DNA aus Streptomyzeten, die als Matrizen für Genamplifikationen mittels PCR diente, wurde das „GeneJET Genomic DNA Purification Kit“ von Thermo Fisher Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierzu wurde der entsprechende Streptomyzetenstamm in TSB-Medium mit zur Selektion notwendigen Antibiotika mindestens 24-48 Stunden bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Aus der Kultur wurde Myzel entnommen, dessen Volumen etwa

100 µl maß. Durch Zentrifugation wurde dieses sedimentiert (1 min, 6.744 x g, 4°C) und zweimal mit 1 ml TE-Puffer gewaschen. Das Myzel wurde anschließend in 180 µl Lysepuffer resuspendiert und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die weitere Isolierung chromosomaler DNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit Hilfe des „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ von Thermo Fisher Scientific. Hierzu wurden 10 ml LB-Medium mit zur Selektion notwendigen Antibiotika mit dem Plasmid-DNA tragenden *E. coli*-Stamm beimpft und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mittels Zentrifugation (5 min, 21.917 x g, 4°C) sedimentiert und der Mediumüberstand verworfen. Die weitere Plasmid-DNA-Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus enzymatischen Reaktionen mit Nebenprodukten wurde das „GeneJET Gel Extraction Kit“ von Thermo Fisher Scientific verwendet. Hierzu wurden die präparativen Ansätze in einem Agarosegel gelelektrophoretisch aufgetrennt und in einer Ethidiumbromidlösung inkubiert. Mit einem Skalpell wurden die gewünschten DNA-Fragmente unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und weiter nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegelstück gereinigt. Zur Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen ohne unerwünschte Nebenprodukte oder von verdauten linearen Vektoren, die für Ligationen verwendet werden sollten, wurde das „GeneJET PCR Purification Kit“ von Thermo Fischer Scientific nach Angaben des Herstellers angewendet.

#### 4.2.5 Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomyzeten

**Tabelle 17: Verwendete Puffer und Lösungen zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomyzeten**

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Extraktionspuffer	10 mM Natriumacetat, 150 mM Saccharose, pH 4,8, in DEPC-behandeltem bidest. H <sub>2</sub> O, sterilfiltriert.
Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung	25 Teile Chloroform, 1 Teil Isomaylalkohol, in DEPC-behandeltem bidest. H <sub>2</sub> O
Natriumacetat	3 M Natriumacetat, pH 6,5

Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus Streptomyzeten, die als Matrize für eine cDNA-Synthese dienen sollte, wurde ein abgewandeltes Protokoll der „Hot-Phenol-Methode“ angewendet (Mattatall & Sanderson, 1996). Hierzu wurden 50 ml YS-Medium mit  $1 \cdot 10^8$  Sporen beimpft und bei 30°C und 180 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden bei Erreichen der exponentiellen bzw. stationären Wachstumsphasen in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und sofort für 30 s bei 14.330 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Mediumüberstand wurde so schnell wie möglich abgekippt, das Myzelsediment mit 1 ml DEPC-behandeltem Wasser in 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss und ca. 200 µl Silica-Beads überführt und nochmals für 16 s bei 16.100 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend sofort verworfen und die Myzelsedimente in flüssigen Stickstoff eingefroren. Das Myzel einer Probe wurde in 300 µl Extraktionspuffer resuspendiert und mit 20 µl 20%-iger SDS-Lösung und 300 µl Phenol gemischt. Zum Aufschluss der Zellen wurden die Proben sechsmal 1 min bei 6 m/s im FastPrep-24<sup>TM</sup> 5G Instrument (MP Biomedicals) behandelt (siehe auch Kapitel 4.3.1). Die Reaktionsgefäße wurden anschließend 15 min bei

16.100 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand ohne Interphase in ein 2 ml MaXtract™ High Density Reaktionsgefäß (Qiagen) überführt und mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung durch intensives Invertieren gemischt. Die Reaktionsgefäße wurden erneut zentrifugiert (15 min, 16.100 x g, 4°C), der Überstand in ein neues MaXtract™ High Density Reaktionsgefäß überführt und die RNA-Extraktion mittels Chloroform wiederholt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10% einer 3 M Natriumacetat-Lösung sowie einem Volumen Isopropanol gemischt und über Nacht bei -80°C gefällt. Die gefällten Nukleinsäuren (DNA und RNA) wurden anschließend für eine Stunde bei 16.100 x g und 4°C sedimentiert, in 700 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (10 min, 16.100 x g, 4°C). Die getrocknete Nukleinsäure wurde in 500 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Um die Gesamt-RNA von der noch vorhandenen DNA zu reinigen, wurde das DNA/RNA-Gemisch mit der RNase-freien DNaseI der Firma Qiagen behandelt. Hierzu wurden nach Angaben des „RNeasy MinElute Cleanup Kits“ von Qiagen 500 µg DNA/RNA mit 20 µl RDD-Puffer, 2,5 µl RNase-freier DNaseI (ca. 6,8 Kunitz Units) in einem Ansatzvolumen von 200 µl in DEPC-behandeltem Wasser eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend mit 10% einer 3 M Natriumacetat-Lösung sowie einem Volumen Isopropanol über Nacht bei -80°C gefällt, 20 min bei 16.100 x g und 4°C zentrifugiert und mit 500 µl 70%-igem Ethanol gewaschen und nochmals zentrifugiert (10 min, 16.100 x g, 4°C). Die getrocknete RNA wurde anschließend in 100 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst. Vor und nach der DNaseI-Behandlung wurden jeweils 1 µg des DNA/RNA-Gemisches und der isolierten Gesamt-RNA mit Hilfe eines RNA-Agarosegels gelelektrophoretisch analysiert.

Zur Isolierung hochqualitativer Gesamt-RNA aus Streptomyzeten zur differentiellen Analyse nicht-stabiler RNAs (*messenger* RNA, mRNA) wurden 30 ml YS-Medium mit  $2 \cdot 10^6$  Sporen/ml beimpft und bei 30°C und 180 rpm abgedunkelt inkubiert. Exponentielle Kulturen wurden bis  $OD_{450} 1,5 \pm 0,1$  und stationäre Kulturen abhängig vom Stamm bis  $OD_{450} 4,4 \pm 0,8$  inkubiert. Innerhalb einer Minute wurden je 1,5 ml möglichst homogen gewachsene Kultur in vier 2 ml RNase-freie Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss überführt und ohne vorheriges Verschließen bei Maximalgeschwindigkeit und RT für ca. 20 s zentrifugiert. Der Medienüberstand wurde abgekippt und verschlossen sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Proben wurden bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

Die RNA-Isolierung und RNA-Sequenzierung erfolgte am Centrum für Biotechnologie (CeBiTec), Universität Bielefeld. Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben mit Hilfe des Komplettsystems „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) isoliert und die RNA-Qualität mittels NanoDrop und Xpose® Reader sowie einer zusätzlichen Test-PCR überprüft. War die RNA noch mit DNA verunreinigt, wurde ein zusätzlicher DNase-Restriktionsschritt mit „RiboLock RNase Inhibitor“ nach Herstellerangaben durchgeführt. Zur Abreicherung stabiler RNAs wurde das Komplettsystem „Ribo-Zero rRNA Removal Kit (Bacteria)“ von Illumina Inc. nach Angaben des Herstellers verwendet, während die mRNA-Bibliothek mit dem Komplettsystem „TrueSeq Stranded mRNA Library Prep Kit“ (Illumina Inc.) ebenfalls nach Angaben des Herstellers erstellt wurde. Die *paired-end*-RNA-Sequenzierung erfolgte mit Hilfe des RNA-Sequenziergerätes Illumina HiSeq1500 (Illumina Inc.).

#### 4.2.6 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wird anhand einer DNA-Matrize (*template*) eine spezifische DNA-Sequenz unter Zugabe von synthetischen Oligonukleotiden, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren, Didesoxynukleotiden (dNTPs), einer thermostabilen DNA-Polymerase und Pufferlösung exponentiell in mehreren Reaktionszyklen amplifiziert.

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen mit hohem GC-Gehalt aus Streptomyzeten wurde die „KAPAHifi DNA-Polymerase“ der Firma Peqlab verwendet. Ein Standardansatz einer solchen PCR-Reaktion sowie die Einstellungen des Thermocyclers für eine Standard-PCR sind in Tabelle 18 und Tabelle 19 angegeben.

**Tabelle 18: Standardansatz einer PCR-Reaktion mit der KAPAHifi DNA-Polymerase für GC-reiche DNA-Matrizen**

Reagenz	Volumen in 25 µl Gesamtvolumen
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	ad 25 µl
5x KAPAHifi™ GC Buffer	5 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	0,75 µl
Forward-Oligonukleotid (10 µM)	0,75 µl
Revers-Oligonukleotid (10 µM)	0,5 µl
KAPAHifi™ DNA Polymerase (1 U/µl)	0,5 µl
DNA-Matrize	genomische DNA: ≤ 50 ng Plasmid-DNA: ≤ 5 ng
Gesamt	25 µl

**Tabelle 19: Einstellungen des Thermocyclers einer PCR-Standardreaktion mit der KAPAHifi DNA-Polymerase**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	
Denaturierung	98°C	20 s	15-35 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide	$T_m \pm 10^\circ\text{C}$	15 s	
Elongation	72°C	30 s/kb	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die Kolonie-PCR wurde in dieser Arbeit verwendet, um Transformanten ohne vorherige Isolierung entsprechender Plasmid-DNA in einem analytischen Maßstab schnell und einfach zu verifizieren. Hierzu wurden mit einer sterilen Pipettenspitze einzelne Bakterienkolonien, die zunächst auf einem LB-Nährboden mit zur Selektion notwendigen Antibiotika herangezogen wurden, in einen vorgefertigten PCR-Standardreaktionsansatz mit einem Ansatzvolumen von 25 µl überführt.

Zum Einfügen ortsspezifischer Punktmutationen in Gensequenzen mit Hilfe einer PCR (*site-directed* Mutagenese-PCR) wurde das „QuikChange II Site-directed Mutagenesis Kit“ von Agilent Technologies verwendet. Für die *site-directed* Mutagenese-PCR wurde methylierte doppelsträngige Plasmid-DNA, die die zu mutierende Gensequenz enthält, zusammen mit Hilfe von Oligonukleotiden, welche jeweils komplementär zum entgegengesetzten Plasmidstrang sind und beide die Punktmutation enthalten, in

mehreren Zyklen mit der *PfuUltra* HF DNA-Polymerase amplifiziert. Der Standardansatz einer *site-directed* Mutagenese-PCR ist in Tabelle 20 angegeben. Die jeweiligen Oligonukleotide mit entsprechenden Punktmutationen wurden anhand der originalen Plasmidsequenz und dem „QuickChange Primer Design“ Programm (siehe Tab. 10) geplant.

**Tabelle 20: Standardansatz einer *site-directed* Mutagenese-PCR**

Reagenz	Volumen in 25 µl Gesamtvolumen
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	ad 25 µl
10x Reaktionspuffer	2,5 µl
dNTP-Mix (10 mM je dNTP)	0,5 µl
Forward-Oligonukleotid (10 µM)	0,8 µl
Revers-Oligonukleotid (10 µM)	0,8 µl
QuikSolution	1,5 µl
DNA-Matrize (doppelsträngig, methyliert)	5 ng
Gesamt	25 µl

Anschließend wurde dem Standardansatz 0,5 µl *PfuUltra* HF DNA-Polymerase (2,5 U/µl) zugegeben und die PCR-Reaktion nach den Thermocycler-Einstellungen in Tabelle 21 durchgeführt.

**Tabelle 21: Einstellungen des Thermocyclers einer *site-directed* Mutagenese-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 min	
Denaturierung	95°C	50 s	18 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide	60°C	50 s	
Elongation	68°C	1 min/kb	
Finale Elongation	68°C	7 min	
Kühlung	4°C	∞	

Zum Abbau der methylierten parentalen Plasmid-DNA wurde dem Ansatz 0,5 µl *DpnI* (10 U/µl) zugegeben und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Transformation ultrakompetenter *E. coli* XL10-Gold (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers. Die Verifizierung der eingeführten Punktmutation wurde nach Isolierung der Plasmid-DNA mittels Sequenzierung durchgeführt.

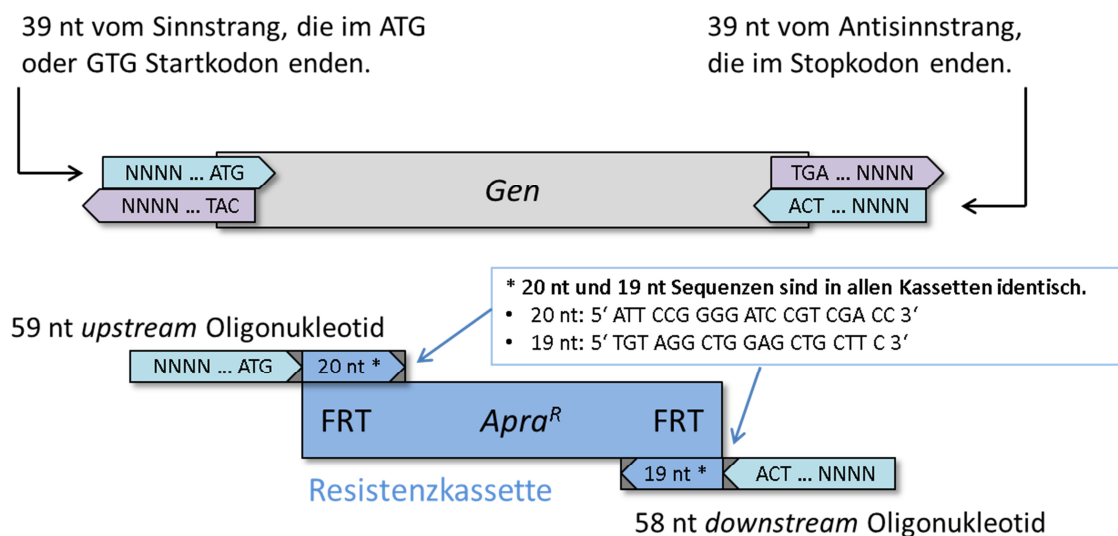
Zur Disruption von Genen in *S. davawensis* wurde das „PCR-targeting“ System in Streptomyzeten angewendet (Gust *et al.*, 2003) (siehe Kapitel 4.2.11). Hierfür wurde eine Apramycin-Resistenzkassette verwendet, die mit Hilfe langer Oligonukleotide amplifiziert wurde. Die Oligonukleotide (58 nt und 59 nt) besitzen jeweils am 5'-Ende eine 39 nt lange Sequenz, die zum einen im ATG- oder GTG-Startcodon des zu deletierenden Gens auf dem Sinnstrang (*sense strand*) bzw. im Stopcodon des Antisinnstrangs (*anti-sense strand*) endet (Abb. 10). Die Sequenzen am 3'-Ende der Oligonukleotide sind zu den Enden der Resistenzkassette homolog.

Zur Amplifizierung der Apramycin-Resistenzkassette wurde die „KAPAHifi DNA-Polymerase“ von Peqlab nach Anleitung des Herstellers verwendet. Die PCR wurde in einem Ansatzvolumen von 50µl durchgeführt. Die Einstellungen des Thermocyclers sind Tabelle 22 zu entnehmen.



**Tabelle 22: Einstellungen des Thermocyclers zur Amplifizierung der Resistenzkassette für das „PCR-targeting“ System in Streptomyzeten**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	98°C	45 s	10 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide	50°C	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Denaturierung	98°C	45 s	15 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide	55°C	45 s	
Elongation	72°C	45 s	
Finale Elongation	72°C	5 min	
Kühlung	4°C	∞	



**Abbildung 10: Schematische Darstellung für das Design von Oligonukleotiden für das PCR-targeting System (nach Gust *et al.*, 2003).**

Zum Nachweis von mRNA-Transkripten mit Hilfe einer PCR wurde die Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) angewendet. Hierbei wird das entsprechende Transkript mit spezifischen Oligonukleotiden anhand isolierter Gesamt-RNA zunächst mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (Veres *et al.*, 1987). Die RNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert anhand von spezifischen Oligonukleotiden oder *random* Hexamer-Oligonukleotiden zunächst einen Hybriddoppelstrang aus RNA und cDNA (*complementary DNA*), von dem sie anschließend aufgrund ihrer Ribonuklease H-Aktivität den RNA-Anteil abbaut.

Zur Synthese der cDNA wurde das „Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR“ der Firma Thermo Scientific angewendet, das eine rekombinante Variante der reversen Transkriptase Moloney Murine Leukämievirus (M-MuLV-RT) (Moloney, 1960) verwendet. Der Enzymmix des Kits beinhaltet neben der M-MuLV-RT auch einen RNase-Inhibitor (RiboLock™ RNase Inhibitor), der den Abbau der RNA durch die RNasen A, B und C verhindert. Der 5x Reaktionsmix des Kits enthält neben regulären dNTPs zusätzlich für eukaryotische Transkripte Oligo(dT)<sub>18</sub> mit einem Poly-A-Schwanz sowie *random* Hexamer-Oligonukleotide. Im Standardansatz wurden zusätzlich spezifisch flankierende Oligonukleotide zugegeben, die die Sensitivität der

Amplifikation erhöhen sollten. Zur Verifizierung der RT-PCR wurde das konstitutiv transkribierte Gen *gltA*, das für das Enzym der Citrat-Synthase kodiert, mitgeführt. Als Negativkontrolle diente ein Reaktionsansatz ohne RNA-Matrize als auch ein Reaktionsansatz ohne reverse Transkriptase. Ein Standardansatz für eine RT-PCR-Reaktion ist in Tabelle 23 angegeben.

**Tabelle 23: Standardansatz einer RT-PCR-Reaktion.** X stellt den Ansatz des nachzuweisenden Transkripts dar, RT(+) den Ansatz für die Positivkontrolle und RT(-) und NTC (*Non Template Control*) die Ansätze der Negativkontrollen ohne reverse Transkriptase bzw. ohne RNA-Matrize.

Reagenz	X	RT(+)	RT(-)	NTC
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
5x Reaktionsmix	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Oligonukleotidmix (je 5 µM)	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl
Maxima Enzymmix	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
RNA-Matrize (1 µg/µl)	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
Gesamt	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl

Die RT-PCR-Ansätze wurden zunächst 10 min bei 25°C und nochmals aufgrund des hohen GC-Gehalts von Streptomyzeten 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion 5 min bei 85°C gestoppt und die Proben bei -20°C gelagert. Um die Spezifität des Nachweises zu erhöhen, wurden 2,5 µl des Ansatzes als Matrize in einer *touchdown*-PCR eingesetzt. Hierfür wurde die „Invitrogen™ Platinum™ Taq DNA-Polymerase“ von Thermo Scientific nach Angaben des Herstellers verwendet. Der Standardansatz und die Einstellungen des Thermocyclers für die in dieser Arbeit verwendeten *touchdown*-PCR ist in Tabelle 24 und Tabelle 25 angegeben.

**Tabelle 24: Standardansatz einer *touchdown*-PCR-Reaktion**

Reagenz	Volumen in 50 µl Gesamtvolumen	Finale Konzentration
H <sub>2</sub> O (Nuklease-frei)	34,75 µl	-
10x PCR-Puffer, -Mg	5 µl	1x
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 µl	1,5 mM
dNTP-Mix (10 mM)	1 µl	0,2 mM jeweils
Forward-Oligonukleotid (10 µM)	1 µl	0,2 µM
Revers-Oligonukleotid (10 µM)	1 µl	0,2 µM
DNA-Matrize	2,5 µl	< 500 ng/Reaktion
KB Extender	3 µl	6%
Platinum™ Taq DNA-Polymerase	0,25 µl	2,5 u
Gesamt	50 µl	

**Tabelle 25: Einstellungen des Thermocyclers für eine Standardreaktion einer *touchdown*-PCR-Reaktion**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	2 min	
Denaturierung	94°C	30 s	5 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide und Elongation	70°C	1 min/kb	
Denaturierung	94°C	30 s	5 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide und Elongation	65°C	1 min/kb	
Denaturierung	94°C	30 s	5 Zyklen
Hybridisierung der Oligonukleotide	$T_m \pm 10^\circ\text{C}$	30 s	
Elongation	70°C	1 min/kb	
Finale Elongation	70°C	10 min	
Kühlung	10°C	$\infty$	

#### 4.2.7 Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung und Phosphorylierung von DNA

Die Restriktion von DNA wurde zu Klonierungszwecken zur Vorbereitung von für Ligationen benötigten PCR-Produkten und Plasmiden als auch zur Charakterisierung von generierten Plasmiden angewendet. In dieser Arbeit wurden FastDigest Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Für präparative Restriktionsansätze wurden 1 µg Plasmid-DNA bzw. PCR-Produkt und 1 µl Restriktionsenzym (10 U/µl) in einem 50 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Zur Charakterisierung von Klonierungsprodukten wurden 100-200 ng Plasmid-DNA in einem 20 µl Restriktionsansatz eingesetzt. Die Ansätze wurden jeweils 30 min bei 37°C inkubiert. Handelte es sich um PCR-Produkte, so wurde die Inkubationszeit auf eine Stunde erhöht, sofern die eingesetzten Enzyme keine Star-Aktivität aufwiesen.

Zur Dephosphorylierung linearisierter Plasmide wurde die alkalische Phosphatase FastAP der Firma Thermo Fisher Scientific nach Hertselleangaben verwendet.

Zur Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide (z. B. Linker-DNA) wurde die T4-Polynukleotid-Kinase (Thermo Fisher Scientific) ebenfalls nach Herstellangaben verwendet.

#### 4.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Für Ligationen wurde die T4-DNA-Polymerase von Thermo Fisher Scientific eingesetzt. Diese katalysiert unter ATP-Verbrauch die kovalente Bindung zweier doppelsträngiger DNA-Moleküle durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxygruppe der DNA-Enden. Die Ligationen wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt, wobei das molare Verhältnis von Plasmid und Insert 1:5 betrug. In einem Standardligationsansatz wurden 40-80 ng Plasmid eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 30 min bei Raumtemperatur. Zur Transformation chemisch kompetenter Zellen wurden 5 µl Ligationsansatz verwendet.

#### 4.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Sequenzierung von DNA

Zur Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde das Spektralphotometer NanoVue der Firma GE Healthcare verwendet. Die Reinheit von DNA und RNA wurde durch die Absorptionsverhältnisse bei den Wellenlängen  $\lambda=260$  nm und  $\lambda=280$  nm abgeschätzt.

Die Sequenzierung generierter Plasmid-DNA wurde mit dem „Mix2Seq Kit“ von und durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach der Methode von Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierzu wurden pro Sequenzierungsansatz 15  $\mu$ l Plasmid-DNA mit einer Konzentration von 50 ng/ $\mu$ l mit 2  $\mu$ l 10  $\mu$ M Oligonukleotid gemischt. Der Abgleich der sequenzierten DNA-Sequenz erfolgte mit dem Programm CLC Workbench.

#### 4.2.10 Agarosegelelektrophorese von DNA und RNA

Die Analyse von DNA- und RNA-Fragmenten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Da RNA im Gegensatz zu DNA sehr schnell von RNasen abgebaut wird, wurden für DNA- und RNA-Agarose-Gelelektrophoresen unterschiedliche Puffer verwendet.

**Tabelle 26: Zusammensetzung des TAE-Puffers für DNA-Agarosegele**

Puffer	Zusammensetzung
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-Base, 1 M Eisessig, 50 mM EDTA, pH 8,5

Die gelelektrophoretische Analyse von DNA-Fragmenten aus Restriktionsansätzen und PCR-Ansätzen erfolgte in horizontalen Gelelektrophoresekammern (Sambrook & Russell, 2001). Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-1%-ige Agarosegele in 1x TAE-Puffer verwendet. Die Gelelektrophorese verlief 50 min bei 80-100 V in 1x TAE-Puffer. Als DNA-Probenpuffer wurden der 6x DNA Loading Dye, 6x TriTrack DNA Loading Dye oder der 10x FastDigest Green Buffer von Thermo Fisher Scientific verwendet. Zum Größenabgleich mittelgroßer bis großer DNA-Fragmente wurde der Größenstandard GeneRuler 1kb DNA Ladder oder für kleine DNA-Fragmente der GeneRuler 100 bp DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet. Anschließend wurde die im Agarosegel aufgetrennte DNA 15 min in einer Ethidiumbromidlösung (1  $\mu$ g/ml) inkubiert, wobei der organische Farbstoff Ethidiumbromid zwischen den Basen der Nukleinsäuren interkaliert. Das Agarosegel wurde 15 min in bidest. H<sub>2</sub>O entfärbt, um überschüssiges Ethidiumbromid aus der Gelmatrix zu entfernen und die aufgetrennte DNA wurde unter UV-Licht visualisiert und fotografiert.

**Tabelle 27: Zusammensetzung des MOPS-Puffers für RNA-Agarosegele**

Puffer	Zusammensetzung
MOPS-Puffer (10x)	200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA, pH 7,0, autoklavieren.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von RNA wurden 1,5%-ige Agarosegele in 1x MOPS-Puffer mit 2% Formaldehyd verwendet. Hierzu wurden zunächst die Elektrophoresekammer und die Gelgießvorrichtung mit Gelschlitten sowie Proben-

kamm mit 70%-igem Ethanol und anschließend mit RNase-AWAY (Sigma-Aldrich) behandelt. Pufferlösungen und RNA-Proben wurden in mit 1% DEPC-behandeltem und autoklaviertem Wasser angesetzt. Für das Gel wurden 1,5 g Agarose in 94,6 ml 1x MOPS aufgekocht, auf 60°C abgekühlt und mit 5,4 ml 37% Formaldehyd gemischt. Zur Analyse der Intaktheit der RNA-Proben wurden 1 µg Gesamt-RNA mit 2x RNA Loading Dye der Firma Thermo Fisher Scientific versetzt und 10 min bei 70°C erhitzt, so dass Sekundärstrukturen der RNA aufgelöst wurden. Als Größenstandard wurde entweder der RiboRuler High Range RNA Ladder oder der RiboRuler Low Range RNA Ladder von Thermo Fisher Scientific verwendet. Sowohl der Probenpuffer als auch die Größenmarker enthalten Ethidiumbromid, so dass eine Inkubation des Gels nach der Gelelektrophorese nicht nötig war. Die Auftrennung der RNA erfolgte anschließend für 15 min bei 50 V und weiterhin ca. zwei Stunden bei 70 V, so dass sich die Lauffront des Probenpuffers ca. 2 cm vor dem Ende des Agarosegels befand. Die 16SrRNA und 23SrRNA wurde daraufhin unter UV-Licht visualisiert und dokumentiert.

#### 4.2.11 Disruption von *BN159\_1333* in *S. davawensis* mit Hilfe des „PCR-targeting“-Systems in Streptomyzeten

Zur Erstellung einer *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante wurde das „PCR-targeting“-System abgewandelt nach Gust verwendet (Gust *et al.*, 2003).

Hierbei wurde das Dodecin-Gen *BN159\_1333* zunächst durch eine Apramycin-Resistenzkassette mit Hilfe des  $\lambda$  RED (*gam*, *bet*, *exo*)-Systems in einer etwa 100 kb langen subgenomischen Sequenz auf einem „*E. coli* – *Streptomyces artificial chromosome*“ (pESAC) in *E. coli* ersetzt. Die Resistenzkassette wurde anhand des modifizierten Vektors pIJ773 mit langen PCR-Oligonukleotiden amplifiziert, welche 39 nt lange homologe Sequenzen zu den chromosomalen Bereichen stromauf- und stromabwärts des Dodecin-Gens besitzen (Abb. 10). Da das verwendete pESAC bereits einen *oriT* besitzt, der zur Konjugation von Plasmiden in Streptomyzeten nötig ist, wurde der ursprüngliche *oriT* in pIJ773 vor der Amplifizierung der Resistenzkassette entfernt. Zur Disruption des Dodecin-Gens mit Hilfe der Resistenzkassette wurde der *E. coli* DH10b Stamm mit den Plasmiden pESAC13.4 und pESAC13.9, welche unterschiedliche subgenomische Sequenzen mit dem Dodecin-Gen trugen, für eine Elektroporation vorbereitet und anschließend mit dem  $\lambda$  RED-Genen tragenden Plasmid pIJ790 transformiert. Jeweils einer der positiven Klone wurde erneut für eine Elektroporation vorbereitet, mit dem linearen PCR-Fragment der Resistenzkassette transformiert und anschließend auf homologe Rekombination durch Selektion mit Apramycin getestet. Apramycin-resistente Klone wurden mit Hilfe einer PCR auf ein *single-crossover* Ereignis getestet. Da Streptomyzeten ein methylierungsspezifisches Restriktionssystem besitzen, wurde zur Konjugation von *S. davawensis* der methylierungsdefiziente Stamm *E. coli* GM2163 verwendet. Dieser wurde zusammen mit den Stämmen *E. coli* DH10b pESAC1333::*acc(3)IV.4* bzw. pESAC1333::*acc(3)IV.9* und *E. coli* DH5 $\alpha$  pR9406 mittels triparentaler Konjugation auf die Konjugation von *S. davawensis* vorbereitet. Die Integration der Resistenzkassette in das Genom putativ positiver *S. davawensis* Exkonjuganten durch ein *double-crossover* Ereignis wurde anschließend durch eine Standard-PCR nach Isolierung genomischer DNA verifiziert.

## 4.3 Biochemische Methoden

### 4.3.1 Mechanischer Zellaufschluss

Zur Herstellung zellulärer Rohextrakte mit einem Volumen größer 10 ml wurde das French Press Aufschlusssystem der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Hierzu wurden die Zellsedimente in einem geringen Puffervolumen mit Protease-Inhibitor-Cocktail „cOmplete, EDTA-free“ der Firma Roche resuspendiert und in drei Passagen bei hohem Druck aufgeschlossen. Sowohl für *E. coli*, *B. subtilis* und Streptomyzeten wurde ein Druck von 2000 bar und eine gleichbleibende Systemkühlung von 10°C angewendet. Um die Aktivität der Zellproteine zu erhalten, wurden die Zellsuspensionen stets auf Eis gelagert. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation 15 min bei 14.330 x g und 4°C sedimentiert und der zellfreie Rohextrakt in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Sollten die Rohextrakte für eine Affinitätsreinigung mittels ÄKTA-System verwendet werden, wurden diese nochmals 30 min bei 108.800 x g und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Zum mechanischen Aufschluss von Zellsuspensionen aus Streptomyzetenmyzel mit einem Volumen kleiner 3 ml wurde das FastPrep-24<sup>TM</sup> 5G Instrument Aufschlusssystem der Firma MP Biomedicals verwendet. Hierfür wurden die Myzelsedimente in 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 mit Protease-Inhibitor-Cocktail „cOmplete, EDTA-free“ der Firma Roche in ein oder zwei 2 ml Reaktionsgefäße mit Schraubverschluss überführt, welche jeweils 200 µl Mikroglasskugeln (SiLibead Typ S 300-400 µm) enthielten. Die Proben wurden zweimal 1 min bei 6 m/s mit jeweils 10 s Pause aufgeschlossen, was insgesamt dreimal wiederholt wurde. Zwischen den Aufschlussschritten von zweimal 1 min wurden die Proben mindestens 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden Zelltrümmer und nicht aufgeschlossenes Myzel 15 min bei 16.100 x g und 4°C sedimentiert und der zellfreie Rohextrakt in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 4.3.2 Chromatographische Trennmethode

**Tabelle 28: Puffer zur Affinitätschromatographie mittels ÄKTA-System**

Puffer	Zusammensetzung
Aufschluss-/Ladepuffer A	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 7,4
Elutionspuffer B	20 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 20 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O, 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4

Zur Reinigung von Proteinen, die mit einem Polyhexahistidin (His<sub>6</sub>)-Tag versehen waren, wurde die Metallchelate-Affinitätschromatographie (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) angewendet. Hierfür wurde ein ÄKTA-System und eine HisTrap<sup>TM</sup> HP Säule mit 5 ml Bettvolumen der Firma GE Healthcare verwendet. Die Zellsedimente wurden in Puffer A mit Protease-Inhibitor-Cocktail „cOmplete, EDTA-free“ der Firma Roche aufgeschlossen und 15 min bei 14.330 x g und 4°C und nochmals für 30 min bei 108.800 x g und 4°C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der zellfreie Rohextrakt mit einer Flussrate von 5 ml/min auf die

Säule aufgetragen. Die Säule wurde solange mit Puffer A gespült, bis das UV-Signal die Basislinie wieder erreichte.

Zur Reinigung der *S. davawensis* Elongationsfaktoren EF-Ts bzw. EF-Tu1 wurde die Säule zunächst mit 5% bzw. 10% Puffer B (25 mM bzw. 50 mM Imidazol) gewaschen und die Proteine mit 20% Puffer B (100 mM Imidazol) eluiert.

Zur Reinigung von Streptomyzeten-Dodecinen wurde die Säule mit 40% Puffer B (200 mM Imidazol) gewaschen und die Proteine mit 100% Puffer B (500 mM Imidazol) eluiert. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend mit der Methode nach Bradford bestimmt und die apparente Homogenität mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.5) überprüft.

**Tabelle 29: Puffer zur Größenausschlusschromatographie**

Puffer	Zusammensetzung
SEC-Puffer für EF-Ts	100 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5
SEC-Puffer für Dodecin	300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 7,5

Um Proteinlösungen in einen Puffer geringerer Salzkonzentration zu überführen, wurde die präparative Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) mit einem ÄKTApurifier System der Firma GE Healthcare angewendet. Hierfür wurde die Proteinlösung von EF-Ts mit einer Flussrate von 8-10 ml/min auf eine mit 100 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 equilibrierten HiTrap<sup>TM</sup> Desalting Säule (GE Healthcare) aufgetragen. Dodecin-Proteine wurden in einen Puffer mit 300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl und 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7,5 überführt. Die Proteinfractionen wurden vereint und deren Konzentration mit der Methode nach Bradford bestimmt.

Des Weiteren wurde die analytische Größenausschlusschromatographie zur Untersuchung der Dodecin-Multimere angewendet. Hierfür wurde eine Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule und ein ÄKTAmicro-System der Firma GE Healthcare verwendet. Je Dodecin-Protein wurden 0,5 mg in Dodecin-SEC-Puffer (siehe Tab. 29) mit einer Flussrate von 0,5 ml/min oder 0,75 ml/min analysiert. Als Standard wurden 100 µl einer Proteinmischung, bestehend aus β-Galactosidase (465,2 kDa), Immunglobulin G (IgG, 145 kDa), Serumalbumin (68 kDa), Ovalbumin (44,3 kDa), Myoglobulin (16,95 kDa) und Aprotinin (6,514 kDa) (je 1 mg/ml), aufgetragen. Um eine Kalibrierungsgleichung zu erstellen, wurden die Retentionszeiten ( $R_t$ ) der Standardproteine gegen den dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte (MG) aufgetragen.

**Tabelle 30: Puffer zur Analyse von Flavinen mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie**

Puffer	Zusammensetzung
Ammoniumformiat-Puffer	40 mM Ammoniumformiat, 49 mM Methansäure, pH 3,7

Zur Analyse von Flavinen in Kulturmedienüberständen und Dialyseansätzen wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*high-performance liquid chromatography*, HPLC) angewendet. Die zu analysierenden Proben wurden mit 5% (w/V) Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) gefällt, mit einem 0,2 µM Celluloseacetat-Filter filtriert und auf 15°C gekühlt. Zur Analyse wurde eine Biphenyl-Säule (Phenomenex) verwendet, die auf 50°C temperiert wurde. Je Probe wurden entweder

2  $\mu\text{l}$  oder 10  $\mu\text{l}$  injiziert und mit einer Flussrate von 0,2 ml/min analysiert. RF, Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) wurden photometrisch bei 445 nm mit dem Diodenarraydetektor (DAD) und Fluoreszenzdetektor (FLD) und RoF bei 503 nm mit dem DAD-Detektor gemessen. Das Laufprotokoll der HPLC-Methode ist Tabelle 31 zu entnehmen.

**Tabelle 31: HPLC-Methodenprotokoll**

Zeit [min]	Ammoniumformiat-Puffer [%]	Methanol [%]
0.00	85	15
3.00	77	23
3.10	73	27
5.00	70	30
6.50	68	32
13.50	68	32
20.00	5	95
20.10	0	100
24.10	0	100
24.50	100	0
30.00	85	15

#### 4.3.3 Reinigung von Proteinen zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen

Zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) wurden drei verschiedene Methoden gewählt, bei denen das Köderprotein mit einem Tag versehen wurde und interagierende Proteine coeluiert werden sollten. Hierbei wurden sowohl *in vitro*- als auch *in vivo*-PPI-Nachweismethoden angewendet. Zum Nachweis wurden die Streptomyzetenkulturen in YS- oder TSB-Medium kultiviert, 15 min bei 14.330 x g und 4°C zentrifugiert, in kaltem Aufschluss- bzw. Bindepuffer der jeweiligen Reinigungsmethode (siehe folgende Tabellen) gewaschen, nochmals zentrifugiert (15 min, 14.330 x g, 4°C) und bis zum Aufschluss bei -20°C eingefroren.

**Tabelle 32: Puffer zur Proteinreinigung mittels *pull-down***

Puffer	Zusammensetzung
<i>pull-down</i> -Puffer	500 mM NaCl, 50 mM Imidazol, 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$
<i>pull-down</i> -Elutionspuffer (Elutionspuffer B, Tab. 28)	20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ , 500 mM NaCl, 500 mM Imidazol, pH 7,4

Zum Nachweis von PPI *in vitro* mittels *pull-down* wurden in dieser Arbeit Köderproteine mit einem C-terminal fusionierten His<sub>6</sub>-Tag verwendet. Diese wurden zunächst in *E. coli* Rosetta 2(DE3) heterolog überproduziert und anschließend bis zur apparenten Homogenität mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Zur Immobilisierung von Nickel-Nitrilotriessigsäure ( $\text{Ni}^{2+}$ -NTA)-Sephrose mit dem Köderprotein wurden 300  $\mu\text{l}$  Sepharose zweimal mit 1 ml *pull-down*-Puffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail „cComplete, EDTA-free“ (PIC) (Roche) gewaschen und jeweils 2 min bei 2.240 x g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde diese mit 1 mg Köderprotein 20 min bei RT langsam rotierend inkubiert. Nicht gebundenes Köderprotein wurde durch zweimaliges Waschen mit 1 ml *pull-down*-Puffer/PIC entfernt (2.440 x g, 2 min, 4°C). Das an die  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Sephrose immobilisierte Köderprotein wurde anschließend



in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit zellfreiem Extrakt von *S. davawensis*-Zellen gegeben, die in der exponentiellen oder stationären Wachstumsphase geerntet wurden. Der Rohextrakt wurde mit dem Köderprotein vier Stunden oder über Nacht bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Das Myzel von *S. davawensis* wurde hierfür in *pull-down*-Puffer/PIC mittels French Press aufgeschlossen (siehe Kapitel 4.3.1) und einmal 15 min bei 14.330 x g und 4°C sowie nochmals 30 min bei 108.800 x g und 4°C zentrifugiert, um auch kleinste Zellfragmente und mögliche Schwebeteilchen aus dem Rohextrakt zu entfernen. Nach Inkubation wurde das Zentrifugenröhrchen mit Rohextrakt und Köderprotein-gekoppelter Sepharose 10 min auf Eis gestellt, damit der Großteil der Sepharose langsam absinkt. Anschließend wurde das Zentrifugenröhrchen 15 min bei 3.372 x g und 4°C vorsichtig zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen (Durchfluss) und die Sepharose wurde in *pull-down*-Puffer/PIC mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Sepharose wurde fünfmal mit je 1 ml *pull-down*-Puffer/PIC vorsichtig durch Invertieren gewaschen und zentrifugiert (2 min, 2.440 x g, 4°C). Zur Elution des Köderproteins sowie möglicher Protein-Interaktionspartner wurde die Sepharose mit 250 µl *pull-down*-Elutionspuffer 30 min bei RT langsam rotierend inkubiert und anschließend 3 min bei 2.440 x g und 4°C zentrifugiert. Vom Überstand (Eluat) wurden 220 µl mit einer Vivaspin 500-Säule mit 5.000 MWCO PES (Sartorius) auf 30-50 µl konzentriert (siehe Kapitel 4.3.4). Zusätzlich wurde der Sepharose 100 µl 2x Proteinprobenpuffer zugegeben, 5 min bei 95°C erhitzt und auf Eis abgekühlt. 15 µl des konzentrierten Eluats, des Rohextraktes und des Durchflusses wurden ebenfalls mit 2x Probenpuffer versetzt und ebenfalls 5 min bei 95°C erhitzt. Zur Analyse wurden diese Proben mit 30 µl des Eluat-Überstandes der mit dem Köderprotein gekoppelten Sepharose als auch von einem *pull-down*-Versuch ohne Köderprotein (Negativkontrolle) mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.5) aufgetrennt.

**Tabelle 33: Puffer zur Proteinreinigung mittels SPINE**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Puffer W (Waschpuffer)	100 mM Tris/HCl pH8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
Buffer E (d-Desthiobiotin-Elutionspuffer)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM d-Desthiobiotin
Buffer R (Regenerationspuffer)	100 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA
PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 6,5, 136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Paraformaldehyd-Lösung	4 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS

Zum Nachweis von PPI *in vivo* mittels *strep-tag-protein-interaction-experiment* (SPINE) wurden die Streptomyzetenkulturen zunächst 5 min bei 6.744 x g und RT zentrifugiert, in 45 ml Puffer W resuspendiert, auf zwei Zentrifugenröhrchen verteilt und nochmals zentrifugiert (5 min, 6.744 x g, RT). Die Myzelsedimente wurden in jeweils 42,5 ml PBS resuspendiert und in zwei mit 7,5 ml PBS bzw. 7,5 ml 4%-ige Paraformaldehyd-Lösung (pFA) vorbereitete sterile Erlenmeyerkolben überführt. Beide Kulturen wurden weitere 20 min bei 30°C und 180 rpm kultiviert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert (10 min, 6.744 x g, 4°C) und mit 30 ml Puffer W gewaschen. Bis zum Aufschluss wurden die Myzelsedimente bei -20°C gelagert. Für die weitere Vorgehensweise wurden die Reagenzien der Firma IBA nach Angaben des Herstellers

verwendet. Die Analyse der eluierten Proteine erfolgte mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.5).

**Tabelle 34: Puffer zur Proteinreinigung von Proteinen mit Hilfe der TAP-Methode**

Puffer	Zusammensetzung
IPP150-Puffer	150 mM NaCl , 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1% NP40
IPP150 Streptavidin-Elutionspuffer	IPP150-Puffer, 2 mM Biotin
IPP150 Calmodulin-Bindepuffer	10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 0,1% NP40, 2 mM CaCl <sub>2</sub>
IPP150 Calmodulin-Elutionspuffer	10 mM $\beta$ -Mercaptoethanol, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 mM Mg-Acetat, 1 mM Imidazol, 0,1% NP40, 2 mM EGTA

Zur Reinigung von Proteinkomplexen oder interagierenden Proteinen mit Hilfe der *tandem affinity purification* (TAP) wurde ein Fusionstag verwendet, das aus einem Streptavidin-Bindepeptid (SBP, DVEAWLGAR) (Lamla & Erdmann, 2004), einem Calmodulin-Bindepeptid (KRRWKKNFIAVSAANRFKKISSSGAL) (Rigaut *et al.*, 1999) und einer dazwischen liegenden *spacer*-Peptidsequenz (DYDIPTTAS) besteht (Pimentel-Schmitt, 22.01.2007). Das Myzel der Streptomyzetenkulturen wurde zunächst in IPP150-Puffer mit PIC aufgeschlossen und 15 min bei 14.330 x g und 4°C zentrifugiert. Um auch kleinste Schwebeteilchen im zellfreien Extrakt zu entfernen, wurde dieser nochmals in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (30 min, 108.800 x g, 4°C). Anschließend wurden 300  $\mu$ l mit IPP150-Puffer equilibrierte Streptavidin Sepharose High Performance (GE Healthcare) in eine Poly-Prep Chromatographie-Säule mit 2 ml Bettvolumen und 10 ml Reservoir (BioRad) überführt und mit dem Rohextrakt über Nacht bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Nicht gebundene Proteine im Rohextrakt wurden durch Gravitation von der Säule entfernt (Durchfluss 1). Die Streptavidin-Sepharose wurde mit 10 ml IPP150-Puffer gewaschen und gebundene Proteine mit viermal 250  $\mu$ l IPP150 Streptavidin-Elutionspuffer eluiert, wobei die Streptavidin-Sepharose jeweils 5-10 min mit dem Elutionspuffer auf Eis inkubiert wurde. Für den zweiten Schritt der Affinitätschromatographie wurden 300  $\mu$ l mit IPP150 Calmodulin-Bindepuffer equilibriertes Calmodulin-Affinitätsharz (Agilent Technologies) mit dem Eluat der ersten Affinitätschromatografie in einem 2 ml Reaktionsgefäß 3-4 Stunden bei 4°C langsam rotierend inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Proteine in einer Poly-Prep Chromatographie-Säule durch Gravitation entfernt (Durchfluss 2) und das Calmodulin-Affinitätsharz mit 5 ml IPP150 Calmodulin-Bindepuffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden mit viermal 250  $\mu$ l IPP150 Calmodulin-Elutionspuffer und 5-10 min Inkubationsschritten auf Eis eluiert. Die Eluatfraktionen wurden vereinigt und mit Trichloressigsäure gefällt (siehe Kapitel 4.3.4). Das an der Luft getrocknete Proteinsediment wurde in 15  $\mu$ l bidest. H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit Hilfe einer SDS-PAGE (siehe Kapitel 4.3.5) aufgetrennt und interessante Proteinbanden massenspektrometrisch analysiert. In einigen Fällen wurde das gelöste Proteinsediment auch direkt zu massenspektrometrischen Analysen eingesetzt.

#### 4.3.4 Konzentrierung und Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Größere Volumina von Proteinlösungen wurden mit Vivaspin-Säulen der Firma Sartorius eingengt. Je nach MG der Proteine wurden Vivaspin-Säulen mit 3.000, 5.000, 10.000 oder 30.000 MWCO PES verwendet. In mehreren Zentrifugations-schritten bei  $14.330 \times g$  und  $10^\circ\text{C}$  passierte die wässrige Phase der Lösungen die Membran und die jeweiligen Proteine konzentrierten sich im oberen Teil der Säule. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend mit der Methode nach Bradford bestimmt. Zur Fällung von Proteinen in Lösungen wurde Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) verwendet. Hiermit wurden gereinigte Proteine der *tandem affinity purification* (TAP) zur Analyse mittels PA-Gelen konzentriert oder Proteine in Kulturmedien-überständen oder in Dialyseansätzen zur Analyse mittels HPLC gefällt. TAP-Eluaten wurde 25% (w/V) TCA zugegeben, mit dem Vortexmischer gemischt und 5 min bei  $16.100 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Das Proteinsediment wurde zweimal mit  $200 \mu\text{l}$  bei  $-20^\circ\text{C}$  vorgekühltem Aceton gewaschen, getrocknet und in  $15 \mu\text{l}$  bidest. Wasser gelöst. Zur HPLC-Analyse wurden Kulturmedienüberstände und Dialyseansätze mit 5% (w/V) TCA versetzt, mit dem Vortexmischer gemischt und anschließend durch einen  $0,2 \mu\text{m}$  Celluloseacetat-Filter filtriert.

Die quantitative Konzentrationsbestimmung einer Proteinlösung erfolgte nach Bradford mit Hilfe des Reagenzes „Bradford Protein Assay“ der Firma BioRad (Bradford, 1976). Hierzu wurde zunächst eine Eichgerade mit Rinderserumalbumin (*bovine serum albumine*, BSA) erstellt. Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit Konzentrationen zwischen 0 und  $20 \mu\text{g/ml}$  in einem Volumen von  $800 \mu\text{l}$  angesetzt und mit  $200 \mu\text{l}$  „Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate“ gemischt. Nach 3 min Inkubation wurde die Extinktion bei 595 nm in einem Spektralphotometer gegen einen Nullwert gemessen. Die Proteinlösungen unbekannter Konzentrationen wurden ebenfalls in einem Ansatzvolumen von  $800 \mu\text{l}$  verdünnt und mit  $200 \mu\text{l}$  Bradford-Reagenz gemischt. Die Proteinkonzentrationen wurden anschließend anhand der Eichgeraden berechnet.

#### 4.3.5 Analyse von Proteinen mittels SDS-PAGE, nativer Gelelektrophorese und Western Blot

**Tabelle 35: Puffer zur SDS-PAGE**

Puffer	Zusammensetzung
Tris-Glycin-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, pH 8,3
2x Probenpuffer	126 mM Tris-HCl pH 6,8, 20 % Glycerin, 4% SDS, 0,02% Bromphenolblau, 20 mM DTT

Um Proteine nach ihrer Molekülmasse in einem elektrischen Feld zu trennen, wurde die diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis*, SDS-PAGE) angewendet. In dieser Arbeit wurden Fertiggele (Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX<sup>™</sup> Precast Gels Any kD<sup>™</sup>) der Firma BioRad verwendet. Für die SDS-PAGE wurden die Proteinproben in 2x Probenpuffer 5 min bei  $95^\circ\text{C}$  gekocht und auf Eis abgekühlt. Die Proben wurden zunächst 15 min bei 100 V im Gel konzentriert und anschließend 45 min bei 150 V in Tris-Glycin-Laufpuffer gelelektrophoretisch getrennt (Laemmli, 1970). Als Größenstandard wurden der „PageRuler Prestained Protein Ladder Plus“ von Thermo Fisher Scientific verwendet.

Anschließend wurde das Polyacrylamidgel (PA-Gel) dreimal 10 min in bidest. Wasser inkubiert und über Nacht in der Färbelösung „PageBlue“ der Firma Thermo Fisher Scientific inkubiert, die Coomassie Brilliant Blue G-250 zum Anfärben von Proteinen verwendet. Durch mehrmaliges Waschen in bidest. Wasser wurde der Hintergrund des Gels entfärbt und die im Gel blau gefärbten Proteine wurden dokumentiert.

Zur Analyse nativer Proteinstrukturen und Multiproteinkomplexen wurde die native Gelelektrophorese angewendet. Hierfür wurden Fertiggele (Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamid), Laufpuffer, Probenpuffer und der Größenstandard für native Gelelektrophorese (SERVA Native Marker Liquid Mix for BN/CN) der Firma SERVA Electrophoresis GmbH verwendet. In dieser Arbeit wurde die *Blue Native* (BN)-Gelelektrophorese angewendet. Hierbei wird dem Kathoden-Laufpuffer der Farbstoff Coomassie G-250 zugesetzt, der die Proteine negativ lädt. Im Gegensatz zu SDS ist Coomassie G-250 aber kein Detergenz, wodurch die native Proteinstruktur erhalten bleibt. Unabhängig von ihrem isoelektrischem Punkt (pI) wandern die Protein-Farbstoff-Komplexe so bei physiologischem pH zur Anode. Aufgrund der gegenseitigen Abstoßung der negativ geladenen Komplexe werden diese deutlich voneinander getrennt. Die native Gelelektrophorese wurde nach Angaben des Herstellers und zunächst 15 min bei 50 V und anschließend 90 min bei 200 V durchgeführt.

**Tabelle 36: Puffer zum Elektrotransfer von Proteinen und zum immunologischen Nachweis von *S. davawensis* Dodecin**

Puffer	Zusammensetzung
Towbin-Puffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
1x PBS ( <i>phosphate buffered saline</i> )	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
Waschpuffer	1x PBS, 0,1% Tween-20
Blocklösung	1x PBS, 0,1% Tween-20, 3% BSA

Zum Elektrotransfer von Proteinen auf eine Membran (Blotten) wurde zunächst eine diskontinuierliche SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteine des PA-Gels wurden anschließend eine Stunde bei 0,04 Ampere mit Hilfe einer Blot-Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran (0,2 µM) transferiert. Hierfür wurden auf drei Lagen in Towbin-Puffer getränktes Filterpapier (7 x 8,4 cm, BioRad) luftblasenfrei das PA-Gel, die Nitrocellulosemembran und erneut drei Lagen equilibriertes Filterpapier gestapelt (Towbin *et al.*, 1979).

Zum Nachweis des *S. davawensis* Dodecins in zellfreien Rohextrakten wurde ein polyklonaler Antikörper gegen das *S. davawensis* Dodecin durch die Firma Davids Biotechnologie GmbH (Regensburg) hergestellt. Hierfür wurde ein Kaninchen mit 0,5 mg gereinigtem *S. davawensis* Dodecin (mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag) immunisiert. Das gewonnene Antiserum wurde mittels Affinitätschromatographie von anti-His-Tag-Antikörpern gereinigt. Zur Western-Blot-Analyse wurde die Membran zunächst in 20 ml Blocklösung über Nacht schwenkend inkubiert, sechsmal 5 min in jeweils 20 ml Waschpuffer gewaschen und eine Stunde in 15 ml Blocklösung mit dem Erstantikörper „Anti-*S. davawensis* Dodecin“ (1:5.000) inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut sechsmal 5 min gewaschen und eine Stunde in 15 ml Blocklösung mit dem Zweitantikörper „Goat Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule)-Peroxidase“ (1:80.000) der Firma Sigma-Aldrich inkubiert. Nach gründlichem Waschen (sechsmal 5 min) wurde

die Membran mit 1,5 ml „SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate“ (Thermo Fisher Scientific) überschichtet und 5 min abgedunkelt inkubiert. Anschließend erfolgte die Entwicklung mit dem Lumi Imager F1<sup>TM</sup> (Mannheim Boehringer, Roche).

#### 4.3.6 Identifizierung von Proteinen mittels Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse von Proteinen, die nach Reinigung durch SPINE-, *pull-down*- oder TAP-Versuchen mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, erfolgte durch Dr. Roland Kellner (Protein Analytics, Merck Serono Research, Merck KGaA, Darmstadt). Hierfür wurden die PA-Gele entweder mit der Färbelösung „PageBlue“ der Firma Thermo Fisher nach Angaben des Herstellers gefärbt. Zur Analyse wurde die entsprechende Proteinbande aus dem Gel geschnitten, mit Ammoniumbicarbonat und Acetonitril entfärbt und anschließend über Nacht bei 37°C mit Trypsin im Gelstück verdaut. Die Sequenzen der extrahierten Peptide wurden anschließend mit einem Ultraflex MALDI (*matrix-assisted laser desorption/ionization*) TOF/TOF (*time of flight*) Massenspektrometer (Bruker, Ettlingen) analysiert. In wenigen Versuchen wurde das Eluat mit dem Proteingemisch direkt ohne vorherige Auftrennung mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE analysiert. Die Proteine wurden anschließend mit der UniProt (*universal protein database*)-Datenbank (UniProt Consortium, 2007) abgeglichen.

#### 4.3.7 Kristallisation von *S. davawensis* Dodecin

**Tabelle 37: Puffer zur Kristallisation von *S. davawensis* Dodecin**

Puffer	Zusammensetzung
Reservoir-Lösung	5% Poly- $\gamma$ -Glutamat (PGA)-LM, 22% PEG-3350, 0,1 M Na-Kakodylat, pH 6,5
Dodecin-Puffer	300 mM NaCl, 5 mM MgCl <sub>2</sub> , 20 mM Tris, pH 7,5
Kryo-Lösung	Reservoir-Lösung mit 20% Ethylenglycol

Das *S. davawensis* Dodecin wurde in Kooperation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Martin Grininger, Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Frankfurt am Main, kristallisiert. Die Kristallstruktur wurde ebenfalls dort aufgelöst.

Da zur Kristallisation eine rötlich gefärbte Proteinlösung von mit *in vivo* RoF-beladenes *S. davawensis* Dodecin verwendet wurde (siehe Kapitel 4.1.2), wurde diese zunächst nochmals über Größenausschlusschromatographie von nicht gebundenem RoF bzw. RoFMN und RoFAD gereinigt. Das Dodecin wurde in Dodecin-Puffer zu 11,13 mg/ml konzentriert.

Zur Herstellung der *S. davawensis* Dodecin-Kristalle wurde die *hanging drop*-Methode angewendet, bei der Proteinkristalle kopfüber an einer Glasplatte über einem Pufferreservoir in einer Mikrotiterplatte hängend gezüchtet werden.

In jede Vertiefung einer 24 *well*-Mikrotiterplatte wurden 500  $\mu$ l Reservoir-Lösung gegeben, die aus gefilterten Stocklösungen angesetzt wurde. Pro Mikrotiterplattenvertiefung wurden vier Tropfen, jeweils aus 1  $\mu$ l *S. davawensis* Dodecin und 1  $\mu$ l Reservoir-Lösung gemischt, auf die Glasplatte pipettiert und über die Vertiefung der Mikrotiterplatte gehängt. Die Kristallbildung erfolgte über sechs Tage bei 20°C.

Anschließend wurden rötlich gefärbte Kristalle für 1 min in Kryo-Lösung gebadet und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

#### 4.3.8 Extraktion von Metaboliten

**Tabelle 38: Puffer zur Extraktion von Metaboliten und zur massenspektrometrischen Analyse**

Puffer	Zusammensetzung
Extraktionslösung	Acetonitril/Wasser (60:40, V/V) (Lcms-Qualität)
Mobile Phase	Isopropanol/Wasser (60:40, V/V), 5 mM Ammoniumfluorid, pH 9,0

Zur Untersuchung der Metabolome des *S. davawensis* Wildtyps, der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante sowie des *S. coelicolor* Wildtyps unter Einfluss des Superoxid-generierenden Oxidants Plumbagin wurden jeweils sechs unabhängige Kulturen in 30 ml YS-Medium mit  $2 \cdot 10^6$  Sporen/ml mit und ohne  $15 \mu\text{M}$  Plumbagin beimpft und bei  $30^\circ\text{C}$  und 180 rpm abgedunkelt bis zu  $\text{OD}_{450} 1,5 \pm 0,1$  inkubiert. Innerhalb einer Minute wurden jeweils 5 ml der Kultur bei  $15.173 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellsediment sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Zeitgleich wurde von jeder Kultur durch Abnahme von 10 ml das Trockengewicht bestimmt.

Zur Extraktion der Metabolite wurden zu jedem Myzelsediment 2 ml auf  $80^\circ\text{C}$  erhitzte Extraktionslösung gegeben, mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt und 3 min bei  $80^\circ\text{C}$  inkubiert, wobei der Ansatz alle 45 s erneut mit Hilfe eines Vortexmischers gemischt wurde. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt und 2 min bei  $16.860 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der Überstand (Metabolitextrakt) wurde abgenommen und auf Eis aufbewahrt. Die Extraktion wurde nochmals wiederholt und die Metabolitextrakte vereint. Die Extrakte wurden quantitativ in braune 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und die gesamte Flüssigkeit mit Hilfe eines Evaporators bei  $30^\circ\text{C}$  abgedampft. Anschließend wurden die Proben bis zur Analyse bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Die Analyse der Metabolite erfolgte an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (ETHZ). Hierfür wurden die evaporierten Extrakte in bidest. Wasser zu  $200 \mu\text{l}/1 \text{ g}$  Trockengewicht gelöst und jeweils  $120 \mu\text{l}$  in eine 96-well Mikrotiterplatte überführt und, wie bereits beschrieben, in technischen Duplikaten durch *flow-injection time-of-flight* Massenspektrometrie mit einem Agilent 6550 Q-TOF Instrument analysiert (Pedrolli *et al.*, 2015b; Fuhrer *et al.*, 2011).

Die massenspektrometrische Analyse wurde mit Hilfe eines Aufbaus durchgeführt, der aus einer Hitachi L-7100 Flüssigchromatographiepumpe gekoppelt an einen Gerstel MPS2 Autosampler und einem Agilent 6550 Ionentrichter Q-TOF (Agilent, Santa Clara, CA) bestand. Die Einstellungen für die negative Ionisierung unter Anwendung einer automatischen isokratischen Fließinjektion ohne vorherige chromatographische Auftrennung wurden, wie bereits veröffentlicht, verwendet (Fuhrer *et al.*, 2011). Die Flussrate der mobilen Phase betrug  $150 \mu\text{l}/\text{min}$ . Der mobilen Phase wurde Isopropanol, Taurocholsäure und Hexakis-(1*H*,1*H*,3*H*-perfluoropropoxy)-phosphazin (Agilent Technologies) zugegeben. Der Profilmodus der Massenspektren wurde von 50 bis  $1000 \text{ m/z}$  und mit einer Frequenz von 1,4 Spektren/s für 0,48 min aufgenommen, wofür die höchste Auflösungskraft (4 GHz HiRes) verwendet wurde. Die Temperatur der Quelle betrug  $325^\circ\text{C}$ , die Flussrate des Trocknungsgases  $5 \text{ l}/\text{min}$  und der

Zerstäubendruck 30 psig. Die Verarbeitung der Spektren, wie z. B. Angleichung, *Peak*-Detektion, Schwerpunktermittlung (*centroiding*), Überlagerung von Daten (*merging*), wurden, wie bereits beschrieben, durchgeführt (Fuhrer *et al.*, 2011). Zur anschließenden Datenverarbeitung und -analyse wurde die Software Matlab R2014a (The Mathworks, Natick) verwendet. Die Annotation der Ionen erfolgte mit einer Abweichung von 0,001 Da ihrer theoretischen Masse.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Dodecin

Das Flavinbindeprotein Dodecin ist ein in Bodenbakterien, pathogenen Bakterien und Archaeen häufig vorkommendes Protein. Die Funktion der Dodecine ist bisher jedoch nicht komplett verstanden. Es wird vermutet, dass archaeale und bakterielle Dodecine möglicherweise unterschiedliche Funktionen übernehmen. Vergleichende Sequenzanalysen mittels *NCBI Protein BLAST* ergaben, dass Dodecin in allen bisher sequenzierten Streptomyzeten vorhanden ist. Die Aminosäuresequenzen der Dodecine von 28 betrachteten Stämmen sind hierfür zu mindestens 71% identisch (nicht gezeigt). Die Dodecine der Streptomyzeten wurden bisher noch nicht untersucht.

*S. davawensis* und *S. cinnabarinus* sind die einzigen bekannten Organismen, die das toxische Riboflavin (RF)-Analogon Roseoflavin (RoF) produzieren (Jankowitsch *et al.*, 2012). Obwohl *S. davawensis* einen RoF-resistenten FMN-RNA-Schalter besitzt, sind dessen Flavoenzyme dennoch potentielle Zielmoleküle der toxischen Cofaktoranaloga Roseoflavinmononukleotid (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) (Pedrolli *et al.*, 2012; Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Aufgrund der unspezifischen flavinbindenden Eigenschaften der Dodecine wurde deshalb vermutet, dass Dodecin in *S. davawensis* möglicherweise an der RoF-Biosynthese oder der RoF-Resistenz beteiligt sein könnte.

Um dies zu überprüfen, wurde im Folgenden zunächst die Funktion von *S. davawensis* Dodecin *in vivo* anhand des *S. davawensis* Wildtyps vergleichend zu einer in dieser Arbeit generierten *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten als auch zum RoF-sensitiven *S. coelicolor* Wildtyp untersucht. Die wichtigsten Aspekte waren hierbei die flavinbindenden Eigenschaften, die RoF-Sensitivität, die RoF-Biosynthese sowie das Wachstum unter oxidativem Stress. Darüber hinaus wurden die Dodecine (Wildtyp und Mutanten) von *S. davawensis* und *S. coelicolor* in *E. coli* heterolog überproduziert, gereinigt und biochemisch charakterisiert.

#### 5.1.1 *In vivo*-Untersuchungen zur Funktion von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin

##### 5.1.1.1 Phylogenetische Einordnung von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin

Die monomeren Proteine der putativen *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecine sind 73 und 71 Aminosäuren lang und werden von den Genen *BN159\_1333* und *SCO0915* kodiert. Die Aminosäuresequenzen beider Streptomyzeten-Dodecine wurden mit bereits annotierten und vorhergesagten Dodecinen ausgewählter Bakterien und Archaeen mit Hilfe des Alignment-Programms Clustal Omega (EMBL-EBI) miteinander verglichen (Abb. 11). Hierbei zeigte sich, dass sich die Dodecine der Actinobakterien den Dodecinen von *S. davawensis* und *S. coelicolor* am ähnlichsten sind. Das *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin sind zu ca. 72% identisch. Das Dodecin des archaealen Bakteriums *Halobacterium salinarum* weist mit ca. 29% die geringste Sequenzidentität auf.

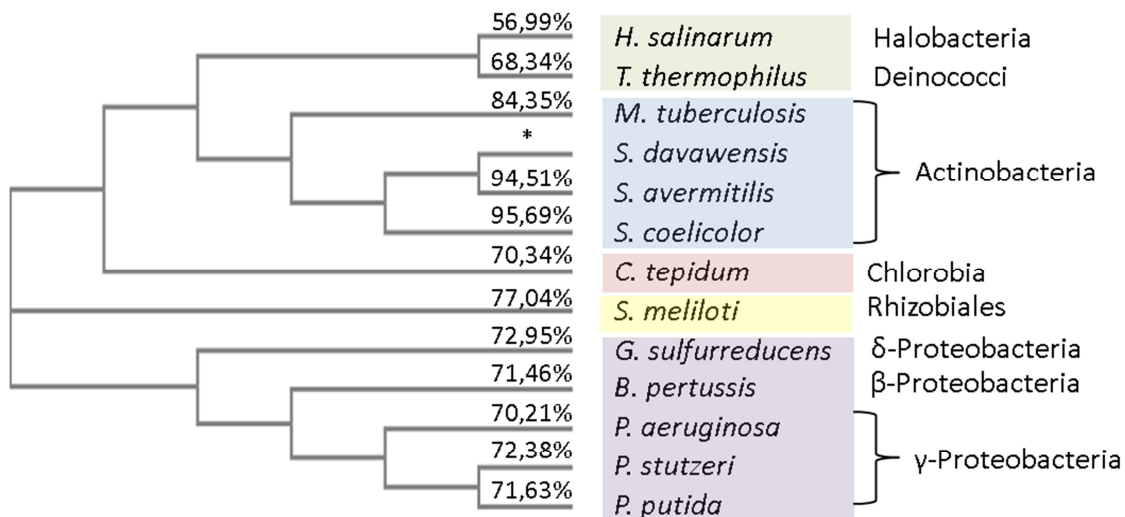


<i>Sdav</i>	--MSNHTYRVTDIVGTSPEGVDQAIRNGINRASQTLHNLDWFEVVEVRGQIN-DGQIAHW
<i>Scoe</i>	--MSNHTYRVTEVVGTS PDGVDQAVRNAVTRASQTLRKLDWFEVTVRGQIE-DGQVAHW
<i>Save</i>	--MSDHTYRVTEIVGTS TEGIDQAIRNGIARAAQTLRNLDWFEVTVTRGQIV-NGQIEYY
<i>Mtub</i>	--MSNHTYRVIEIVGTS PDGVDAAIQGGLARAAQTMRALDWFVQVSRGHLV-DGAVAHF
<i>Smel</i>	--MSEHVYKKIELIGSSPNSIDEAIEGAISRASKTTRNLDWFEVDQIRGQIV-NGKVAHY
<i>Pstu</i>	--MSDHHTYKKIEIVGSSRNSVDEAIQNGIAEASSKLNVEWFEVGEIRGHVE-NGKVGHF
<i>Bper</i>	--MSSHVYKQIELVGS SAVSSDDAIAQA IARASDTLRHLDWFEVTE TRGHK-DGKVAHW
<i>Tthe</i>	---MGKVYKKVELVGTSEEGLAAIQAALARARKTLRHLDWFEVKEIRGTIG-EAGVKEY
<i>Ctep</i>	--MSAHIYKKLEIVGSSATSIEEAVNNAVAKAAETIRNIRWVELVETRCHVE-NQKIAYW
<i>Pput</i>	-MTDHHTYKKIELVGS SPTSIEEA INNALAEAGKS IKHLEWFEVVD TRGHIR-DNKAAHF
<i>Paer</i>	-MSNHHTYKKIELVGS SKTSIEDA INNALAEAAKS IQHLEWFEVVD TRGHIE-NGAVGHY
<i>Gsul</i>	MYGKDRYKKVEIIGVSGVSIEGA IETALVRARNSLDKLSWFEVQEVRGHIGADGKVAEY
<i>Hsal</i>	-----MVFKKVLITGTS EESFTAADDAIDRAEDTLDNVWAEVVDQGV EIG-AVEERTY
	: : * * . * . : * .. : * * : . : :
<i>Sdav</i>	QVTMKVGFRLDETGLE
<i>Scoe</i>	QVGLKLGFRLEESD—
<i>Save</i>	QVGLKVGFRLLDGD—
<i>Mtub</i>	QVTMKVGFRLLEDSD---
<i>Smel</i>	QVVMKVGFRIIDSD---
<i>Pstu</i>	QVTMKVGFRLLEDSD---
<i>Bper</i>	QVSLKIGMRLEADD—
<i>Tthe</i>	QVVLEVGFRLLEDSD---
<i>Ctep</i>	QVTCKIGFTLDEN---
<i>Pput</i>	QVTLKVGFRLEANS---
<i>Paer</i>	QVTLKVGFRLEANS---
<i>Gsul</i>	QVVLKVSFELKDS---
<i>Hsal</i>	QTEVQVAFELDGSQ--
	* . : : : :

**Abbildung 11: Vergleich der Primärstrukturen der Dodecine aus *S. davawensis* (*Sdav*) und *S. coelicolor* (*Scoe*) mit denen anderer Bodenbakterien, pathogener Bakterien und Archaeen. *Streptomyces avermitilis* (*Save*), *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtub*), *Sinorhizobium meliloti* (*Smel*), *Pseudomonas stutzeri* (*Pstu*), *Bortodella pertussis* (*Bper*), *Thermus thermophilus* (*Tthe*), *Chlorobium tepidum* (*Ctep*), *Pseudomonas putida* (*Pput*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Paer*), *Geobacter sulfurreducens* (*Gsul*) und *Halobacterium salinarum* (*Hsal*). Die Sequenzen wurden in der Reihenfolge der Sequenzidentität zum *S. davawensis* Dodecin angeordnet, wobei die ähnlichsten Dodecine dem *S. davawensis* Dodecin am nächsten stehen. Sterne stehen für stark konservierte Aminosäuren, ein Punkt für Aminosäuren mit sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften und ein Doppelpunkt für Aminosäuren mit nur schwach ähnlichen Eigenschaften.**

Werden die Organismen anhand ihrer 16S rRNA-Gensequenz phylogenetisch eingeordnet, so zeigt sich eine klare Strukturierung zwischen Actinobakterien (*S. davawensis*, *S. coelicolor*, *Streptomyces avermitilis*, *Mycobacterium tuberculosis*), pathogenen und nicht pathogenen Proteobakterien (*Geobacter sulfurreducens*, *Bortodella pertussis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*) sowie extremophilen und archaealen Bakterien (*Thermus thermophilus*, *H. salinarum*). Das phototrophe *Chlorobium tepidum* und das rhizobiale *Sinorhizobium meliloti* bilden weitestgehend jeweils eine eigene Gruppe (Abb. 12). Anhand des Verwandtschaftsgrades ist zu erkennen, dass sich die Streptomyzeten in der Gruppe der Actinobakterien am ähnlichsten sind. *M. tuberculosis* ist zu ca. 84% mit *S. davawensis* verwandt. Die Dodecine von *S. davawensis* und *S. coelicolor* könnten demnach ähnliche Eigenschaften wie das *M. tuberculosis* Dodecin haben. *T. thermophilus* und *H. salinarum* sind dem *S. davawensis* am unähnlichsten. Aufgrund dessen und ähnlich extremer Wachstumsbedingungen von *H. salinarum* und *T. thermophilus* könnte deshalb angenommen werden, dass Dodecin in beiden Organismen ähnliche Funktionen haben könnte. *H. salinarum* stellt aber als Archaeon eine eigene Lebensdomäne dar und

Untersuchungen haben ergeben, dass das *H. salinarum* Dodecin andere flavinbindene Eigenschaften als bakterielle Dodecine besitzt (Grininger *et al.*, 2009; Staudt *et al.*, 2012). Aufgrund des mehr oder minder nahen Verwandtschaftsgrades des bakteriellen *T. thermophilus* und des archaealen *H. salinarum* ist jedoch nicht auszuschließen, dass in beiden Prokaryoten vorkommende homologe Proteine gleiche Funktionen übernehmen können. Diese Hypothese führe zur Annahme, dass auch die Dodecine aus *S. davawensis* und *S. coelicolor* trotz sehr geringer Sequenzidentität zum *H. salinarum* Dodecin ähnliche oder gleiche Funktionen wie in Archaeen haben könnten.



**Abbildung 12: Phylogenetische Einordnung von *S. davawensis* und *S. coelicolor* anhand der 16S rRNA-Gensequenz.** Die Organismen sind gemäß ihres Verwandtschaftsgrades in fünf Gruppen unterteilt worden. Der Verwandtschaftsgrad zu *S. davawensis* (\*) ist in Prozent angegeben. Als Referenz des 16S rRNA-Gens von *S. davawensis* diente die Sequenz mit GenBank-Nummer DQ202392.1 (Grill *et al.*, 2007). Der Sequenzvergleich und der Stammbaum wurden mittels Clustal Omega (EMBL-EBI) erstellt. Die jeweiligen Klasseneinteilungen der Organismen sind angegeben.

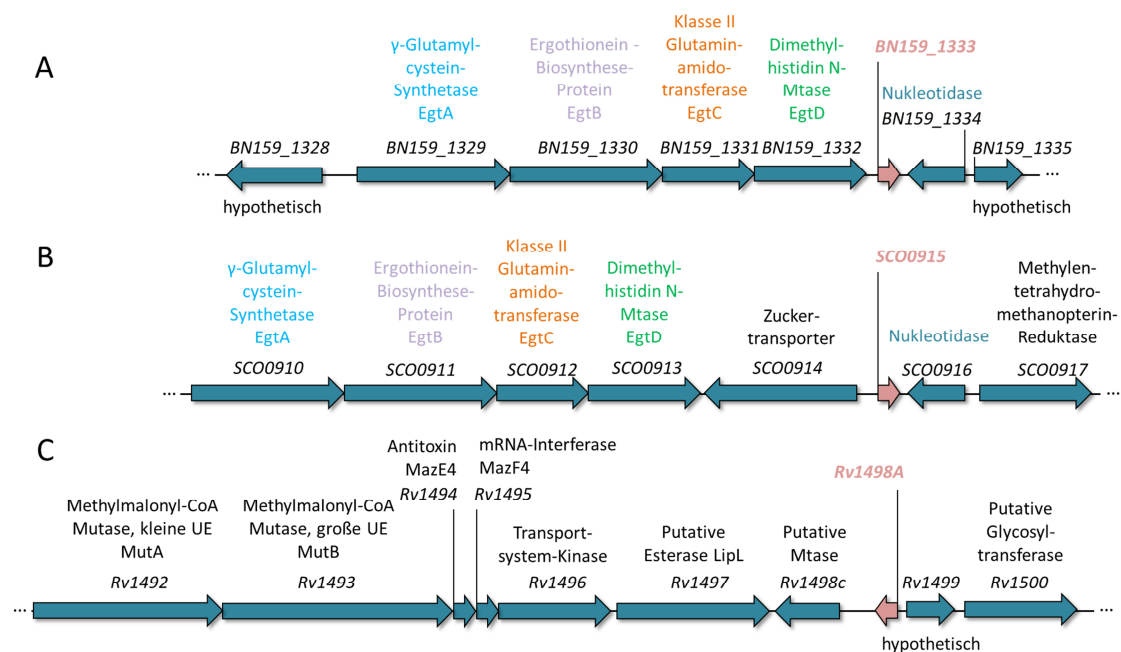
### 5.1.1.2 Betrachtung der Genomumgebung des Dodecin-Gens in Actinobakterien

Zur Betrachtung der Genomumgebung der Actinobakterien *S. davawensis*, *S. coelicolor* und *M. tuberculosis* wurden die Gene stromaufwärts und stromabwärts der Dodecin-Gene mit Hilfe von Sequenzvergleichen mit *NCBI Protein BLAST* annotiert.

Die Genomumgebungen von *S. davawensis* und *S. coelicolor* weisen im Vergleich zu der des pathogenen *M. tuberculosis* deutliche Unterschiede auf (Abb. 13). Die Gene *SCO0929-SCO0913* kodieren hierbei in *S. coelicolor* Enzyme der Ergothioneinbiosynthese (Nakajima *et al.*, 2015). Das stromabwärts gelegene Gen *SCO0916* kodiert eine Nukleotidase. Aufgrund von Aminosäuresequenzidentitäten von mindestens 79% ist anzunehmen, dass die entsprechenden Gene *BN159\_1329-1332* und *BN159\_1334* in *S. davawensis* ebenfalls Proteine der Ergothioneinbiosynthese und einer Nukleotidase kodieren. Die Lokalisation des Ergothionein (*egt*)-Operons und der Nukleotidase zu den Dodecin-Genen *BN159\_1333* bzw. *SCO0915* im Genom der Streptomyzeten scheint somit konserviert zu sein. Eine Ausnahme ist jedoch ein in *S. coelicolor* dem Dodecin-Gen stromaufwärts liegendes Gen (*SCO0914*), welches für einen Zuckertransportprotein kodiert und an dieser Stelle im Genom von *S. davawensis* nicht vorhanden ist.

Das Dodecin-Gen *Rv1498A* von *M. tuberculosis* ist im Vergleich zu denen der Streptomyzeten revers im Genom angeordnet. Stromaufwärts befindet sich zwar ebenfalls ein Gen, welches für eine putative Methyltransferase (*Rv1498c*) wie in *S. davawensis* und *S. coelicolor* kodiert, jedoch befinden sich stromaufwärts weiterhin nur Gene, die für Proteine des Lipidmetabolismus (*Rv1492*, *Rv1493*), der Virulenz, Entgiftung und Adaption (*Rv1494*, *Rv1405*) sowie für den intermediären Metabolismus und die Atmung (*Rv1496*, *Rv1497*) zuständig sind. Stromabwärts von *Rv1498A* befinden sich Gene, die nicht annotiert, aber konserviert sind (*Rv1499*) und im intermediären Metabolismus und in der Atmung (*Rv1500*) involviert zu sein scheinen. Die zum *S. davawensis* und *S. coelicolor* *egt*-Operon korrespondierenden Gene *Rv3704c-3700c* sind dagegen nicht in der näheren Umgebung des Dodecin-Gens, sondern an einer anderen Stelle im *M. tuberculosis* Genom lokalisiert (Saini *et al.*, 2016).

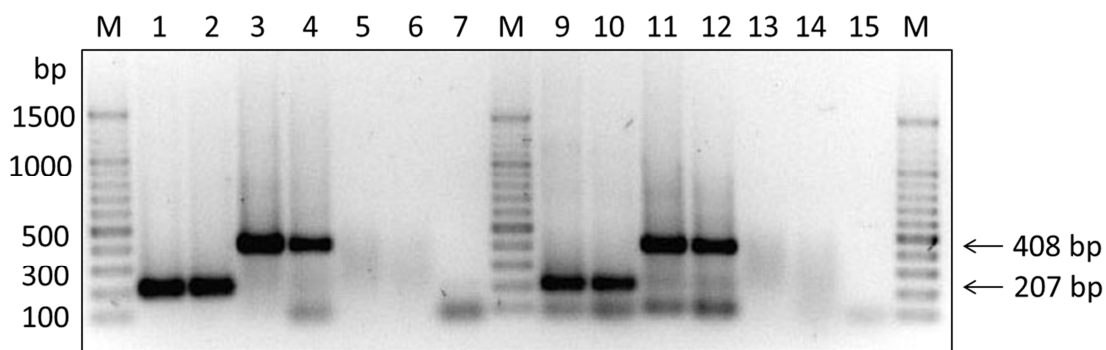
Anhand der Genomumgebung des Dodecin-Gens in *S. davawensis*, *S. coelicolor* und *M. tuberculosis* wird vermutet, dass Dodecin in den Actinobakterien trotz hoher Proteinsequenzidentitäten von über 67% und trotz hohen phylogenetischen Verwandtschaftsgrades der Stämme möglicherweise eine spezielle Funktion haben könnte.



**Abbildung 13: Genomumgebung der Dodecin-Gene in (A) *S. davawensis* (BN159\_1333), (B) *S. coelicolor* (SCO0915) und (C) *M. tuberculosis* (Rv1498A).** Soweit annotiert oder vorhergesagt sind die Gen-kodierten Proteine den jeweiligen Genen zugeordnet. Sequenzähnliche Proteine sind in der gleichen Farbe markiert. Mtase: Methyltransferase.

### 5.1.1.3 Das Dodecin-Gen aus *S. davawensis* und *S. coelicolor* wird in der exponentiellen und stationären Wachstumsphase exprimiert

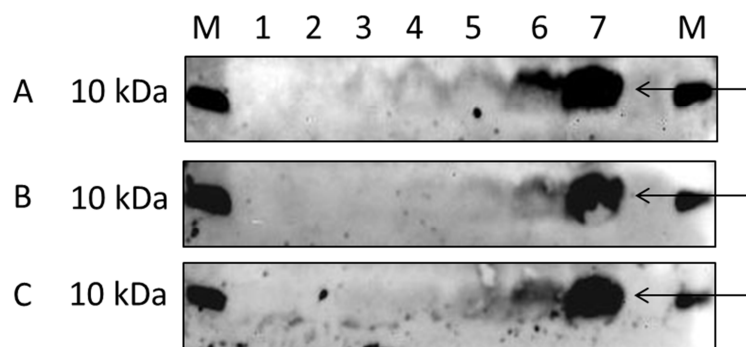
Um zu untersuchen, ob überhaupt und in welcher Wachstumsphase das Dodecin-Gen in *S. davawensis* und *S. coelicolor* exprimiert wird, wurde zunächst die Transkription der Gene mittels Reverser Transkriptase (RT)-PCR nachgewiesen. Hierfür wurden Kulturen der Streptomyzetenstämme aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Gesamt-RNA verwendet. Als Kontrolle wurde jeweils das konstitutiv exprimierte Gen der Citrat-Synthase *gltA* verwendet. Die amplifizierten cDNAs der RT-PCR wurden mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese analysiert (Abb. 14). Sowohl in *S. davawensis* als auch in *S. coelicolor* konnte ein spezifisches 207 bp langes RT-PCR-Produkt des jeweiligen Dodecin-Gens sowohl in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase nachgewiesen werden. Das 408 bp lange Transkript der Citrat-Synthase konnte ebenfalls in beiden Stämmen und in beiden Wachstumsphasen nachgewiesen werden.



**Abbildung 14: Analyse der Expression der Dodecin-Gene aus *S. davawensis* und *S. coelicolor* mittels RT-PCR.** Die für die Dodecin-Gene und für das konstitutive Gen *gltA* (Kontrolle) spezifischen cDNA-Fragmente wurden mittels Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Als RNA-Matrize für die RT-PCR diente jeweils Gesamt-RNA aus *S. davawensis* bzw. *S. coelicolor*. Zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente wurden spezifische Oligonukleotide der jeweiligen Gene verwendet. (1) cDNA des Gens *BN159\_1333*, welches mittels Gesamt-RNA aus *S. davawensis*-Zellen einer exponentiellen Flüssigkultur amplifiziert wurde. (2) Wie (1) nur mittels Gesamt-RNA aus *S. davawensis*-Zellen einer stationären Flüssigkultur. (3) cDNA des Gens *gltA* aus *S. davawensis*-Zellen einer exponentiellen Flüssigkultur und (4) einer stationären Flüssigkultur. (5, 6) Negativkontrolle, RT-PCR ohne reverse Transkriptase mit *BN159\_1333* spezifischen Oligonukleotiden (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (7) Negativkontrolle, RT-PCR ohne RNA-Matrize mit *BN159\_1333* spezifischen Oligonukleotiden, (9) cDNA des Gens *SCO0915*, welches mittels Gesamt-RNA aus *S. coelicolor*-Zellen einer exponentiellen und (10) stationären Flüssigkultur amplifiziert wurde, (11, 12) cDNA des Gens *gltA* aus *S. coelicolor* (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (13, 14) Negativkontrolle, siehe (5, 6) mit *SCO0915* spezifischen Oligonukleotiden (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (15) Negativkontrolle, siehe (7) mit *SCO0915* spezifischen Oligonukleotiden (exponentielle und stationäre Wachstumsphase). M: 100 bp DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific).

Der Expressionsnachweis des Genprodukts von Dodecin mittels Western-Blot-Analysen erfolgte nur in *S. davawensis*. Zu diesem Zweck wurden in drei unabhängigen Versuchen *S. davawensis*-Kulturen vierzehn Tage lang in YS-Medium kultiviert. Es wurden jeweils Proben aus der exponentiellen Wachstumsphase (nach einem Tag), der früh stationären (nach zwei bis drei Tagen), der stationären (vier bis sieben Tage) und

spät stationären (zehn bis vierzehn Tage) Wachstumsphase entnommen. Das Myzel der Proben wurde aufgeschlossen, um das Gesamtprotein zu gewinnen. Nach Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford wurden die Proteine in einem denaturierenden Polyacrylamid (PA)-Gel aufgetrennt auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Nachweis des etwa 9 kDa großen *S. davawensis* Dodecin-Monomers erfolgte mit „Anti-*S. davawensis* Dodecin“ und ist in Abbildung 15 dargestellt. Es zeigte sich, dass Dodecin erst in der stationären bis spät stationären Wachstumsphase nach vier bis sieben Tagen in *S. davawensis* nachweisbar ist. Nach vierzehn Tagen Kultivierung ist Dodecin deutlich nachzuweisen. Es ist somit zu vermuten, dass es sich hierbei um eine wachstumsphasenabhängige Expression des Dodecin-Gens handeln könnte.

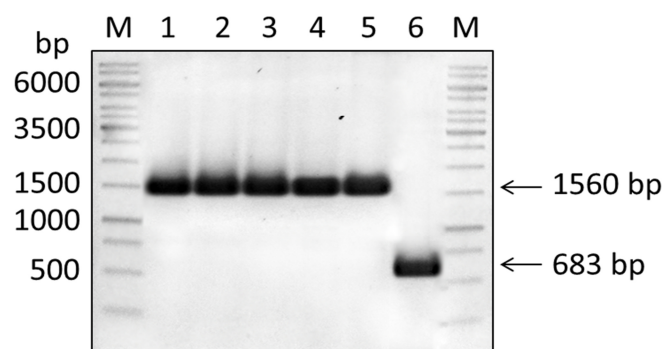


**Abbildung 15: Immunologischer Nachweis des Dodecins aus *S. davawensis* (Western Blot-Analyse).** In drei unabhängigen Versuchen (A, B und C) wurden den Kulturen nach (1) ein, (2) zwei, (3) drei, (4) vier, (5) sieben, (6) zehn und (7) vierzehn Tagen Myzel entnommen. Es wurden jeweils 27 µg zellfreier Rohextrakt mit Hilfe eines PA-Gels gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Zum Nachweis des Dodecins (Pfeil) wurde der Antikörper „Anti-*S. davawensis* Dodecin“ sowie „Goat Anti-Rabbit IgG (Whole Molecule)-Peroxidase“ verwendet. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

#### 5.1.1.4 Konstruktion einer *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante

Zur weiteren Untersuchung der Funktion des Dodecins wurde eine *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante erstellt. Grininger *et al.* zeigten bereits, dass eine Dodecin-Gendeletion für das archaeale *H. salinarum* nicht letal ist (Grininger *et al.*, 2009). Für *S. davawensis* wurden deshalb zwei pESAC13-Plasmide mit verschiedenen subgenomischen Fragmenten aus *S. davawensis* verwendet, die nachweislich das Dodecin-Gen enthielten (pESAC13.4 und pESAC13.9). In beiden Plasmiden wurde das Dodecin-Gen *BN159\_1333* durch eine Apramycin-Resistenzkassette mit dem PCR-targeting System zunächst in *Escherichia coli* (*E. coli*) ausgetauscht (Gust *et al.*, 2003). Nachdem die Plasmide mit disruptiertem Dodecin-Gen mittels Konjugation über *E. coli* in *S. davawensis* übertragen wurden, wurden *S. davawensis* Klone mit positivem Rekombinationsereignis der Apramycin-Resistenzkassette durch das Antibiotikum Apramycin selektiert. Mehrere Apramycin-resistente *S. davawensis* Klone wurden auf die Disruption des Dodecin-Gens getestet. Hierzu wurden zunächst die Klone in TSB-Medium mit Apramycin kultiviert und aus deren Myzel genomische DNA isoliert. Mit Hilfe sequenzspezifischer Oligonukleotide, die 242 bp stromaufwärts und 225 bp stromabwärts des Dodecin-Gens im Genom binden, wurde die Disruption des Gens

durch Austausch mit der Apramycin-Resistenzkassette verifiziert. Insgesamt wurden fünf Klone vergleichend zu *S. davawensis* Wildtyp auf Disruption des Dodecin-Gens mittels PCR analysiert. Bei Disruption von *BN159\_1333* sollte das PCR-Produkt mit Apramycin-Resistenzkassette 1560 bp lang sein, während es bei einem intakten Genom (Wildtyp) mit nicht disruptiertem *BN159\_1333* 683 bp lang wäre. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und sind in Abbildung 16 dargestellt. Jeder der getesteten *S. davawensis* Klone war auf Disruption des Dodecin-Gens *BN159\_1333* positiv. Da die Klone anhand unterschiedlicher subgenomischer DNA-Sequenzen erstellt wurden und deren Sequenzen nicht bekannt waren, wurden für die folgenden Versuche sicherheitshalber jeweils ein Klon, hergeleitet von den Plasmiden pESAC13.4 und pESAC13.9, weiter untersucht. Im Folgenden wurden die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten als *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  bzw.  $\Delta 1333.9$  bezeichnet.

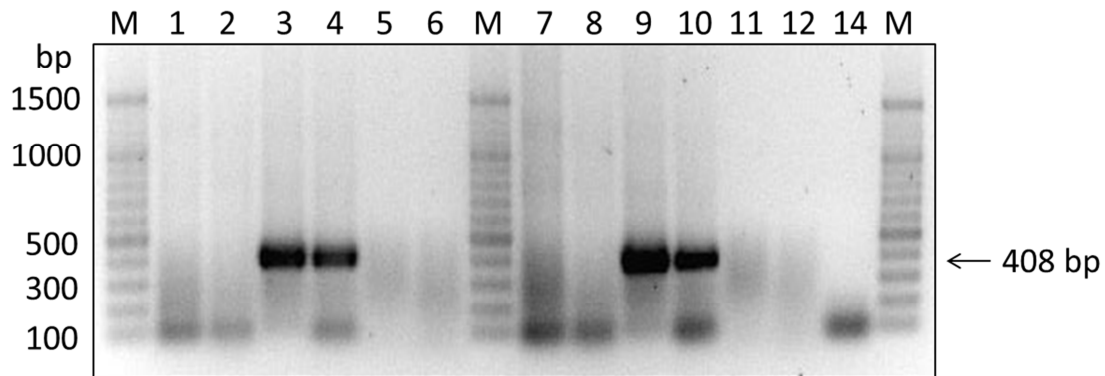


**Abbildung 16: Verifizierung der Dodecin-Disruption durch eine Apramycin-Resistenzkassette im Genom von *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten mittels PCR.** (1, 2, 3) *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten anhand von pESAC13.4, (4, 5) *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten anhand von pESAC13.9, (6) *S. davawensis* Wildtyp. M: 1 kbp DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific).

Zusätzlich wurden die ausgewählten Klone *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  auf deren Dodecin-Gen-Disruption mittels RT-PCR untersucht. Hierzu wurden erneut Kulturen der Streptomyzetenstämme aus der exponentiellen und stationären Wachstumsphase als Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Gesamt-RNA verwendet. Als Kontrollgen diente, wie bereits in Kapitel 5.1.1.3 beschrieben, das konstitutiv transkribierte Gen der Citrat-Synthase *gltA*. Abbildung 17 zeigt die gelelektrophoretische Analyse der cDNA-Fragmente der RT-PCR. Für beide *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  konnte sowohl in exponentieller als auch in stationärer Wachstumsphase die Abwesenheit des Dodecin-Transkripts gezeigt werden, während das Transkript des Kontrollgens *gltA* in beiden Wachstumsphasen und für beide Klone nachgewiesen werden konnte.

Die Dodecin-Gen-Disruption von *BN159\_1333* durch die Apramycin-Resistenzkassette der Klone *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  konnte somit anhand isolierter genomischer DNA als auch Gesamt-RNA verifiziert werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Disruption des Dodecin-Gens für das Bodenbakterium *S. davawensis* unter Laborbedingungen nicht letal ist.

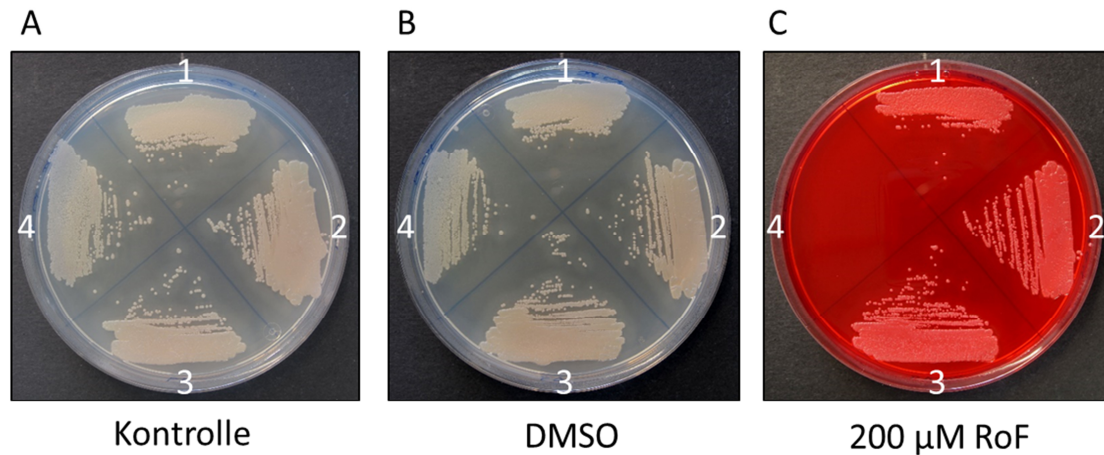




**Abbildung 17: Verifizierung der Dodecin-Gen-Disruption in den *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten ( $\Delta 1333$ ) 4 und 9 mittels RT-PCR.** Die für das Dodecin-Gen und für das konstitutive Gen *gltA* (Kontrolle) spezifischen cDNA-Fragmente wurden mittels Agarose-gelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung nachgewiesen. Als RNA-Matrize für die RT-PCR diente Gesamt-RNA aus Zellen von *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  exponentiell und stationär gewachsener Flüssigkulturen. Zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente wurden spezifische Oligonukleotide der jeweiligen Gene verwendet. (1, 2) Produkt der RT-PCR mit Gesamt-RNA aus *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (3, 4) cDNA des Gens *gltA* aus *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (5, 6) Negativkontrolle *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$ , RT-PCR ohne reverse Transkriptase mit *BN159\_1333* spezifischen Oligonukleotiden (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (7, 8) Produkt der RT-PCR mit Gesamt-RNA aus *S. davawensis*  $\Delta 1333.9$  (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (9, 10) cDNA des Gens *gltA* aus *S. davawensis*  $\Delta 1333.9$  (exponentielle und stationäre Wachstumsphase), (11, 12) Negativkontrolle *S. davawensis*  $\Delta 1333.9$ , siehe (5, 6), (14) Negativkontrolle, RT-PCR ohne RNA-Matrize mit *BN159\_1333* spezifischen Oligonukleotiden. M: 100bp DNA-Marker (Thermo Fisher Scientific).

#### 5.1.1.5 Dodecin ist nicht an der Roseoflavinresistenz von *S. davawensis* beteiligt

Aufgrund der flavinbindenden Eigenschaften von Dodecin wurde zunächst vermutet, dass Dodecin als mögliches Bindeprotein von RoF, Roseoflavinmononukleotid (RoFMN) oder Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) im RoF-Resistenzmechanismus eine Rolle spielen könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Sporen des *S. davawensis* Wildtyps, der Dodecin-Disruptionsmutanten *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  als auch des RoF-sensitiven *S. coelicolor* Wildtyps auf YS-Nährböden ohne als auch mit 200  $\mu\text{M}$  RoF ausgestrichen. Da RoF in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst war, wurde als eine weitere Kontrolle ein YS-Nährboden mit gleichem Volumen an DMSO versetzt, wie es für den RoF-YS-Nährboden getan wurde. Hierdurch sollten wachstumsinhibierende Effekte durch DMSO ausgeschlossen werden. Die Stämme wurden zwei Tage lang bei 30°C unter Lichtausschluss kultiviert. Neben dem *S. davawensis* Wildtyp wuchsen auch die Isolate der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  in Anwesenheit von 200  $\mu\text{M}$  RoF, während der *S. coelicolor* Wildtyp nicht wuchs (Abb. 18). Auf den YS-Nährböden mit und ohne DMSO wuchsen alle vier Stämme gleich gut. Ein wachstumsinhibierender Effekt durch DMSO konnte somit ausgeschlossen werden. Daraus ist zu schließen, dass Dodecin im RoF-Resistenzmechanismus von *S. davawensis* nicht als mögliches Bindeprotein von intrazellulärem und potentiell antibiotisch wirkendem RoF oder dessen Derivate RoFMN bzw. RoFAD beteiligt ist.



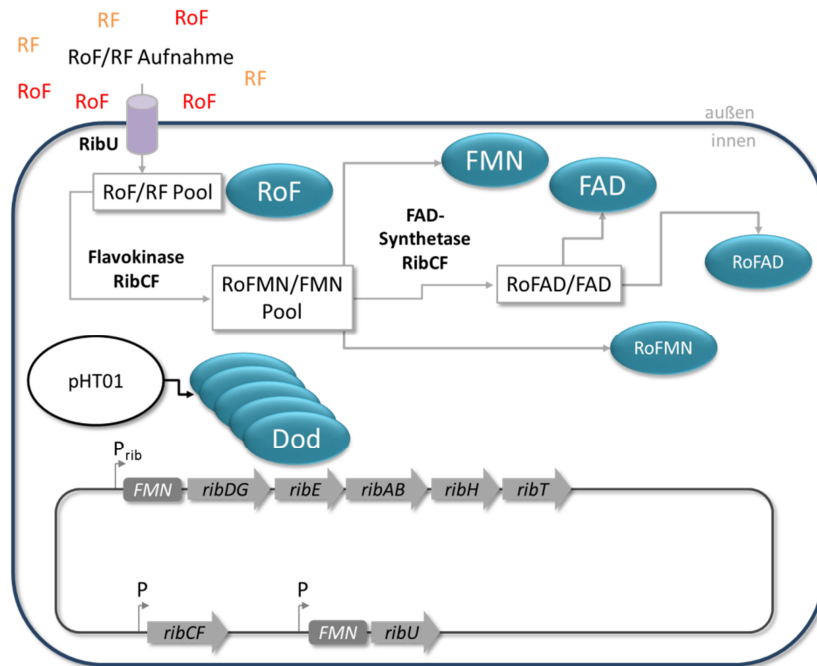
**Abbildung 18: Das Dodecin aus *S. davawensis* ist nicht für die Roseoflavinresistenz verantwortlich.** (1) *S. davawensis* (Wildtyp), (2) *S. davawensis*  $\Delta I333.4$ , (3) *S. davawensis*  $\Delta I333.9$  sowie (4) *S. coelicolor* wurden auf YS-Agar (A) ohne Zusatz, (B) mit 150  $\mu\text{M}$  DMSO und (C) mit 200  $\mu\text{M}$  RoF 48 Stunden lang bei 30°C unter oxischen Bedingungen kultiviert. Es wurden jeweils ca. 50.000 Sporen ausgestrichen. *S. coelicolor* ist Roseoflavin-sensitiv und wurde als Kontrolle für die Wirksamkeit von Roseoflavin analysiert.

#### 5.1.1.6 Die heterologe Expression des Dodecin-Gens aus *S. davawensis* führt nicht zu einer Roseoflavinresistenz eines rekombinanten *B. subtilis*-Stammes

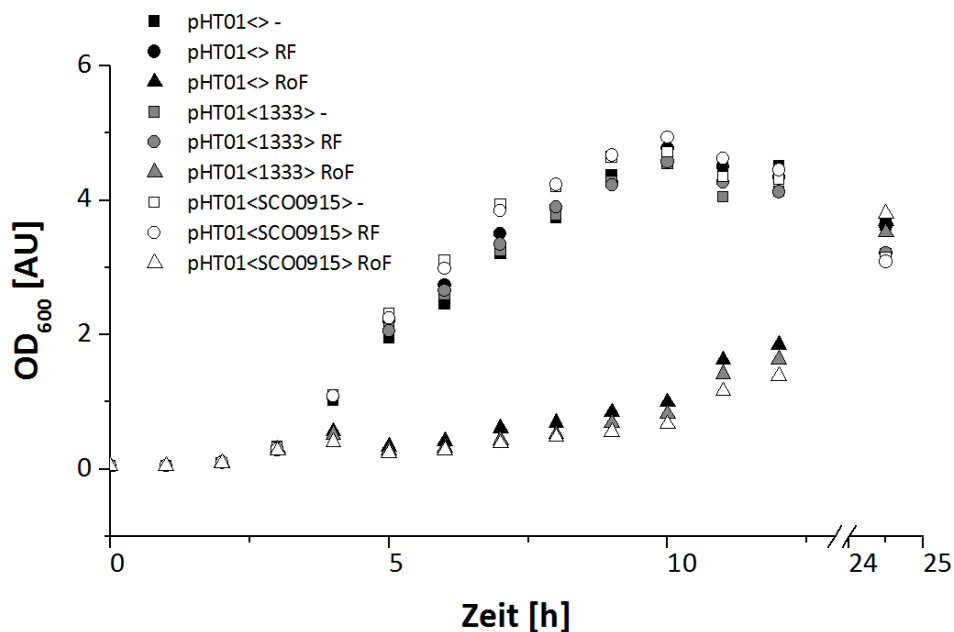
Da angenommen wird, dass *S. davawensis* aber auch durch einen bisher noch unbekannt aktiven Exporter RoF aus der Zelle transportiert, so dass die intrazelluläre RoF-Konzentration für *S. davawensis* nicht letal wird, wurde in einem weiteren Versuch mit dem RoF-sensitiven *Bacillus subtilis* Marburg 168 (Wildtyp) getestet, ob eine Überexpression des Dodecin-Gens eine RoF-Resistenz ermöglicht.

Um dies zu untersuchen, wurde das *S. davawensis* als auch das *S. coelicolor* Dodecin mit Hilfe des Expressionsplasmids pHT01 mit IPTG-induzierbarem P<sub>grac</sub>-Promotor in *B. subtilis* unter Zugabe von antibiotisch wirksamen Dosen von RoF in LB-Medium (50  $\mu\text{M}$  RoF) als auch auf LB-Nährböden (10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$  RoF) überproduziert. Die Gene der beiden Streptomyzeten Dodecine wurden zuvor an die *B. subtilis* codon-usage angepasst. Um einen Effekt des ursprünglichen zur Reinigung verwendeten C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag auszuschließen, wurden die Gene in *B. subtilis* jeweils mit und ohne His<sub>6</sub>-Tag exprimiert. Den Kulturen in LB-Medium wurde von Beginn an RF, RoF und DMSO zugegeben. Die Dodecin-Expression wurde bei OD<sub>600</sub> 0,1 induziert. Eine schematische Darstellung des Versuchshintergrunds ist in Abbildung 19 dargestellt.





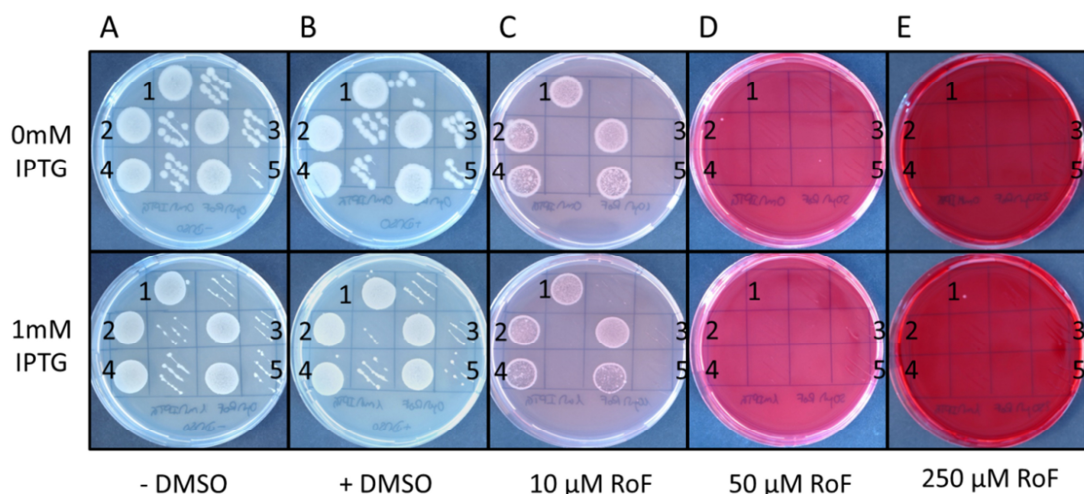
**Abbildung 19: *B. subtilis* Marburg 168 *rib*-Operon- und Dodecin-Expressionsübersicht.** Das *rib*-Operon aus *ribDGEABHT* sowie *ribU* werden im Gegensatz zu *ribCF* durch FMN *feedback*-reguliert. RibU transportiert extrazelluläres RF und RoF in die Zelle, wo es durch die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase RibCF in FMN und FAD bzw. RoFMN und RoFAD umgesetzt wird. Das durch den IPTG-induzierbaren *Pgrac*-Promotor im Expressionsplasmid pHT01 überproduzierte *S. davawensis* bzw. *S. coelicolor* Dodecin bindet FMN und FAD bzw. RoF, RoFMN und RoFAD.



**Abbildung 20: Wachstumskurven von *B. subtilis* Marburg 168 in LB-Medium unter Roseoflavin- und Riboflavinbehandlung bei gleichzeitiger Überproduktion von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin.** Die Kulturen wurden von Beginn an mit 38  $\mu$ M DMSO, 50  $\mu$ M RF bzw. 50  $\mu$ M RoF bei 37°C unter oxischen Bedingungen kultiviert. Die Proteinüberproduktion wurde bei  $OD_{600}$  0,1 mit 1 mM IPTG induziert.

Wie aus den Wachstumskurven in Abbildung 20 zu erkennen ist, hat die Dodecin-Überproduktion unter allen drei Kultivierungsbedingungen (ohne Flavin, mit RF bzw. mit RoF) keinen positiven Einfluss auf das Wachstum der verschiedenen *B. subtilis*-Stämme. Der minimale Wachstumsunterschied zwischen RoF-behandeltem Kontrollstamm mit leerem pHT01-Expressionsplasmid sowie der Dodecin-überproduzierenden Stämme lag vermutlich an der energieaufwendigen Proteinüberproduktion, die die Produktionsstämme etwas langsamer wachsen ließ. Nach Erreichen einer OD<sub>600</sub> von etwa 4,8-5 war das Wachstum der Stämme mit und ohne RF rückläufig, was möglicherweise an der Limitierung der Kohlenstoffquellen im Medium lag. Die RoF-behandelten Stämme wuchsen zu diesem Zeitpunkt (nach zwölf Stunden Kultivierung) langsam aber stetig weiter. Nach 25 Stunden Kultivierung hatten alle Stämme eine etwa gleiche optische Dichte erreicht.

Für den Wachstumsversuch auf LB-Nährböden mit 10 µM, 50 µM und 250 µM RoF wurden zur Kontrolle Nährböden mit und ohne DMSO verwendet. Zur Induktion der Proteinüberproduktion wurde jeweils einem Nährboden einer untersuchten Bedingung 1 mM IPTG zugegeben. Über Nacht in LB-Medium gewachsene Kulturen wurden auf 1·10<sup>6</sup> Zellen/ml verdünnt und jeweils 50.000 Zellen auf die Nährböden getropft. Parallel hierzu wurden die Stämme auf dem gleichen Nährboden nochmals ausgestrichen und über Nacht bei 37°C abgedunkelt inkubiert. Abbildung 21 zeigt das Ergebnis des Wachstumsversuchs. Wie zu erkennen ist, wuchsen die Dodecin-produzierenden *B. subtilis*-Stämme genauso gut wie die nicht induzierten Stämme. Bei einer RoF-Konzentration von 10 µM war ein deutliches Wachstumsdefizit im Vergleich zu den Kontrollen zu beobachten. Ab einer Konzentration von 50 µM wuchsen alle Stämme nicht mehr. Wie auch im Wachstumsversuch in LB-Medium (Abb. 20) wuchsen die induzierten Stämme minimal schlechter, was vermutlich an einer energieaufwendigen Proteinüberproduktion lag.



**Abbildung 21: Wachstum von *B. subtilis* Marburg 168 auf LB-Nährböden mit Roseoflavin bei Überproduktion von Dodecin aus *S. davawensis* und *S. coelicolor*.** Die Nährböden wurden (A) ohne DMSO, (B) mit 150 µM DMSO und mit (C) 10 µM, (D) 50 µM und (E) 250 µM RoF sowie zur Genexpression mit und ohne 1 mM IPTG versetzt. Von jedem *B. subtilis*-Stamm wurden ca. 50.000 Zellen auf die LB-Nährböden getropft als auch ausgestrichen und über Nacht bei 37°C abgedunkelt inkubiert. *B. subtilis* Marburg 168 (1) pHT01<>, (2) pHT01<1333>, (3) pHT01<1333his<sub>6</sub>>, (4) pHT01<SCO0915> und (5) pHT01<SCO0915his<sub>6</sub>>.

In beiden Versuchen wurde somit gezeigt, dass weder die Überproduktion des Dodecins aus *S. davawensis* noch aus *S. coelicolor* in einem rekombinanten RoF-sensitiven *B. subtilis*-Stammes zu einer RoF-Resistenz führt.

#### 5.1.1.7 *S. davawensis* Dodecin moduliert den Flavinstoffwechsel

In einer früheren Studie wurde bereits gezeigt, dass das archaeale Dodecin von *H. salinarum* unter wachstumslimitierenden Bedingungen als RF-Speicherprotein dient (Grininger *et al.*, 2009). Verbessern sich die äußeren Bedingungen für *H. salinarum*, wird RF bei gesteigerten Stoffwechselprozessen wieder entbunden und steht für die Biosynthese der Cofaktoren FMN und FAD zur Verfügung.

Um zu untersuchen, ob das bakterielle *S. davawensis* Dodecin ebenfalls eine Funktion im Flavinstoffwechsel übernimmt, wurden der *S. davawensis* Wildtyp sowie die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante  $\Delta I333.9$  in einem Langzeitwachstumsversuch vierzehn Tage lang in YS-Medium kultiviert. In der exponentiellen (ein Tag), der früh stationären (zwei Tage), der stationären (sieben Tage) und spät stationären (zehn und vierzehn Tage) Wachstumsphase wurden Myzelproben entnommen. Die Zellen wurden vom Mediumüberstand abgetrennt, intensiv gewaschen und der zellfreie Extrakt mittels Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) gefällt. Der proteinfreie Extrakt als auch der ebenfalls mit TCA behandelte Mediumüberstand wurden mittels HPLC analysiert. Die intrazellulär gemessenen Flavinkonzentrationen wurden übersichtshalber jeweils auf 1 mg zellfreien Extrakt normiert. Die detaillierten Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 39 angegeben.

Sowohl im zellfreien Extrakt von *S. davawensis* Wildtyp als auch von *S. davawensis*  $\Delta I333.9$  konnte in einem Zeitraum von vierzehn Tagen kaum RF gemessen werden. Nur in der spät stationären Wachstumsphase von *S. davawensis* Wildtyp wurden geringe Mengen an RF bestimmt (ca. 0,16  $\mu\text{M}$ ). Dagegen betrug der Hauptanteil der gemessenen Flavine in beiden Stämmen FMN. Die FMN-Konzentrationen waren dabei in den ersten zwei Tagen im Wildtyp um ca. 0,5  $\mu\text{M}/\text{mg}$  Rohextrakt geringer als in der Disruptionsmutante. Während der stationären als auch der spät stationären Wachstumsphase hingegen betrug die intrazellulären FMN-Konzentrationen im Wildtyp das 1,4- bis 1,7-fache mehr als in *S. davawensis*  $\Delta I333.9$ . In *S. davawensis* Wildtyp blieb die FMN-Konzentration mit 2,7-2,8  $\mu\text{M}/\text{mg}$  Rohextrakt während der ganzen Zeit relativ konstant und stieg erst am Tag vierzehn auf ca. 5,75  $\mu\text{M}/\text{mg}$  Rohextrakt stark an. Dagegen sank die FMN-Konzentration in *S. davawensis*  $\Delta I333.9$  zunächst nach Tag zwei und erreichte erst wieder nach vierzehn Tagen ihre Anfangskonzentration von ca. 3,34  $\mu\text{M}/\text{mg}$  Rohextrakt.

Die intrazelluläre FAD-Konzentration hingegen war für beide Stämme am Tag zwei am höchsten (ca. 1,93  $\mu\text{M}$  im Wildtyp, ca. 2,28 in  $\Delta I333.9$ ), wobei die des Wildtyps in der spät stationären Wachstumsphase sank (ca. 0,42  $\mu\text{M}$ ) und die von *S. davawensis*  $\Delta I333.9$  in der stationären und spät stationären Wachstumsphase relativ konstant blieb (ca. 1,34-1,56  $\mu\text{M}$ ). Die intrazellulären RoF-Konzentrationen waren für beide Stämme am zweiten als auch am vierzehnten Tag am höchsten, wobei die von *S. davawensis*  $\Delta I333.9$  um etwa 0,2  $\mu\text{M}/\text{mg}$  Rohextrakt minimal jedoch nicht signifikant höher waren. Die extrazellulären RoF-Konzentrationen waren anfangs etwas unterschiedlich, betrug an Tag vierzehn jedoch jeweils etwa 19  $\mu\text{M}$ .

Es konnte somit gezeigt werden, dass die Disruption des Dodecin-Gens in *S. davawensis* vorwiegend Auswirkungen auf die intrazelluläre FMN-Konzentration

besitzt. Während die FMN-Konzentration in *S. davawensis* Wildtyp anfänglich geringer als in der Dodecin-Disruptionsmutante war, waren sie in der stationären und spät stationären Wachstumsphase bei Beginn limitierender Wachstumsbedingungen deutlich höher. Die Vermutung liegt daher nahe, dass Dodecin wie auch in *H. salinarum* im Flavinstoffwechsel von *S. davawensis* involviert sein könnte.

**Tabelle 39: Intrazelluläre und extrazelluläre Flavinkonzentrationen von *S. davawensis* Wildtyp und *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante  $\Delta 1333.9$ .** In einer Dreifachbestimmung wurden die Kulturen vierzehn Tage (d) bei 30°C in YS-Medium unter oxidischen Bedingungen kultiviert. Die intrazellulären Flavinkonzentrationen  $RF_i$ ,  $FMN_i$ ,  $FAD_i$  und  $RoF_i$  sind jeweils auf 1 mg zellfreien Rohextrakt (RE) normiert worden. Die extrazelluläre RoF-Konzentration  $RoF_e$  wurde aus dem Mediumüberstand der Kulturen bestimmt. Die Messung der Flavinkonzentrationen wurde mit Hilfe einer HPLC durchgeführt. Konzentrationseinheiten: <sup>a</sup>  $\mu\text{M}/\text{mg RE}$ , <sup>b</sup>  $\mu\text{M}$ .

Stamm	Zeit [d]	$RF_i^a$	$FMN_i^a$	$FAD_i^a$	$RoF_i^a$	$RoF_e^b$
Wildtyp	1	0,00 ± 0,00	2,70 ± 0,64	1,14 ± 0,08	0,25 ± 0,07	1,28 ± 0,17
	2	0,00 ± 0,00	2,80 ± 0,14	1,93 ± 0,10	1,51 ± 0,09	5,48 ± 0,21
	7	0,00 ± 0,00	2,72 ± 0,12	1,11 ± 0,10	0,95 ± 0,19	17,29 ± 1,24
	10	0,00 ± 0,00	2,86 ± 0,20	0,90 ± 0,11	0,30 ± 0,07	15,89 ± 1,53
	14	0,16 ± 0,21	5,75 ± 0,49	0,42 ± 0,02	1,54 ± 0,12	19,34 ± 2,64
$\Delta 1333.9$	1	0,00 ± 0,00	3,34 ± 0,23	1,60 ± 0,18	0,42 ± 0,16	0,44 ± 0,35
	2	0,00 ± 0,00	3,29 ± 0,08	2,28 ± 0,12	1,71 ± 0,27	7,73 ± 0,83
	7	0,00 ± 0,00	1,94 ± 0,12	1,34 ± 0,06	0,52 ± 0,03	17,49 ± 1,01
	10	0,00 ± 0,00	1,86 ± 0,11	1,47 ± 0,17	0,20 ± 0,02	17,46 ± 1,74
	14	0,00 ± 0,00	3,34 ± 0,34	1,56 ± 0,32	1,73 ± 0,17	18,86 ± 2,25

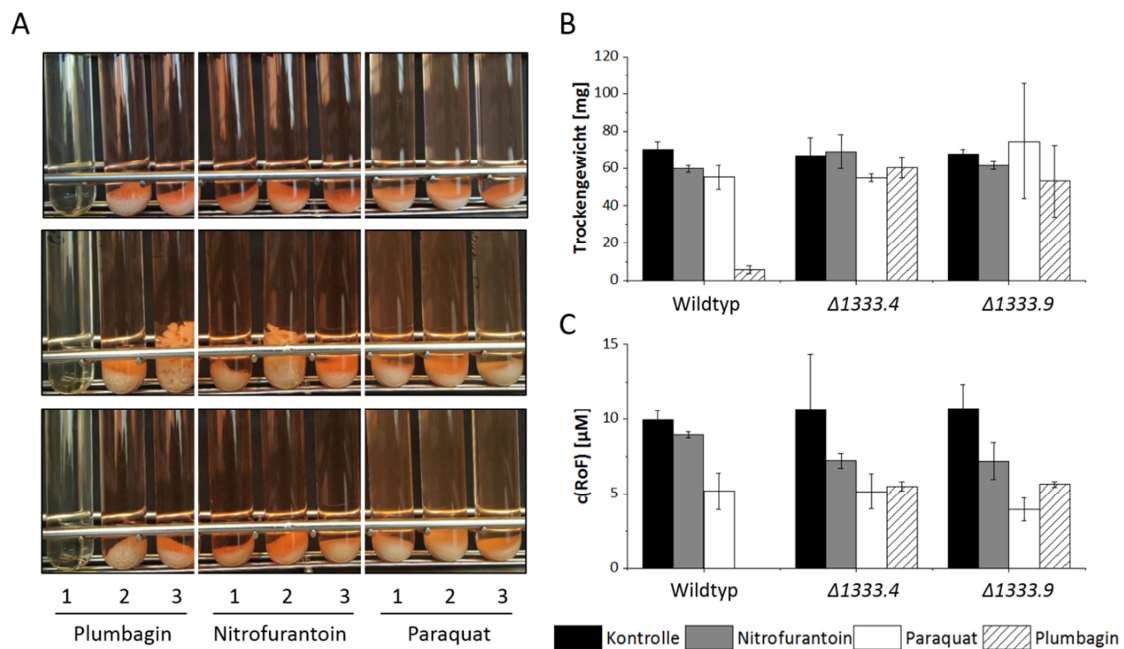
#### 5.1.1.8 Dodecin ist in der oxidativen Stressantwort von *S. davawensis* involviert

Um zu überprüfen, ob das *S. davawensis* Dodecin ähnlich wie das *H. salinarum* Dodecin bei der Regeneration reaktiver Flavinderivate im Zuge des oxidativen Stresses eine Funktion übernimmt, wurden der *S. davawensis* Wildtyp, die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  als auch der *S. coelicolor* Wildtyp zunächst den Superoxidanionradikal-generierenden Oxidantien Nitrofurantoin, Paraquat und Plumbagin ausgesetzt. Die für die Stämme nicht-letalen Konzentrationen der Oxidantien wurden hierfür durch Wachstumsversuche auf Nährböden aus *Difco nutrient broth*-Agar (DNA) bestimmt (Ergebnisse nicht gezeigt). Es wurde darauf geachtet, dass alle Stämme gleich gut wuchsen. Als nicht-letale Konzentrationen ergaben sich somit für Nitrofurantoin 100  $\mu\text{M}$ , für Paraquat 500  $\mu\text{M}$  und für Plumbagin 20  $\mu\text{M}$ .

Ein möglicher Einfluss von oxidativem Stress auf die *S. davawensis*-Stämme unter Nitrofurantoin, Paraquat und Plumbagin wurde durch Kultivierung in YS-Medium und Bestimmung der extrazellulären RoF-Konzentrationen sowie der finalen Trockenmasse in drei unabhängigen Versuchen untersucht. Als Kontrollversuch wurde jeder Stamm in YS-Medium ohne Zusatz von Oxidantien kultiviert. Als Kontrollstamm diente der *S. coelicolor* Wildtyp. Die Medien wurden hierfür mit  $1 \cdot 10^6$  Sporen beimpft und fünf Tage lang bei 30°C abgedunkelt unter oxidischen Bedingungen inkubiert. Abbildung 22 zeigt das Ergebnis des Wachstumsversuchs für die *S. davawensis*-Stämme. Es stellte sich heraus, dass *S. davawensis*  $\Delta 1333.4$  und  $\Delta 1333.9$  gegenüber Nitrofurantoin, Paraquat und Plumbagin resistent waren und in etwa genauso viel Biomasse produzierten wie im Kontrollversuch. *S. coelicolor* war ebenfalls gegenüber allen drei Oxidantien resistent und wies in allen Versuchen gleiche Biomassen auf (nicht gezeigt).

Dagegen war der *S. davawensis* Wildtyp in einer Flüssigkultur nur gegenüber Nitrofurantoin und Paraquat resistent. Unter Behandlung von Plumbagin wies dieser ein starkes Wachstumsdefizit auf. Obwohl der Wildtyp in den Vorversuchen auf Nährböden mit 20  $\mu\text{M}$  Plumbagin genauso gut wuchs wie die Dodecin-Disruptionsmutanten, betrug die Biomasse in Flüssigmedium interessanterweise nur etwa ein zwölftel zu der des Kontrollversuchs ohne Oxidant.

Eine signifikante Reduktion der extrazellulären RoF-Konzentration konnte unter Zugabe von Nitrofurantoin weder für den *S. davawensis* Wildtyp noch für die Disruptionsmutanten  $\Delta I333.4$  und  $\Delta I333.9$  bestimmt werden. Wuchsen die Stämme jedoch in Anwesenheit von Paraquat und Plumbagin, wurde für die Dodecin-Disruptionsmutanten nur etwa halb so viel extrazelluläres RoF gemessen wie in den Kulturen des Kontrollversuchs. Die extrazelluläre RoF-Konzentration in den Kulturen von *S. davawensis* Wildtyp mit Paraquat war ebenfalls im Vergleich zum Kontrollversuch um die Hälfte reduziert. Da das Wachstum des Wildtyps in Anwesenheit von Plumbagin stark inhibiert war, konnte in diesem Fall kein RoF gemessen werden.



**Abbildung 22: Wachstum von *S. davawensis* Wildtyp und *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten  $\Delta I333.4$  und  $\Delta I333.9$  unter induziertem oxidativen Stress.** Die Streptomyzetenstämme (je  $1 \cdot 10^6$  Sporen) wurden in drei unabhängigen Versuchen in YS-Medium fünf Tage lang bei  $30^\circ\text{C}$  abgedunkelt unter oxidischen Bedingungen mit  $100 \mu\text{M}$  Nitrofurantoin,  $500 \mu\text{M}$  Paraquat bzw.  $20 \mu\text{M}$  Plumbagin inkubiert. Die jeweilige Biomasse wurde über das Trockengewicht des gesamten Kulturmyzels bestimmt, während die extrazellulären RoF-Konzentrationen im Medium mittels HPLC bestimmt wurden. (A) Myzelsedimente und Mediumüberstände der einzelnen Kulturen von *S. davawensis* (1) Wildtyp, (2)  $\Delta I333.4$  und (3)  $\Delta I333.9$ . (B) Durchschnittliches Trockengewicht der Kulturen und (C) durchschnittliche extrazelluläre RoF-Konzentration nach fünf Tagen unter oxidativem Stress.

Somit konnte gezeigt werden, dass Nitrofurantoin und Paraquat keinen Einfluss auf die Disruption des Dodecin-Gens in *S. davawensis* haben. Der *S. davawensis* Wildtyp und die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten waren gleichermaßen wachstums-

resistent gegenüber Nitrofurantoin und Paraquat. Dagegen weist die stark erhöhte Sensitivität des *S. davawensis* Wildtyps gegenüber Plumbagin im Vergleich zu den Dodecin-Disruptionsmutanten und dem *S. coelicolor* Wildtyp auf eine Rolle des Dodecins in der durch Plumbagin induzierten oxidativen Stressantwort hin. Die Disruption des Dodecin-Gens in *S. davawensis* scheint hierbei sogar einen wachstumsfördernden Effekt zu haben.

#### 5.1.1.9 Differentielle Metabolomanalysen unter Plumbaginbehandlung weisen auf eine grundsätzliche Stresstoleranz der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante hin

Die vorherigen Versuche dieser Arbeit zeigten, dass die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutanten und der *S. coelicolor* Wildtyp im Gegensatz zum *S. davawensis* Wildtyp unter den angewendeten Versuchsbedingungen Plumbagin-resistent sind. Der gravierende Wachstumsunterschied der *S. davawensis*-Stämme ist hierbei nur durch die Disruption des Dodecin-Gens *BN159\_1333* zu erklären. *S. coelicolor* besitzt jedoch ein intaktes Dodecin-Gen (*SCO0915*). Um nähere Erkenntnisse über die in den Streptomyzetenstämmen zu Grunde liegenden Plumbagin-induzierten Stressantworten zu erlangen, wurden zunächst differentielle Metabolomanalysen durchgeführt. Die Stämme wurden hierfür in YS-Medium ohne als auch mit einer für den *S. davawensis* Wildtyp subletalen Plumbaginkonzentration (15  $\mu$ M) kultiviert. Die Metabolome wurde mittels Acetonitril extrahiert. Die Messung der Metabolite erfolgte mit Hilfe einer *flow-injection time-of-flight* Massenspektrometrie an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich (ETHZ) (Fuhrer *et al.*, 2011). Zur Analyse wurden insgesamt 180 Datensätze vermessen, bei denen 12.730 Ionen detektiert werden konnten. Hiervon waren 1.673 Ionen als Metabolite annotiert. Insgesamt konnten 1.851 potentielle Metabolite identifiziert werden.

Die differentiellen Analysen ergaben, dass die Metabolome der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante und des Wildtyps zueinander unterschiedlicher sind als die der Dodecin-Disruptionsmutante und des *S. coelicolor* Wildtyps. Letztere wiesen Akkumulationen von osmoprotektiven als auch vor Singulett-Sauerstoff schützenden Metaboliten auf wie beispielsweise modifizierte Zucker und Carotinoide. Im *S. davawensis* Wildtyp waren stattdessen Carotinoide vorwiegend depletiert. Während in beiden *S. davawensis*-Stämmen jedoch das nur in Actinobakterien vorkommende Antioxidans Mycothion akkumuliert war, lag in *S. coelicolor* das Antioxidans Tocopherol vermehrt vor. Mycothion war in *S. coelicolor* depletiert.

Die Disruption des Dodecin-Gens führt demnach in *S. davawensis* zu einer dem *S. coelicolor* offensichtlich ähnlicheren oxidativen Stressantwort. Diese hat für die *S. davawensis* Disruptionsmutante scheinbar eine Plumbaginresistenz zur Folge.

#### 5.1.1.10 Differentielle Transkriptomanalysen unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress

Die vorherigen Metabolomanalysen gaben jedoch nur einen Hinweis darauf, wie die verschiedenen Streptomyzetenstämme auf Plumbagin-induzierten oxidativen Stress reagieren. Eine Funktion von Dodecin konnte hieraus aber zunächst nicht abgeleitet werden. Für genauere Analysen wurde deshalb eine differentielle Transkriptomanalyse durchgeführt. Da das Transkript des Dodecin-Gens bereits in exponentieller Wachstumsphase nachgewiesen werden konnte (Kapitel 5.1.1.3), sollte hierbei auch eine mögliche transkriptionelle Regulation unter oxidativem Stress untersucht werden. Hierzu wurden die Streptomyzetenstämme in YS-Medium ohne als auch mit subletalen

Plumbaginkonzentrationen (15  $\mu$ M) bis zur exponentiellen und stationären Wachstumsphase kultiviert. Die Isolierung der Gesamt-RNA und die anschließende *paired-end*-RNA-Sequenzierung der verschiedenen Proben wurden am Centrum für Biotechnologie (CeBiTec), Bielefeld, durchgeführt. Die Qualität der Gesamt-RNA wurde mittels NanoDrop als auch über den *RNA Integrity Number* (RIN)-Wert bestimmt. Letzterer lag bei allen RNA-Proben über sieben bzw. in dem für RNA-Sequenzierungen nötigen Toleranzbereich (Tab. 40). Insgesamt wurden 165.574.110 *reads* (Ablesungen einer Sequenz) durchgeführt. Die einzelnen Sequenzen wurden anschließend mit der Software Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014) bearbeitet (*trimming*). Mit der Software Bowtie 2 (Langmead & Salzberg, 2012) wurden die *reads* gegen Referenzsequenzen von *S. davawensis* JCM4913 Wildtyp (Genomsequenz NC\_020504.1, pSDA1-Plasmidsequenz NC\_020545.1) bzw. *S. coelicolor* A3(2) Wildtyp (Genomsequenz NC\_003888.3, SCP1-Plasmidsequenz NC\_003903.1 und SCP2-Plasmidsequenz NC\_003904.1) abgeglichen (*mapping*). Die differentielle Transkriptomanalyse wurde mit Hilfe der Software ReadXplorer durchgeführt (Hilker *et al.*, 2014). Aus Tabelle 40 sind die detaillierten Angaben zur RNA-Qualität der zur Sequenzierung verwendeten Proben als auch die bei der Sequenzierung erlangten *reads* und die beim *mapping* erlangten Übereinstimmungen zu entnehmen.

**Tabelle 40: Detaillierte Angaben zur Qualität der RNA-Proben, der *pair-end*-RNA-Sequenzierung und des *mappings* der sequenzierten Transkripte.** Für die RNA-Proben von *S. davawensis* Wildtyp (*Sd* Wt), *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante  *$\Delta$ 1333.9* (*Sd  $\Delta$ 1333.9*) und *S. coelicolor* Wildtyp (*Sc* Wt) mit und ohne Behandlung von 15  $\mu$ M Plumbagin (Pb) zur exponentiellen (exp) und stationären (stat) Wachstumsphase (Wachst.phase) wurden die RIN-Werte, die Gesamtzahl der *reads* pro Sequenzierung sowie die Anzahl aller einzelnen *mappings* (*unique mappings*), der einzelnen perfekten *mappings* (*single perfect mappings*) als auch der einzelnen am besten übereinstimmenden *mappings* (*single best-match mappings*) bestimmt.

Stamm	Wachst.-phase	Pb	RIN	<i>reads</i>	<i>unique mappings</i>	<i>single perfect mappings</i>	<i>single best-match mappings</i>
<i>Sd</i> Wt	exp	-	8,8	10.153.390	13.777.225	12.427.617	1.349.608
	stat	-	9,0	16.120.906	14.761.641	13.425.466	1.336.175
<i>Sd <math>\Delta</math>1333.9</i>	exp	-	9,0	19.626.946	18.110.900	16.487.397	1.623.503
	stat	-	6,3	17.239.546	15.643.908	13.654.351	1.989.557
<i>Sc</i> Wt	exp	-	9,5	13.788.274	12.644.667	11.269.375	1.375.292
	stat	-	5,8	5.927.198	4.572.509	3.905.256	667.253
<i>Sd</i> Wt	exp	+	8,4	13.192.460	12.669.517	11.539.585	1.129.932
	stat	+	8,0	15.579.194	14.309.284	12.974.869	1.334.415
<i>Sd <math>\Delta</math>1333.9</i>	exp	+	9,8	16.817.346	15.185.004	13.770.709	1.414.295
	stat	+	8,5	16.591.368	15.056.826	13.679.541	1.377.285
<i>Sc</i> Wt	exp	+	7,2	11.428.050	10.572.211	9.589.594	982.617
	stat	+	7,8	9.109.432	7.773.637	6.951.101	822.536



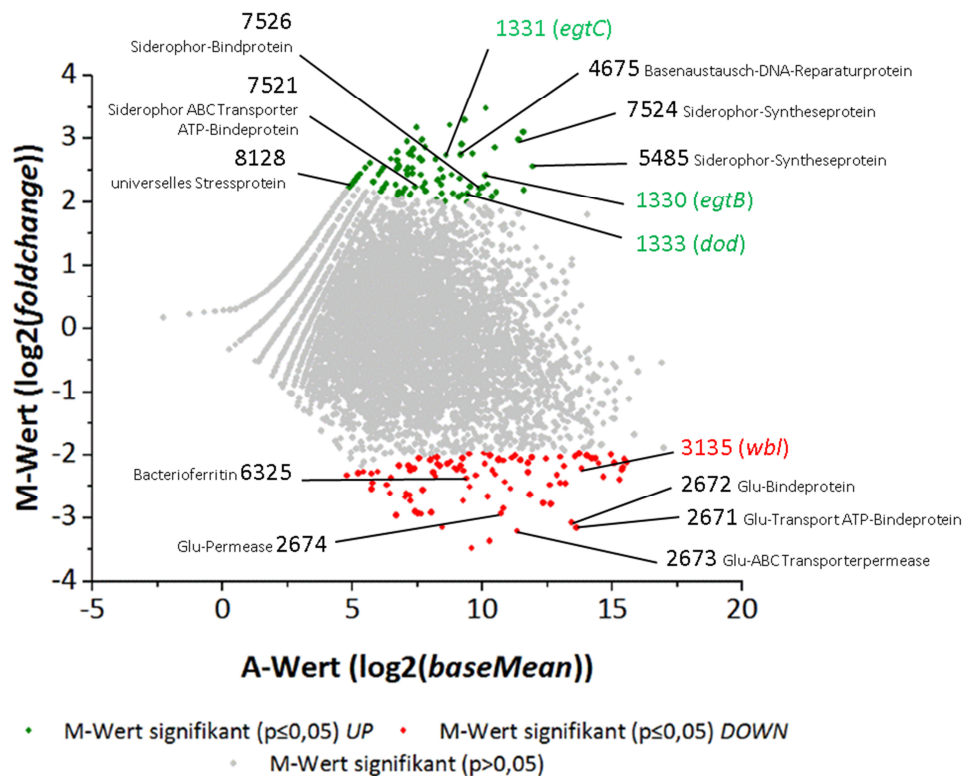
Zur differentiellen Transkriptomanalyse wurden die Daten der zu untersuchenden Bedingung (plus Plumbagin bzw. *S. davawensis*  $\Delta$ 1333) auf die Daten des Kontroll-experiments (ohne Plumbagin bzw. *S. davawensis* Wildtyp) bezogen und anschließend übersichtshalber in einem *Scatter-Plot* dargestellt. Hierbei wurde für den A-Wert die durchschnittliche Expressionshöhe aller Replikate (*baseMean*) zur Basis 2 logarithmiert und gegen den M-Wert aufgetragen, der aus der Änderung des  $\log_2$ -Wertes der Expressionshöhe eines jeden Transkripts errechnet wurde. Werte, die einen p-Wert  $\leq 0,05$  besaßen, wurden als signifikant angesehen. Gene, deren Produkte in den Stämmen *S. davawensis* und *S. coelicolor* noch nicht charakterisiert und deshalb als hypothetisches Protein annotiert waren, wurden zwar in die Datenanalyse einbezogen, aber nicht für die Auswertung näher betrachtet.

Die differentielle Regulation der Transkripte von *S. davawensis* Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase nach Plumbaginbehandlung zeigte, dass stress-spezifische Gene verstärkt transkribiert wurden (Abb. 23). Hierzu gehörten beispielsweise Gene universeller Stressproteine und Basenaustausch-DNA-Reparaturproteine. Auch waren Gene von Proteinen des Eisentransports erhöht transkribiert. Besonders interessant war jedoch, dass das Dodecin-Gen *BN159\_1333* nach Plumbaginbehandlung etwa 4,3-fach erhöht transkribiert wurde, was auf eine stressinduzierte Regulation deuten könnte. Darüber hinaus war die Transkription der direkt stromaufwärts des Dodecin-Gens liegenden und putativ für die Ergothioneinbiosyntheseproteine kodierenden Gene *BN159\_1330* und *BN159\_1331* ähnlich erhöht (5,4-fach bzw. 6,4-fach). Die Gene der Ergothioneinbiosynthese und das Dodecin-Gen scheinen im *S. davawensis* Wildtyp durch Plumbagin gleichermaßen aktiviert zu werden. Es wird demnach vermutet, dass die Transkription des *egt*-Operons möglicherweise eine Folge der Transkription des Dodecin-Gens sein könnte.

Gene des Glutamattransports und das des Eisenspeicherproteins Bacterioferritin waren dagegen reprimiert. Im Besonderen fiel jedoch das um das etwa 4,6-fach weniger transkribierte Gen eines Transkriptionsfaktors der *WhiB*-Familie auf (*BN159\_3135*). *WhiB*-Proteine regulieren in *M. tuberculosis* u. a. die Ergothioneinbiosynthese (Saini *et al.*, 2016). Es könnte somit ein Zusammenhang zwischen den erhöht transkribierten Genen der Ergothioneinbiosynthese und der reduzierten Gentranskription des *Wbl*-Proteins (*Wbl*, *WhiB like protein*) in *S. davawensis* Wildtyp geben.

Während der stationären Wachstumsphase wurden in *S. davawensis* Wildtyp unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress dagegen Gene, die für Proteine des Eisentransports und eisenabhängige Peroxidasen kodieren, stark reprimiert (nicht gezeigt). Gene von Transportproteinen osmoprotektiver Proteine wie Ectoin/Hydroxyectoin, Harnstoff und verschiedenen Zuckern sowie das Gen der Trehalose-Synthase waren ebenfalls signifikant reprimiert.

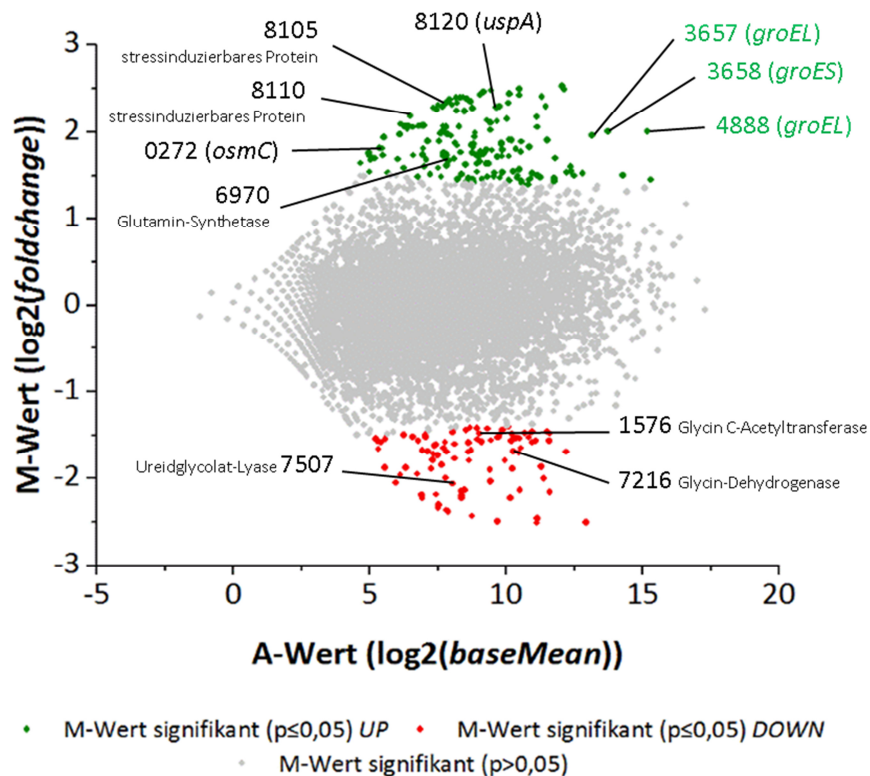




**Abbildung 23: Differentielle Transkriptomanalyse von *S. davawensis* Wildtyp in der exponentiellen Wachstumsphase nach Plumbaginbehandlung.** Alle Gene, die in *S. davawensis* plus Plumbagin mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  induziert (grüne Punkte) oder reprimiert (rote Punkte) waren, wurden zur Datenanalyse der oxidativen Stressantwort herangezogen. Nicht bisher charakterisierte bzw. annotierte Gene wurden bei der Auswertung nicht mit einbezogen. Die Nummerierung der Gene erfolgte nach Annotation BN159\_Nummer.

Die differentielle Transkriptomanalyse der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante  $\Delta 1333.9$  aus der exponentiellen Wachstumsphase zeigte nach Plumbaginbehandlung wie vermutet eine zum Wildtyp sehr unterschiedliche Stressantwort (Abb. 24). Neben Genen von universellen und induzierbaren Stressproteinen (u. a. UspA, OsmC) waren besonders Gene des Zuckermetabolismus erhöht transkribiert, was sich mit Beobachtungen der Metabolomanalysen deckt. Zudem waren die Gene der Chaperone GroEL, des Co-Chaperons GroES als auch das Gen der Glutamin-Synthetase aktiviert. Die im *S. davawensis* Wildtyp aktivierten Gene der Ergothioneinbiosynthese waren jedoch nicht signifikant erhöht transkribiert. Reprimiert waren vor allem Gene, deren Genprodukte am Abbau von Aminosäuren und Fettsäuren oder an der Harnstoffsynthese beteiligt sind.

Während der stationären Wachstumsphase waren in *S. davawensis*  $\Delta 1333.9$  zusätzlich weitere Gene aktiviert, deren Genprodukte in der oxidativen Stressantwort involviert sind (nicht gezeigt). Hierzu gehörten Gene von DNA-Reparaturproteinen und DNA-Endo-/Exonukleasen sowie von Enzymen bzw. Proteinen des Harnstoffabbaus und dessen Exports. Auch waren Gene von Eisentransportproteinen und auffällig vielen Phosphattransportern und Phosphatasen nach Plumbaginbehandlung erhöht transkribiert. Reprimiert waren dagegen Gene der Harnstoffsynthese, der  $\beta$ -Oxidation und des Zuckerabbaus.



**Abbildung 24: Differentielle Transkriptomanalyse von *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante  $\Delta 1333.9$  in der exponentiellen Wachstumsphase nach Plumbaginbehandlung.** Alle Gene, die in *S. davawensis*  $\Delta 1333.9$  plus Plumbagin mit einer Signifikanz von  $p \leq 0,05$  induziert (grüne Punkte) oder reprimiert (rote Punkte) waren, wurden zur Datenanalyse der oxidativen Stressantwort herangezogen. Nicht bisher charakterisierte bzw. annotierte Gene wurden bei der Auswertung nicht mit einbezogen. Die Nummerierung der Gene erfolgte nach Annotation BN159\_Nummer.

Die Vermutung, dass die Stressantwort der Dodecin-Disruptionsmutante nach Plumbaginbehandlung möglicherweise intensiver ist, wurde zusätzlich durch den direkten Vergleich der Transkriptome beider *S. davawensis*-Stämme aus exponentieller und stationärer Wachstumsphase unterstützt. Hierbei waren besonders Gene erhöht transkribiert, deren Genprodukte im Abbau von reaktiven Sauerstoffderivaten (*reactive oxygen species*, ROS) beteiligt sind. Während der exponentiellen Wachstumsphase waren in der Dodecin-Disruptionsmutante beispielsweise die Gene der Thiosulfat-Sulfurtransferase (Rhodanese), einer Bromperoxidase-Katalase und des Bacterioferritins aktiviert, während in der stationären Wachstumsphase zusätzlich die Gene einer Katalase-Peroxidase und das dazugehörige Gen eines Fur-ähnlichen transkriptionellen Repressors signifikant aktiviert waren.

Wie aus den Ergebnissen der Metabolomanalyse erwartet, wies auch die differentielle Transkriptomanalyse des Plumbagin-resistenten *S. coelicolor* Wildtyps auf eine zum *S. davawensis* Wildtyp unterschiedlich modulierte Stressantwort hin. Weder das Dodecin-Gen *SCO0915* noch die Gene der Ergothioneinbiosynthese *SCO0910-0913* waren in *S. coelicolor* genau wie auch in der Dodecin-Disruptionsmutante signifikant induziert oder reprimiert. Spezifische stressinduzierbare Gene waren im Gegensatz zu beiden *S. davawensis*-Stämmen nicht erhöht transkribiert. Stattdessen waren während der exponentiellen Wachstumsphase neben Genen des Glutamattransports und der

Trehalosesynthese auch Gene der RF-Biosynthese signifikant aktiviert (nicht gezeigt). Gene des Lipidmetabolismus, des Phosphattransports, von Phosphat-Kinasen und Phosphatasen als auch des Zuckermetabolismus waren dagegen reprimiert. Interessanterweise wurden aber auch Gene reprimiert, deren Genprodukte in der Synthese des *quorum sensing*-Signalmoleküls  $\gamma$ -Butyrolacton involviert sind.

Während der stationären Wachstumsphase waren beispielsweise Gene, deren Genprodukte in der Actinorhodinbiosynthese und dem Celluloseabbau beteiligt sind aktiviert, während welche der Carotinoidbiosynthese und des Pentosphosphatstoffwechsels reprimiert waren.

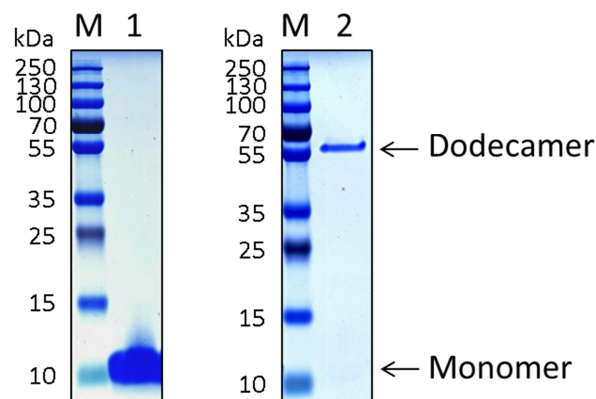
Somit zeigte auch die differentielle Transkriptomanalyse, wie bereits die differentielle Metabolomanalyse, signifikante Unterschiede in der Regulation der durch Plumbagin induzierten oxidativen Stressantwort. Aufgrund der verstärkten Transkription des Dodecin-Gens im *S. davawensis*, nicht jedoch im *S. coelicolor* Wildtyp, ist zu vermuten, dass Dodecin eine spezielle Funktion in *S. davawensis* einnimmt. Wird das Dodecin-Gen wie in der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante nicht mehr exprimiert, ist die oxidative Stressantwort moduliert.

### 5.1.2 Biochemische Charakterisierung des *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecins

Die *in vivo*-Untersuchung der Funktion der Dodecine aus *S. davawensis* und *S. coelicolor* weist möglicherweise auf sehr unterschiedliche biochemische Eigenschaften hin. Die Aminosäuresequenzen des Dodecins aus *S. davawensis* und *S. coelicolor* sind zu ca. 72% identisch (Kapitel 5.1.1.1). Im folgenden Kapitel wurden deshalb die in *E. coli* heterolog produzierten und gereinigten Streptomyzeten-Dodecine auf ihre Proteinstabilitäten sowie multimerassemblierenden und flavinbindenden Eigenschaften untersucht. Die an der Proteinstruktur beteiligten Aminosäuren wurden anhand verschiedener Dodecin-Punktmutanten und der in dieser Arbeit gelösten Proteinstruktur von *S. davawensis* Dodecin identifiziert.

#### 5.1.2.1 *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin weisen unterschiedliche Proteinstabilitäten auf

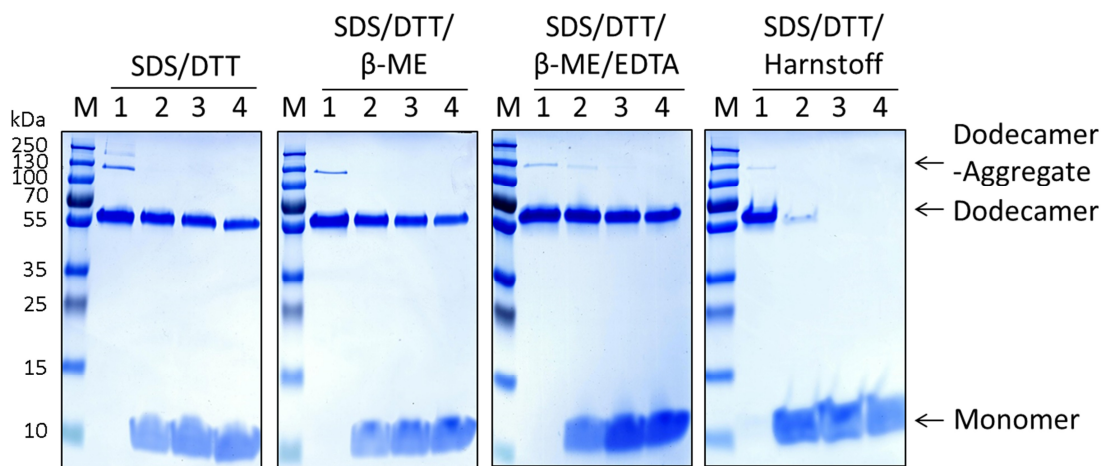
Die heterologe Produktion des *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecins mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag erfolgte in *E. coli* Rosetta 2(DE3) (Grininger *et al.*, 2006a). Die Proteine wurden bis zur apparenten Homogenität mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Abbildung 25 zeigt beispielhaft ein denaturierendes Polyacrylamid (PA)-Gel zur Reinheitskontrolle von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin. Interessanterweise ist zu erkennen, dass das *S. davawensis* Dodecin unter denaturierenden Bedingungen weniger stabil ist als das *S. coelicolor* Dodecin. Während das *S. davawensis* Dodecin als 9 kDa großes Monomer aufgetrennt wurde, behielt das *S. coelicolor* Dodecin seine dodecamere Struktur. Da Dodecin-Dodecamere eine globuläre Tertiärstruktur einer fast perfekten Kugel bilden, läuft das Dodecamer in PA-Gelen nicht bei einem Molekulargewicht (MG) von ca. 108 kDa sondern bei einem MG von nur ca. 65 kDa.



**Abbildung 25: Denaturierendes SDS-PA-Gel von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin nach Reinigung mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie.** Es wurden jeweils 10 µl der (1) *S. davawensis* Dodecin und (2) *S. coelicolor* Dodecin Elutionsfraktionen gelelektrophoretisch aufgetrennt. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

### 5.1.2.2 *S. coelicolor* Dodecin ist thermostabil und salzstabil

Für das Dodecin des Actinobakteriums *M. tuberculosis* wurde bereits gezeigt, dass es ein sehr stabiles Dodecamer bildet, welches bei Temperaturen von bis zu 120°C sowie bei Salzkonzentrationen von bis zu 5 M nicht disassembliert (Liu *et al.*, 2011a). Um die Stabilität des *S. coelicolor* Dodecin-Dodecamers näher zu untersuchen, wurde das *S. coelicolor* Dodecin mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS, 2%), den Disulfidbrücken-reduzierenden Chemikalien Dithiothreitol (DTT, 10 mM) und  $\beta$ -Mercaptoethanol (2%) sowie dem Komplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA, 1 mM) und der chaotropen Verbindung Harnstoff (8 M) für jeweils 30 min bei 95°C behandelt. Nach 10, 20 und 30 min wurden Proben entnommen und mit Hilfe eines denaturierenden PA-Gels analysiert. Zur Kontrolle wurde das *S. coelicolor* Dodecin mit den jeweiligen Chemikalien 30 min bei RT inkubiert und ebenfalls im PA-Gel gelelektrophoretisch analysiert.



**Abbildung 26: Analyse der Proteinstabilitäten von *S. coelicolor* Dodecin nach thermischer und chemischer Behandlung.** *S. coelicolor* Dodecin wurde 30 min bei 95°C mit 2% SDS, 10 mM DTT und 2%  $\beta$ -Mercaptoethanol, sowie 1 mM EDTA und 8 M Harnstoff erhitzt. Als Kontrolle diente *S. coelicolor* Dodecin, welches 30 min bei RT mit der jeweiligen Chemikalie inkubiert wurde. Es wurde jeweils 7,5  $\mu$ g gereinigtes Protein mittels diskontinuierlicher PA-Gelelektrophorese analysiert. (1) *S. coelicolor* Dodecin (Kontrolle) sowie *S. coelicolor* Dodecin nach (2) 10 min, (3) 20 min und (4) 30 min thermischer Behandlung. M: PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Wie aus Abbildung 26 zu erkennen ist, verblieb das dodecamere *S. coelicolor* Dodecin nach 30 min Hitzeeinwirkung unter Behandlung der reduzierenden Chemikalien DTT und  $\beta$ -Mercaptoethanol relativ stabil. Die aggregierten Dodecin-Dodecamere, welche ein MG von ca. 130 kDa bzw. 200-230 kDa aufweisen und in der jeweiligen Kontrollprobe zu erkennen sind, zerfielen bereits nach 10 min Hitzeeinwirkung. Der Anteil des monomeren Dodecins nahm über 30 min Hitzeeinwirkung hierbei nur unmerklich zu. EDTA besaß auf das *S. coelicolor* Dodecin-Dodecamer einen ähnlichen Einfluss, indem die dodecamere Struktur durch den Komplexbildner und die Hitzeeinwirkung nicht mehr destabilisiert wurde als mit DTT oder  $\beta$ -Mercaptoethanol. Harnstoff dagegen ließ das assemblierte Dodecin-Dodecamer nach 10 min zusätzlicher Hitzeeinwirkung fast gänzlich in Monomere zerfallen. Ohne zusätzliche Hitzeeinwirkung blieb die dodecamere Struktur des *S. coelicolor* Dodecins jedoch auch über 30 min vollkommen intakt. Folglich kann geschlossen werden, dass das

*S. coelicolor* Dodecin deutlich thermo- und salzstabiler ist als das *S. davawensis* Dodecin, welches bereits unter normalen denaturierenden Bedingungen (5 min bei 95°C in 2% SDS und 10 mM DTT erhitzt) vollkommen monomer vorliegt (Abb. 25). Nur die chaotrope Substanz Harnstoff zerstört die dodecamere Struktur des *S. coelicolor* Dodecins unter gleichzeitiger Hitzeeinwirkung. Ohne zusätzliches Erhitzen liegt das *S. coelicolor* Dodecin jedoch auch mit 8 M Harnstoff weiterhin als einfaches und z. T. auch als aggregiertes Dodecamer vor.

### 5.1.2.3 Analyse der dodecameren Proteinstruktur von Dodecin anhand von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten

Im *M. tuberculosis* Dodecin wurden in Strukturanalysen drei Salzbrücken identifiziert, die dessen dodecamere Struktur ebenso wie das *S. coelicolor* Dodecin unter Einfluss von Hitze und Salzen stabilisieren (Liu *et al.*, 2011a). Werden die Aminosäuresequenzen von *M. tuberculosis* mit denen von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin verglichen, so unterscheiden sich die Streptomyzeten-Dodecine zu *M. tuberculosis* Dodecin in jeweils einer Aminosäure der Salzbrücken 1 und 2 (Tab. 41). Während in Salzbrücke 2 in beiden Streptomyzeten-Dodecinen Asparaginsäure an Position 69 (D69) durch Glutaminsäure (E69) ausgetauscht ist, ist nur im *S. davawensis* Dodecin Glutaminsäure an Position 10 (E10) der Salzbrücke 1 durch Asparaginsäure (D10) ausgetauscht. Da die *S. coelicolor* und *M. tuberculosis* Dodecin-Dodecamere vergleichsweise stabil sind, wurde angenommen, dass D10 der Salzbrücke 1 des *S. davawensis* Dodecins Grund für die thermische Instabilität des Dodecamers ist.

Um dies zu untersuchen, wurde neben der Aminosäure an Position 10 auch die restliche Aminosäuresequenz des *S. davawensis* Dodecins durch einzelne Punktmutationen der des *S. coelicolor* Dodecins mittels *site-directed* Mutagenese-PCR angepasst. Mit Hilfe dieses Experiments sollten die Aminosäuren identifiziert werden, die an der Strukturgebung und somit am Aufbau der Salzbrücken sowie anderer hydrophober Wechselwirkungen im *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Dodecamer beteiligt sind.

**Tabelle 41: Vergleich der an Salzbrücken beteiligten Aminosäuren in Dodecinen von *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und *S. davawensis*.** Zu *M. tuberculosis* Dodecin unterschiedliche Aminosäuren sind jeweils fett geschrieben. Die Eigenschaften der jeweiligen Dodecin-Dodecamere wurde in thermostabil bzw. -sensitiv und salzstabil eingeteilt.

Organismus	Gen-annotation	Salzbrücke 1	Salzbrücke 2	Salzbrücke 3	Eigenschaft	Literatur
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Rv1498A</i>	E10-K62	R29-D69	E41-R46	thermostabil salzstabil	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
<i>S. coelicolor</i>	<i>SCO0915</i>	E10-K62	R29- <b>E69</b>	E41-R46	thermostabil salzstabil	diese Arbeit
<i>S. davawensis</i>	<i>BN159_1333</i>	<b>D10</b> -K62	R29- <b>E69</b>	E41-R46	thermo-sensitiv	diese Arbeit

Insgesamt wurden zwölf *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten und eine *S. davawensis* Dodecin-Doppelpunktmutante als auch drei *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten und eine zusätzliche *S. coelicolor* Dodecin-Doppelpunktmutante erstellt (Tab. 42). Die Dodecine wurden mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in *E. coli* Rosetta 2(DE3) überproduziert und mittels Ni<sup>2+</sup>-NTA-Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Die Stabilität der Dodecin-Punktmutanten wurde zum einen unter denaturierenden Bedingungen mittels diskontinuierlicher PA-Gelelektrophorese und zum anderen unter nativen Bedingungen mittels Größenausschlusschromatographie und *Blue Native* (BN)-Gelelektrophorese analysiert.

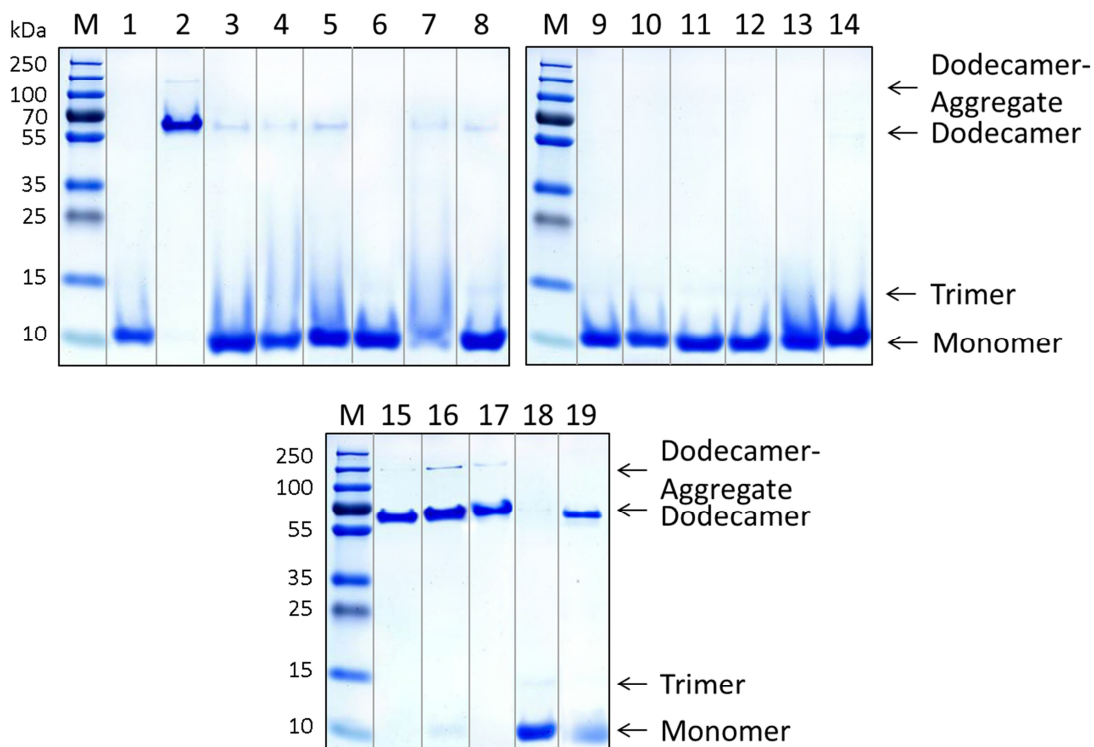
**Tabelle 42: Übersicht der mittels *site-directed* Mutagenese-PCR generierten *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten.** Angegeben sind die jeweiligen Aminosäuremutationen mit entsprechender Kurzschreibweise und putativer Lokalisation bzw. Interaktion der mutierten Aminosäuren im dodecameren Dodecin. Die Interaktions- und Bindungsmöglichkeiten wurden anhand der Dodecin-Kristallstrukturen von *M. tuberculosis* und *T. thermophilus* vorhergesagt. WW: Wechselwirkung.

Dodecin-Spezies	Mutation	Kurzschreibweise	Lokalisation/Interaktion
<i>S. davawensis</i>	D10E	<i>Sdav</i> (D10E)	Aufbau von Salzbrücke 1, WW mit K62
	E17D	<i>Sdav</i> (E17D)	Keine putative WW
	D20E	<i>Sdav</i> (D20E)	Ionenbindung in Kanal 1
	N28T	<i>Sdav</i> (N28T)	Keine putative WW
	H35R	<i>Sdav</i> (H35R)	Coenzym A-Bindung in <i>T. thermophilus</i> (Meissner <i>et al.</i> , 2007)
	N36K	<i>Sdav</i> (N36K)	WW mit D68
	E44Q	<i>Sdav</i> (E44Q)	WW mit R46 in Flavinbindetasche
	N50E	<i>Sdav</i> (N50E)	Keine putative WW
	T60G	<i>Sdav</i> (T60G)	Flavinbindung
	M61L	<i>Sdav</i> (M61L)	Keine putative WW
	K62A	<i>Sdav</i> (K62A)	Aufbau von Salzbrücke 1, WW mit D10, Ionenbindung in Kanal 2
	D68E	<i>Sdav</i> (D68E)	WW mit N36
	D10E/K62A	<i>Sdav</i> (D10E/K62A)	Aufbau der Salzbrücke 1, Ionenbindung in Kanal 2
<i>S. coelicolor</i>	D20E	<i>Scoel</i> (D20E)	Ionenbindung in Kanal 1
	Q44E	<i>Scoel</i> (Q44E)	WW mit R46 in Flavinbindetasche
	K62A	<i>Scoel</i> (K62A)	Aufbau von Salzbrücke 1, WW mit E10, Ionenbindung in Kanal 2
	Q44E/K62A	<i>Scoel</i> (Q44E/K62A)	WW mit R46 in Flavinbindetasche; Aufbau von Salzbrücke 1, WW mit E10, Ionenbindung in Kanal 2



Abbildung 27 zeigt den analytischen Vergleich aller *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten und Wildtyp-Dodecinen mittels diskontinuierlicher PA-Gelelektrophorese. Mit Ausnahme von *Sdav*(D10E) (Probe 2) lagen alle *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten wie auch das *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin vorwiegend monomer vor. *Sdav*(D10E) war ähnlich stabil wie das *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin (Probe 15) und wies einen kleinen Anteil an dodecameren Dodecin-Aggregaten mit einem MG von ca. 130 kDa auf. Minimal stabiler schienen die *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten *Sdav*(E17D) (Probe 3), *Sdav*(D20E) (Probe 4), *Sdav*(N28T) (Probe 5), *Sdav*(N36K) (Probe 7) und *Sdav*(E44Q) (Probe 8), welche zu den Monomeren jeweils noch einen geringen Anteil an Dodecameren aufwiesen. *Sdav*(E44Q) wies darüber hinaus einen geringen Anteil Trimere auf (Probe 8). Die durch die Punktmutation D10E induzierte Proteininstabilität des *S. davawensis* Dodecins wurde durch die weitere Punktmutation K62A in der Dodecin-Doppelpunktmutante *Sdav*(D10E/K62A) (Probe 14) wieder aufgehoben.

Unter den *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten war im Vergleich zum Wildtyp-Dodecin nur *Scoel*(K62A) (Probe 18) deutlich destabilisiert und lag gänzlich monomer vor. Die Proteininstabilität von *Scoel*(K62A) konnte jedoch durch die weitere Punktmutation E44Q in *Scoel*(Q44E/K62A) (Probe 19) aufgehoben werden. Dennoch lag ein geringer Anteil von *Scoel*(Q44E/K62A) weiterhin monomer vor.

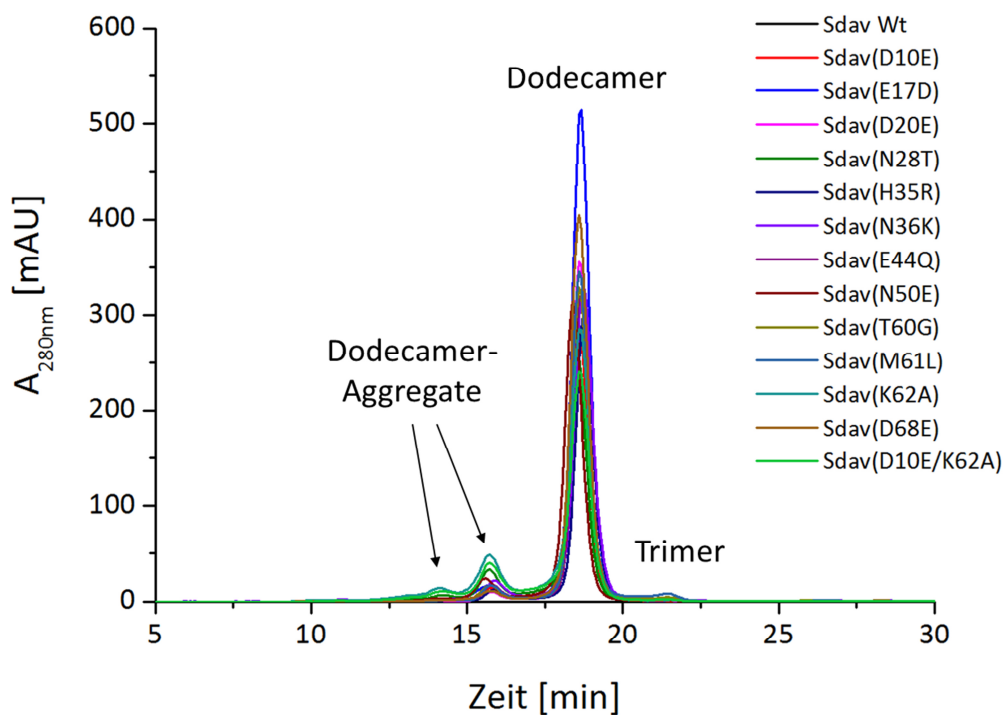


**Abbildung 27: Analyse der Proteininstabilitäten von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten mittels diskontinuierlicher PA-Gelelektrophorese.** Es wurden jeweils 6,75 µg gereinigtes Protein aufgetragen. (1) *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin, *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten (2) *Sdav*(D10E), (3) *Sdav*(E17D), (4) *Sdav*(D20E), (5) *Sdav*(N28T), (6) *Sdav*(H35R), (7) *Sdav*(N36K), (8) *Sdav*(E44Q), (9) *Sdav*(N50E), (10) *Sdav*(T60G), (11) *Sdav*(M61L), (12) *Sdav*(K62A), (13) *Sdav*(D68E), (14) *Sdav*(D10E/K62A), (15) *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin, *S. coelicolor* Dodecin Punktmutanten (16) *Scoel*(D20E), (17) *Scoel*(Q44E), (18) *Scoel*(K62A), (19) *Scoel*(Q44E/K62A). M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).



Zur nativen Analyse der *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten wurde zunächst die Größenausschlusschromatographie angewendet, bei der Proteine oder Proteinkomplexe ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts der Größe nach von einer Säulenmatrix eluiert werden. Zur Analyse wurden jeweils 0,5 mg gereinigtes Protein in Dodecin-Puffer pH 7,5 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min (*S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten) bzw. 0,75 ml/min (*S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten) mit einer Superdex200 Increase 10/300 Säule analysiert. Als Größenstandard diente eine Mischung aus Proteinen bekannter Größen zwischen 6,5 kDa und 465 kDa. In beiden Analysen sind unterschiedliche Protein-*Peak*-Höhen auf Ungenauigkeiten bei der Proteinkonzentrationsbestimmung mittels Bradford zurückzuführen.

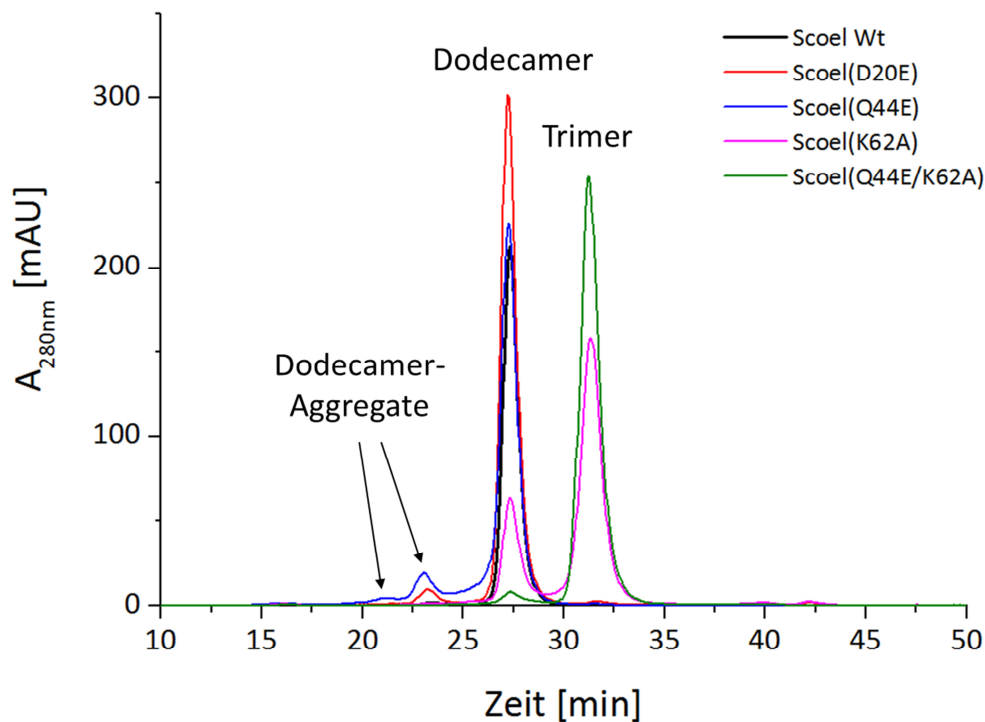
Wie aus Abbildung 28 zu erkennen ist, wiesen alle *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten die gleichen Dodecin-Multimere auf, wie sie auch für das *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin detektiert wurden. Der Großteil der Dodecine eluierte als Dodecamer, während nur ein geringer Anteil als Trimere und als aggregierte Dodecamere eluierte.



**Abbildung 28: Native Analyse der Proteinstabilitäten von *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten mittels Größenausschlusschromatographie.** Als Kontrolle diente das *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin. Es wurden jeweils 0,5 mg gereinigtes Protein in Dodecin-Puffer pH 7,5 bei einer Flussrate von 0,75 ml/min mit einer Superdex200 Increase 10/300 SEC-Säule (GE Healthcare) im Vergleich zum *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin (Sdav Wt) analysiert.

Das *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin sowie die *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten *Scoel*(D20E) und *Scoel*(Q44E) eluierten in der Größenausschlusschromatographie ebenfalls wie die *S. davawensis* Dodecine vorwiegend als Dodecamere (Abb. 29). Nur ein geringer Anteil der Dodecamere war zu größeren Proteinkomplexen aggregiert. Im Gegensatz hierzu waren die *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten *Scoel*(K62A) und *Scoel*(Q44E/K62A) ebenso wie unter denaturierenden Bedingungen (Abb. 27) stark destabilisiert und eluierten vorwiegend als Trimere. Interessanterweise war das

Stabilitätsverhältnis beider Dodecin-Mutanten genau umgekehrt wie unter denaturierenden Bedingungen. In der Größenausschlusschromatographie lag etwa ein Drittel von *Scoel*(K62A) als Dodecamer vor, während die Punktmutante unter denaturierenden Bedingungen vollkommen monomerisiert war. Im Gegensatz dazu war *Scoel*(Q44E/K62A) unter denaturierenden Bedingungen deutlich als Dodecamer stabilisiert, während die Doppelpunktmutante in der Größenausschlusschromatographie fast vollkommen als Trimer eluiert wurde.



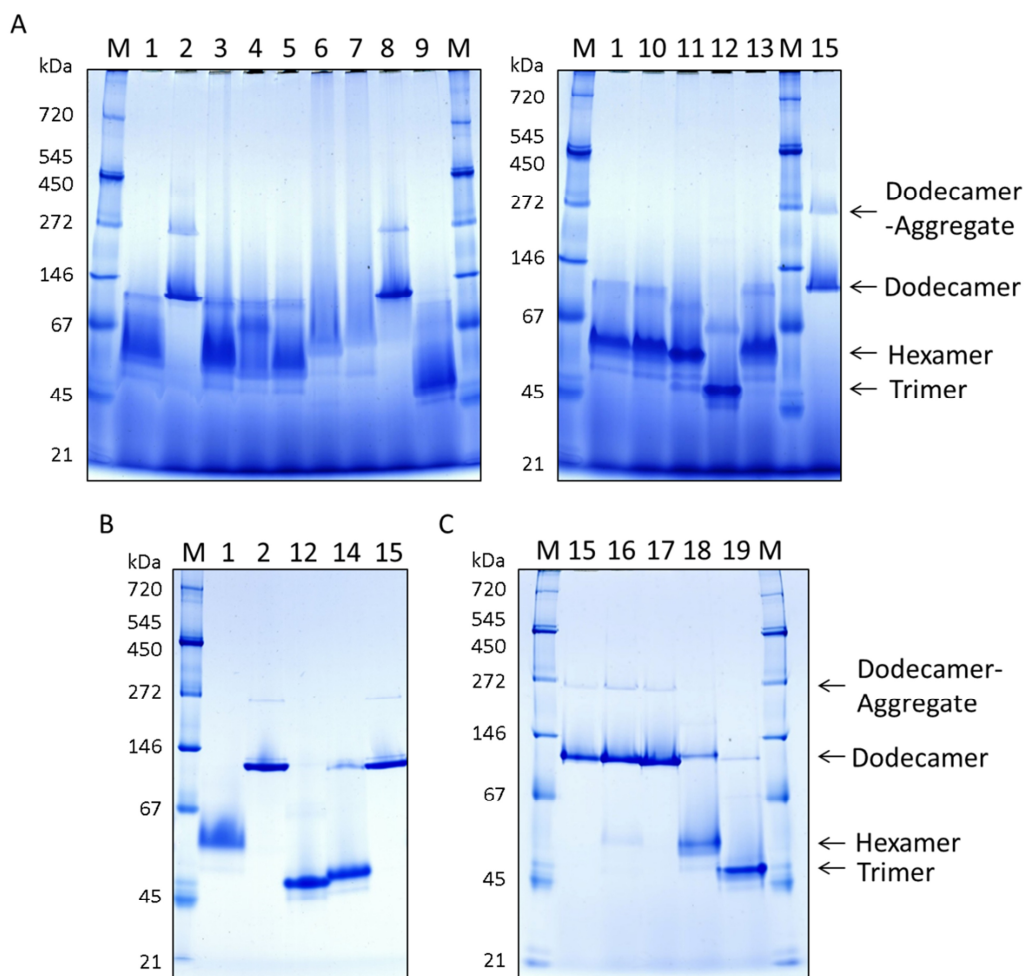
**Abbildung 29: Native Analyse der Proteinstabilitäten von *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten mittels Größenausschlusschromatographie.** Als Kontrolle diente das *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin. Es wurden jeweils 0,5 mg gereinigtes Protein in Dodecin-Puffer pH 7,5 bei einer Flussrate von 0,5 ml/min mit einer Superdex200 Increase 10/300 SEC-Säule (GE Healthcare) im Vergleich zum *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin (Scoel Wt) analysiert.

Die native Analyse von Proteinen mittels BN-Gelelektrophorese erfolgt ebenfalls wie bei einer Größenausschlusschromatographie durch das MG der Proteine bzw. Proteinkomplexe. Der den Proben zugesetzte Farbstoff Coomassie G-250 lädt hierbei Proteine unter Beibehaltung ihrer Proteinstruktur negativ, die letztendlich unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt bei physiologischem pH-Wert in einem elektrischen Feld zur Anode wandern.

Interessanterweise wiesen hierbei besonders die *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten mit Hilfe dieser nativen Analyseverfahren andere Multimere auf als mittels Größenausschlusschromatographie (Abb. 30, A und B). Von allen *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten waren nur *Sdav*(D10E) (Probe 2) und *Sdav*(E44Q) (Probe 8) wie das *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin (Probe 15) deutlich als Dodecamer stabilisiert. Die restlichen *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten lagen vorwiegend teils hexamer und dodecamer vor. Eine Ausnahme bildete neben der erwarteten und völlig destabilisierten Punktmutante *Sdav*(K62A) (Probe 12) die Punktmutante *Sdav*(N50E)

(Probe 9), die ebenfalls größtenteils als Trimer aufgetrennt wurde. Wie bereits mit Hilfe der diskontinuierlichen PA-Gelelektrophorese gezeigt, war *Sdav*(D10E/K62A) im Vergleich zu *Sdav*(D10E) instabiler und lag größtenteils trimer und nur noch zu einem geringen Anteil dodecamer vor (Abb. 30, C, Probe 14).

Die *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten *Scoel*(D20E) (Probe 16) und *Scoel*(Q44E) (Probe 17) liefen wie das *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin vorwiegend als Dodecamer bei einem MG von ca. 120 kDa. Das in der Ionenbindung mutierte Dodecin *Scoel*(D20E) schien minimal destabilisiert und lag zu einem geringen Anteil hexamer vor. *Scoel*(K62A) (Probe 18) war, wie bereits mit anderen Analysemethoden gezeigt, sehr destabilisiert und lag vorwiegend hexamer vor. Die Doppelpunktmutante *Scoel*(Q44E/K62A) (Probe 19) wies, wie auch in der Größenausschlusschromatographie, eine noch höhere Proteininstabilität auf und wurde hauptsächlich als Trimer aufgetrennt.



**Abbildung 30: Native Analyse der Proteinstabilitäten von *S. davawensis* (A, B) und *S. coelicolor* (C) Dodecin-Punktmutanten mittels Blue Native-Gelelektrophorese.** Als Kontrolle dienen jeweils die Streptomyzeten Wildtyp-Dodecine. Es wurden jeweils 6,75  $\mu$ g gereinigtes Protein aufgetragen. (1) *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin, *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten (2) *Sdav*(D10E), (3) *Sdav*(E17D), (4) *Sdav*(D20E), (5) *Sdav*(N28T), (6) *Sdav*(H35R), (7) *Sdav*(N36K), (8) *Sdav*(E44Q), (9) *Sdav*(N50E), (10) *Sdav*(T60G), (11) *Sdav*(M61L), (12) *Sdav*(K62A), (13) *Sdav*(D68E), (14) *Sdav*(D10E/K62A), (15) *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin, *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutanten (16) *Scoel*(D20E), (17) *Scoel*(Q44E), (18) *Scoel*(K62A), (19) *Scoel*(Q44E/K62A). M: Nativer Proteinmarker (Serva).

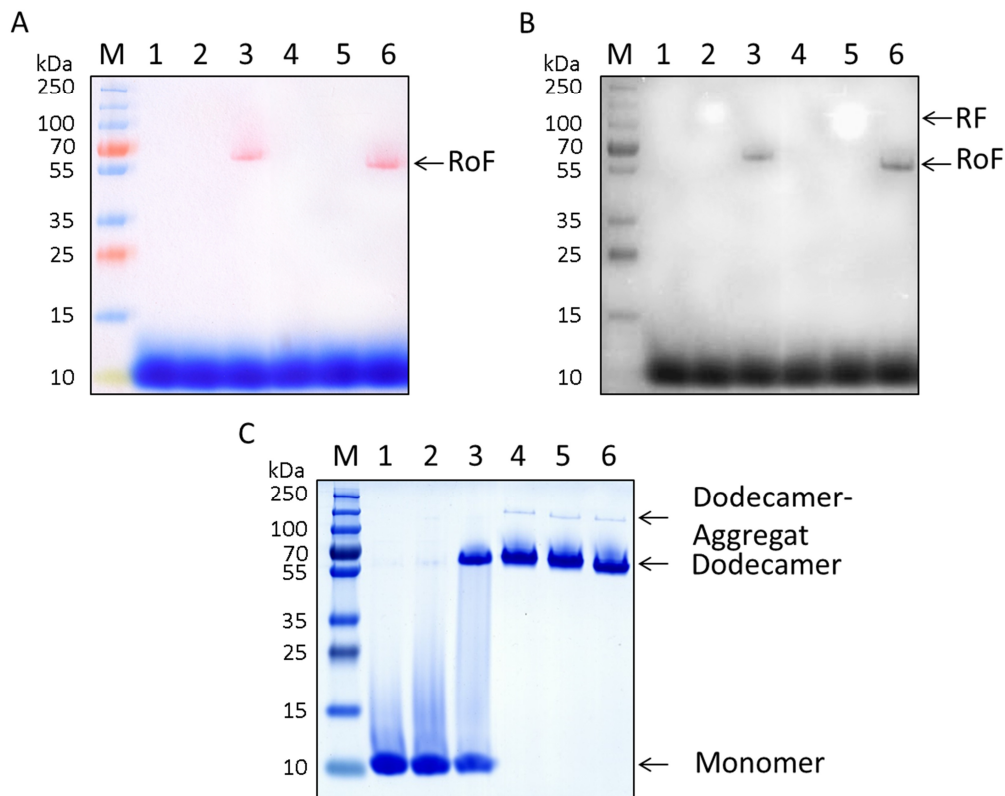
Aus den Stabilitätsanalysen der Streptomyzeten-Dodecin-Punktmutanten kann demnach geschlossen werden, dass hauptsächlich E10 der Salzbrücke 1 dem *S. coelicolor* Dodecin die entscheidende Thermostabilität verleiht. Q44 verleiht dem *S. coelicolor* Dodecin gegenüber dem *S. davawensis* Dodecin ebenfalls eine höhere Proteinstabilität. Diese durch Q44 aufgebaute Wechselwirkung scheint jedoch gegenüber Hitze sensitiver zu sein, was durch die *S. davawensis* Dodecin-Punktmutante *Sdav*(E44Q) gezeigt wurde. Alle anderen Aminosäuren, die im *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin unterschiedlich zueinander sind, besitzen nur geringe Effekte auf die dodecamere Proteinstruktur und deren Stabilität.

#### 5.1.2.4 Roseoflavin stabilisiert die dodecamere Struktur des *S. davawensis* Dodecins unter denaturierenden Bedingungen

Da das *S. davawensis* und *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin unter nativen und denaturierenden Bedingungen sehr unterschiedlich stabile Multimere bilden, wurde im Folgenden untersucht, ob sich auch die flavinbindenden Eigenschaften beider Streptomyzeten-Dodecine bezüglich der Multimerisierung unterscheiden. Aufgrund dessen, dass *S. davawensis* im Gegensatz zu *S. coelicolor* ein natürlicher Produzent des RF-Analogons RoF ist, wurde vermutet, dass RoF vom *S. davawensis* Dodecin möglicherweise affiner gebunden wird als vom *S. coelicolor* Dodecin. Um dies zu untersuchen, wurden beide Streptomyzeten-Dodecine *in vitro* mit einem fünffach molaren Überschuss an RoF bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Streptomyzeten-Dodecine ohne Flavin als auch mit einem fünffach molaren Überschuss an RF inkubiert. RF sollte laut Literatur von bakteriellen Dodecinen weniger affin gebunden werden (Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a).

Die Proben wurden in nativem Protein-Probenpuffer und ohne vorherige thermische Behandlung mit Hilfe eines PA-Gels in SDS-haltigem Laufpuffer gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Dokumentation des PA-Gels erfolgte unter VIS- sowie UV-Licht.

Wie aus Abbildung 31 A und B zu erkennen ist, war RoF in Proben mit *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin als deutlich definierte Bande auf Höhe des dodecameren Dodecins mit einem MG von ca. 65 kDa zu erkennen. RF, welches nur unter UV-Licht deutlich sichtbar wurde, war nur als diffuse Bande oberhalb der RoF-Bande zu detektieren. Interessanterweise zeigte das mittels Coomassie Brilliant Blau gefärbte PA-Gel (Abb. 31, C), dass RoF zu einer signifikanten Assemblierung der *S. davawensis* Dodecin-Monomere führte und etwas mehr als die Hälfte dodecamer vorlag. RF bewirkte diesen Effekt nicht. Die RoF-Bande als auch das *S. davawensis* Dodecin-Dodecamer überlagerten sich im PA-Gel, was auf eine Bindung von RoF schließen lässt. Das *S. coelicolor* Dodecin zeigte im Vergleich zu vorherigen Versuchen keine veränderte Proteinstabilität und lag vorwiegend dodecamer und teils als Dodecamer-Aggregate vor. Dennoch überlagerten sich im PA-Gel auch hierfür nur die RoF-Bande mit der Proteinbande des Dodecamers. Folglich wurde RoF gegenüber RF bevorzugt von beiden Streptomyzeten-Dodecinen auch unter leicht abgeschwächten denaturierenden Bedingungen gebunden. RoF scheint hierbei jedoch besonders auf das *S. davawensis* Dodecin eine stark stabilisierende Wirkung zu besitzen.



**Abbildung 31: Analyse der Proteinstabilität von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin nach Zugabe von Riboflavin und Roseoflavin mittels Gelelektrophorese.** Zur Analyse wurden jeweils 50  $\mu\text{M}$  gereinigtes Dodecin mit 250  $\mu\text{M}$  RF und RoF *in vitro* 15 min lang und bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Als Kontrolle diente jeweils Dodecin ohne Zugabe von RF bzw. RoF. Die Analyse erfolgte mittels Gelelektrophorese in einem PA-Gel und SDS-haltigem Laufpuffer. Die Proben wurden hierzu mit nativem Probenpuffer versetzt. Die Dokumentation des PA-Gels erfolgte (A) unter VIS-Licht, (B) unter UV-Licht und (C) nach Färbung mit Coomassie Brilliant Blau. *S. davawensis* Dodecin (1) ohne Flavin, (2) mit RF, (3) mit RoF und *S. coelicolor* Dodecin (4) ohne Flavin, (5) mit RF, (6) mit RoF. M = PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

#### 5.1.2.5 *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin binden neben FMN und RoF auch RoFMN

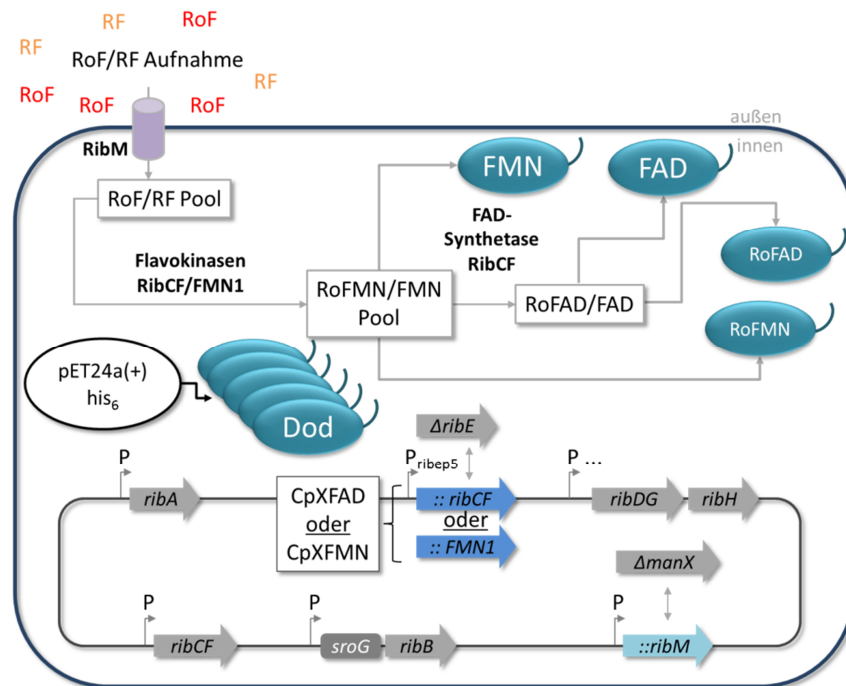
Mit Hilfe von *in vitro*-Untersuchungen konnte bisher gezeigt werden, dass die heterolog produzierten und gereinigten *S. davawensis* und *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecine RoF binden (Kapitel 5.1.2.4). *In vivo*-Untersuchungen zeigten aber auch, dass *S. davawensis* Dodecin unter physiologischen Bedingungen bevorzugt FMN bindet (Kapitel 5.1.1.7). Zum einen stellte sich daher die Frage, ob die Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD möglicherweise ebenfalls von beiden Streptomyzeten-Dodecinen gebunden werden. Zum anderen sollte geklärt werden, welche Flavine *S. davawensis* bzw. *S. coelicolor* Dodecin im Vergleich affiner binden, wenn RF und RoF als auch deren Cofaktoren im Überschuss angeboten werden. Um dies zu untersuchen, wurden beide Streptomyzeten-Dodecine mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag in den *E. coli*-Stämmen CpXFMN und CpXFAD heterolog überproduziert, welche es ermöglichen, Flavoproteine *in vivo* mit Flavinen zu beladen (Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Durch zusätzliche Genkopien eines RF-Transporters sowie einer Flavokinase bzw. FAD-Synthetase in den *E. coli*-Stämmen können die intrazellulären Konzentrationen von FMN und FAD bzw. RoFMN und RoFAD nach Zugabe von RF und RoF in das Nährmedium stark erhöht werden. Ein



Übersichtsschema zur *in vivo*-Flavinbeladung von Dodecin in den Stämmen *E. coli* CpXFMN und CpXFAD ist in Abbildung 32 dargestellt.

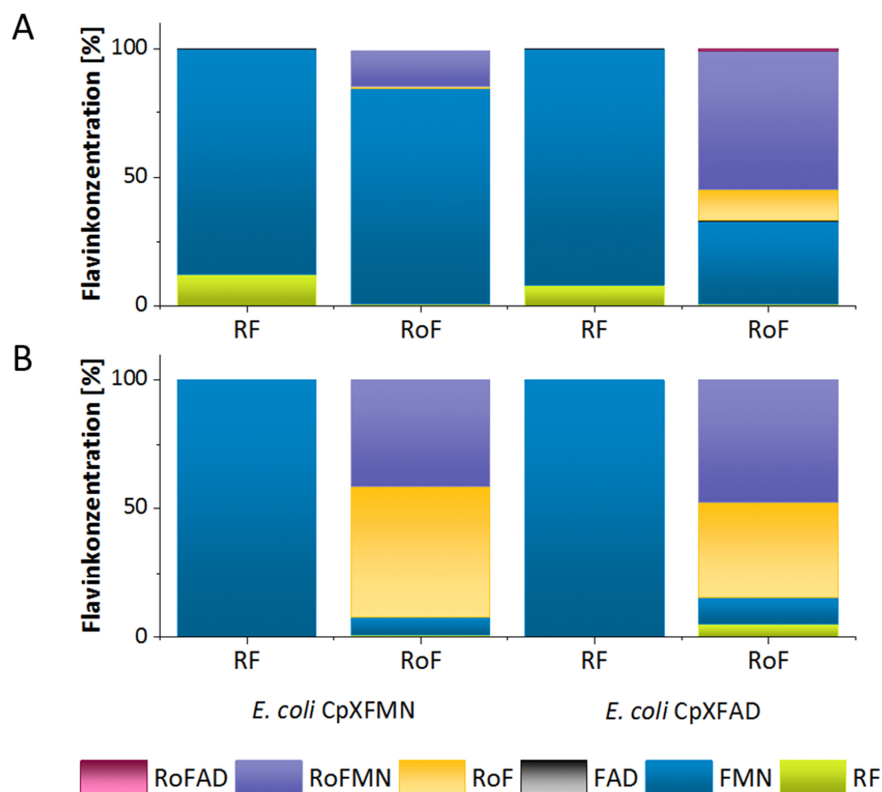
Die heterologe Überproduktion der Streptomyzeten-Dodecine in *E. coli* CpXFMN und CpXFAD erfolgte in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  RoF. Da laut Literatur bakterielle Dodecine bevorzugt FMN binden (Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a), wurden *E. coli* CpXFMN und CpXFAD zur Kontrolle ebenfalls jeweils mit 50  $\mu\text{M}$  RF gefüttert. Die Eluatfraktionen der mittels Affinitätschromatographie und bis zur apparenten Homogenität gereinigten Dodecine wiesen bereits gelbliche und rötliche Färbungen auf (nicht gezeigt). Die Proteinproben wurden mit 10% TCA gefällt und die Flavine sowie deren Konzentrationen mittels HPLC bestimmt.

Abbildung 33 zeigt die prozentuale Verteilung der von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecin gebundenen Flavine, für deren Berechnung die Gesamtkonzentration aller gemessenen Flavine einer Probe als 100% festgesetzt wurde. Tabelle 43 fasst die dazugehörigen und detaillierten Ergebnisse der Konzentrationen der angereicherten Proteinlösungen sowie der gemessenen Flavinkonzentrationen zusammen.



**Abbildung 32:** Schematische Übersicht von *E. coli* CpXFMN und CpXFAD zur *in vivo*-Generierung von flavinbeladenem *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin (Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Die Gene der Streptomyzeten-Dodecine werden mit Hilfe des Expressionsplasmids pET24a(+) überproduziert. Bei Induktion der Genexpression wird dem Wachstumsmedium RF oder RoF zugegeben, die über den Flavintransporter RibM aus *Corynebacterium glutamicum* (Mathes *et al.*, 2009) aufgenommen werden. Das Gen *ribM* wurde hierbei durch das Gen des natürlichen Mannosetransporters *manX* ausgetauscht. Die flavinbindenden Dodecine werden über einen C-terminalen His<sub>6</sub>-Tag durch Affinitätschromatographie gereinigt und deren gebundene Flavine mittels HPLC/MS analysiert. Die Gene *ribA*, *ribDG*, *ribH* und *ribB* kodieren RF-Biosynthesenzyme (Jankowitsch *et al.*, 2012). Das Gen *ribB* wird hierbei durch den FMN-RNA-Schalter *sroG* reguliert. *E. coli* CpXFMN besitzt anstelle von *ribE* eine Kopie des Gens *FMN1* aus *Schizosaccharomyces pombe* (Plumbridge, 1998) unter Kontrolle des  $\sigma$ 70-abhängigen *ribEp5*-Promotors (Keseler *et al.*, 2013), *E. coli* CpXFAD eine zusätzliche Kopie des *E. coli* Gens *ribCF*.

Die Proteinlösungen aller Proben konnten auf Konzentrationen zwischen 0,3 mM und 1,7 mM konzentriert werden. Die Kontrollversuche mit RF-gefütterten *E. coli*-Zellen zeigten, dass FMN und nicht RF oder FAD bevorzugt von den bakteriellen Streptomyzeten-Dodecinen gebunden werden, was auch bereits für das *S. davawensis* Dodecin in Kapitel 5.1.1.7 gezeigt werden konnte. Während *S. coelicolor* Dodecin zu jeweils 100% mit FMN beladen war, betrug der Anteil an gebundenem FMN für das *S. davawensis* Dodecin 88% bzw. 92% und der von RF 8% bzw. 12%. In Anwesenheit von RoF und den Cofaktoranaloga RoFMN und RoFAD scheint *S. coelicolor* Dodecin im Gegensatz zum *S. davawensis* Dodecin mit etwa gleicher Affinität bevorzugt RoF und RoFMN, weniger jedoch RF bzw. FMN und so gut wie gar nicht FAD bzw. RoFAD zu binden. Das Dodecin des RoF-sensitiven *S. coelicolors* war jeweils zu etwa gleichen Teilen mit RoF (50% bzw. 37%) und RoFMN (42% bzw. 48%) beladen. FMN und RF waren nur mit 7% und 11% bzw. 1% und 5% gebunden. *S. davawensis* Dodecin war auch in Anwesenheit von RoF, RoFMN und RoFAD zu mindestens 30% mit FMN (33% bzw. 84%) beladen. Die Affinität des *S. davawensis* Dodecins zu RoFMN ist im Gegensatz zum *S. coelicolor* Dodecin vergleichsweise jedoch höher als zu RoF. *S. davawensis* Dodecin war nur mit 1-12% RoF beladen, während der prozentuale Anteil an RoFMN 14% bzw. 53% betrug.



**Abbildung 33: Prozentuale Verteilung der von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin gebundenen Flavine nach heterologer Überproduktion in den *E. coli*-Stämmen CpXFMN und CpXFAD.** Die Streptomyzeten-Dodecine wurden unter Zugabe von 50  $\mu$ M Riboflavin (RF) bzw. Roseoflavin (RoF) in LB-Medium überproduziert und mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dodecin wurde mit 10% TCA gefällt und die gebundenen Flavine sowie deren Konzentrationen mittels HPLC bestimmt. Die Gesamtkonzentration aller gemessenen Flavine wurde als 100% festgesetzt und die prozentualen Anteile der einzelnen Flavine darauf berechnet. (A) Prozentuale Verteilung der von *S. davawensis* Dodecin gebundenen Flavine, (B) prozentuale Verteilung der von *S. coelicolor* Dodecin gebundenen Flavine.

**Tabelle 43: Ergebnisse der Flavinanalyse des zur *in vivo*-Flavinbeladung in *E. coli* CpXFMN und *E. coli* CpXFAD überproduzierten *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecins nach Wachstum in Riboflavin (RF) und Roseoflavin (RoF) angereichertem Nährmedium.** Angegeben sind die *E. coli*-Produktionsstämme, die zugesetzten Flavine, die Konzentrationen der angereicherten Dodecine ( $C_{\text{Dodecin}}$ ) nach Reinigung mittels Affinitätschromatographie sowie die nach Proteinfällung und HPLC-Analyse gemessenen Mengen der vom jeweiligen Streptomyzeten-Dodecin gebundenen Flavine.

Expressionsstamm	Flavin	$C_{\text{Dodecin}}$ [μM]	RF [μM]	FMN [μM]	FAD [μM]	RoF [μM]	RoFMN [μM]	RoFAD [μM]
<i>S. davawensis</i> Dodecin								
<i>E. coli</i> CpXFMN	RF	366	10,3	72,3	0,0	0,0	0,0	0,0
	RoF	567	0,1	6,5	0,0	0,1	1,1	0,0
<i>E. coli</i> CpXFAD	RF	300	11,1	124,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	RoF	550	0,1	5,8	0,0	2,2	9,6	0,2
<i>S. coelicolor</i> Dodecin								
<i>E. coli</i> CpXFMN	RF	440	0,0	0,4	0,0	0,0	0,0	0,0
	RoF	661	0,7	4,8	0,0	34,9	29,0	0,0
<i>E. coli</i> CpXFAD	RF	1160	0,0	148,6	0,0	0,0	0,0	0,0
	RoF	1730	1,7	3,6	0,0	12,8	16,6	0,0

#### 5.1.2.6 Kristallstruktur von *S. davawensis* Dodecin

Aus vorherigen Versuchen dieser Arbeit ging hervor, dass das *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin trotz hoher Affinität zu FMN und RoFMN (Kapitel 5.1.2.5) *in vitro* in besonderer Weise durch RoF jedoch nicht durch RF in seiner multimeren Struktur stabilisiert wurde (Kapitel 5.1.2.4). Da sich RoF und RoFMN von RF und FMN nur durch eine zusätzliche Dimethylaminogruppe am C(8)-Atom unterscheiden, wurde vermutet, dass diese möglicherweise bei Bindung der Flavine zur Stabilisierung des Dodecamers beiträgt.

Um dies zu untersuchen, sollten Proben von *S. davawensis* Dodecin kristallisiert werden, welches in den Stämmen *E. coli* CpXFMN und CpXFAD *in vivo* mit RoF bzw. RoFMN beladen wurde (Kapitel 5.1.2.5). Zuvor wurden freies bzw. nicht gebundenes Flavin über Größenausschlusschromatographie entfernt. Die Proteinkristallisation und Auflösung der Kristallstruktur wurden am Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Frankfurt am Main, durchgeführt. Ein leicht rosa gefärbter Kristall von kompakter, aber nicht kubischer Form wurde zur Aufklärung der Proteinkristallstruktur von *S. davawensis* Dodecin verwendet und mit einer Auflösung von 2,5 Å bestimmt. Die Aufklärung erfolgte durch Abgleich mit bekannten Proteinstrukturen von *H. salinarum* (PDB 1MOG), *M. tuberculosis* (PDB 2YIZ) und *T. thermophilus* (PDB 2V18) Dodecin. Trotz der Rosafärbung war in der Proteinstruktur weder RoF noch RoFMN zu erkennen. *In vitro-soaking*-Experimente von *S. davawensis* Dodecin-Kristallen mit RoF lieferten ebenfalls keine Kristallstrukturen, in denen RoF gebunden war. Es war deshalb in dieser Arbeit nicht möglich, anhand von Kristallstrukturen des *S. davawensis* Dodecins mit gebundenem RoF bzw. RoFMN eine Erklärung für den Dodecamer-stabilisierenden Effekt zu erhalten.

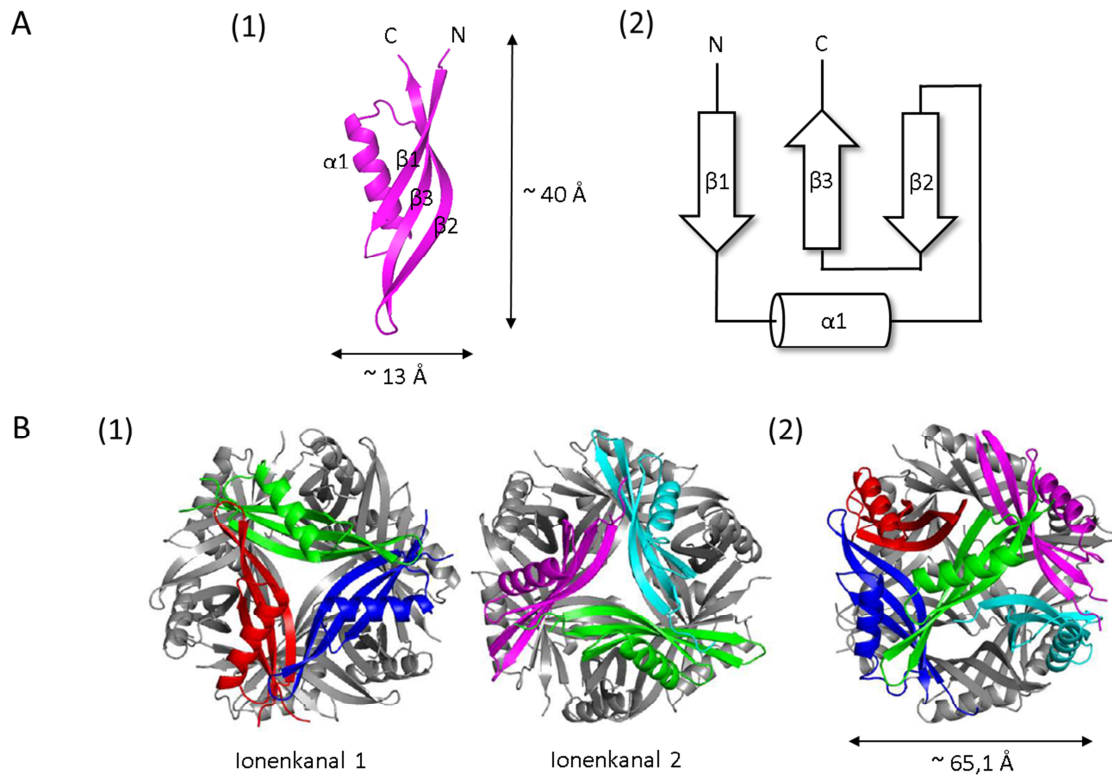
Die Strukturanalysen zeigten jedoch, dass sich *S. davawensis* Dodecin nicht sehr von anderen bekannten Dodecinen unterscheidet und ebenfalls die für Dodecine konservierte  $\beta_1\alpha\beta_2\beta_3$ -Topologie aufweist (Abb. 34, A). Die Monomere sind in Trimere angeordnet, wobei vier Trimere das hohlkugelförmige Dodecamer aufbauen. Die Trimere bilden dabei jeweils einen Kanal ins Innere des Dodecamers, welcher



höchstwahrscheinlich wie in *M. tuberculosis* durch ein Ion verschlossen wird (Liu *et al.*, 2011a), so dass kleinere Moleküle nicht ins Innere des Proteins gelangen können. Die Trimere ordnen sich dabei so an, dass pro Dodecamer entweder viermal der Typ des Ionenkanals 1 (K1) oder des Ionenkanals 2 (K2) gebildet wird (Abb. 34, B.1). Beide Typen der Trimere K1 und K2 sind in einem Dodecamer nicht möglich, da sich die K1-Trimere und K2-Trimere jeweils ein Monomer teilen (Abb. 34, B.2, Monomer grün dargestellt). Ohne Betrachtung von gebundenen Liganden ist das K1-Trimer im *S. davawensis* Dodecin ebenso wie im *M. tuberculosis*, *T. thermophilus* und *H. salinarum* Dodecin stabiler als das K2-Trimer.

Obwohl das *S. davawensis* Dodecin in der Größenausschlusschromatographie als Dodecamer eluiert wurde (Abb. 28), zeigten die denaturierenden PA-Gele, dass es sehr viel instabiler als das *S. coelicolor* Dodecin ist (Abb. 25). Da die Kristallstruktur des *S. coelicolor* Dodecins bisher jedoch noch nicht veröffentlicht wurde, wurde die des *M. tuberculosis* Dodecins aufgrund ähnlicher stabiler Eigenschaften und der Zugehörigkeit zur Ordnung *Actinomycetales* für vergleichende *in silico*-Analysen herangezogen. Zunächst wurde die Oberflächenpolarität des *S. davawensis* und *M. tuberculosis* Dodecins miteinander verglichen, die mit der *rolling ball*-Methode der Software Pymol berechnet wurde. Hierfür wurde der Anteil polarer H-Atome, N-Atome und O-Atome an der Oberfläche der Dodecin-Dodecamere mit einem Ballradius von 2,9 Å bestimmt. Dieser betrug für das *S. davawensis* Dodecin-Dodecamer 69% und für das *M. tuberculosis* Dodecin 57%. Die Proteinoberfläche des *S. davawensis* Dodecins ist demnach etwas polarer als die des *M. tuberculosis* Dodecins. Da die dodecamere Struktur des *M. tuberculosis* Dodecins ebenfalls durch die Bindung von Flavinen stabilisiert wird (Liu *et al.*, 2011a), wurden die K1-Trimere beider Dodecine miteinander verglichen. Asparaginsäure an der Position 20 (D20) ist in *M. tuberculosis* Dodecin an der Ionenbindung von Natrium beteiligt. Während der Abstand von D20 zum Zentrum von K1 im *M. tuberculosis* Dodecin durchschnittlich 5,09 Å beträgt, ist dieser in *S. davawensis* Dodecin größer und beträgt durchschnittlich 6,02 Å (Tab. 44). Die Ionenbindung könnte hierdurch folglich möglicherweise geschwächt oder gestört sein.

Weiterhin sind in *S. davawensis* Dodecin die flavinbindenden Aminosäuren H4, Y6, D38, W39, R46, Q58, T60 und R66 mit denen des *M. tuberculosis* Dodecins zu 100% identisch, weshalb *S. davawensis* Dodecin ähnliche flavinbindende Eigenschaften haben sollte. FMN sollte in *si-si*-Orientierung gebunden werden, indem das Isoalloxazin-Ringsystem von W39 des einen Monomers in Trimer 1 über  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkungen gehalten wird. Über Wasserstoffbrücken zu N(5) bzw. zur Carbonylgruppe und dem Wasserstoff von N(3) wird das Isoalloxazin-Ringsystem darüber hinaus von den Aminosäuren R46 und Q58 des zweiten Monomers in Trimer 1 gebunden. H4, Y6, D38 und R66 des ersten Monomers in Trimer 1 binden den Phosphoribitylrest von FMN über Wechselwirkungen des Phosphats.



**Abbildung 34: Proteinkristallstruktur des *S. davawensis* Dodecins.** (A) *S. davawensis* Monomer, (1) *cartoon*-Darstellung der Struktur, (2) Topologie. (B) *Cartoon*-Darstellung der zwei möglichen Trimere (1) mit Ionenkanal 1 und Ionenkanal 2 sowie (2) im Dodecamer angeordnet. K1-Trimer und K2-Trimer teilen sich ein Monomer, welches grün dargestellt ist.

**Tabelle 44: Abstände des ionenbindenden D20 eines jeden Monomers zum Zentrum des Ionenkanals 1 innerhalb eines Trimers von *S. davawensis* und *M. tuberculosis* Dodecin.** Die Abstände von D20 zu den Ionenkanälen K1 der in den Dodecinen vorhandenen vier Trimern (K1-Trimer 1-4) wurden mit Hilfe des Programms Pymol bestimmt.

	<i>S. davawensis</i> [Å]	<i>M. tuberculosis</i> [Å]
K1-Trimer 1	5,73	4,98
	6,22	4,98
	6,11	4,98
K1-Trimer 2	6,43	5,17
	5,86	5,06
	5,76	5,14
K1-Trimer 3	6,11	5,17
	5,86	5,06
	5,76	5,14
K1-Trimer 4	5,73	5,14
	6,22	5,17
	6,43	5,06
<b>Durchschnittlich</b>	<b>6,02</b>	<b>5,09</b>

## 5.2 Die Interaktion von Enzymen der Roseoflavinbiosynthese in *S. davawensis*

*S. davawensis* ist neben *S. cinnabarinus* das einzig bekannte Bakterium, welches das Antibiotikum RoF synthetisiert (Jankowitsch *et al.*, 2012). Der erste Schritt der Biosynthese wird durch eine 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphatsynthase (RosB) katalysiert, welche FMN zu 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphat (AFP) umsetzt (Schwarz *et al.*, 2016). Das Enzym RibC katalysiert dabei die Umwandlung von Riboflavin (RF) in FMN. Eine noch nicht identifizierte Phosphatase dephosphoryliert AFP zu 8-Demethylamino-8-amino-riboflavin (AF), welches anschließend von der Dimethyltransferase RosA in Roseoflavin (RoF) umgewandelt wird (Jankowitsch *et al.*, 2011). RoF ist ein sekundäres Metabolit und wird in der stationären Wachstumsphase gebildet. Da das RF-Derivat FMN die direkte Vorstufe von AFP ist, sollte eine mögliche Interaktion der beteiligten Enzyme des Primär- und Sekundärmetabolismus untersucht werden. Die räumliche Nähe der Flavinstoffwechsellzyme würde eine schnelle Weitergabe von Intermediaten zwischen den aktiven Zentren der Enzyme ermöglichen (*substrate channeling*) und zudem eine Anhäufung möglicherweise toxischer Intermediate vermeiden.

In einem zweiten Teilprojekt dieser Arbeit sollten daher verschiedene *in vitro*- als auch *in vivo*-Methoden angewendet werden, um mögliche Protein-Protein-Interaktionen (PPI) der Flavinstoffwechsellzyme nachweisen zu können. Zum Nachweis von PPI *in vitro* wurde daher der sogenannte *pull-down*-Versuch angewendet. Diese Methode eignet sich zum anfänglichen *screening* unbekannter PPI oder zur Bestätigung von PPI, die bereits durch andere PPI-Analysen gezeigt wurden. Hierfür wird das Köderprotein über einen Fusionstag an eine Bindungsmatrix immobilisiert und mit Rohextrakt einer Zellkultur inkubiert (siehe u. a. Abb. 7). Um die PPI der Flavinstoffwechsellzyme *in vivo* zu untersuchen, wurde zum einen das *strep-tag-protein-interaction-experiment* (SPINE) und zum anderen die *tandem affinity purification* (TAP) angewendet (Rigaut *et al.*, 1999; Puig *et al.*, 2001; Herzberg *et al.*, 2007) (siehe u. a. Abb. 6 und Abb. 8).

Die in dieser Arbeit für den *pull-down*-Versuch verwendeten Köderproteine wurden mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag heterolog in *E. coli* Rosetta 2(DE3) überproduziert und mittels Affinitätschromatographie aus zellfreiem Extrakt bis zur apparenten Homogenität gereinigt. Als Kontrollversuch wurde jeweils ungekoppelte Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose mit der Hälfte des jeweiligen Rohextraktes inkubiert, um unspezifisch an die Bindungsmatrix bindende Proteine von denen an das Köderprotein spezifisch bindende Proteine zu unterscheiden. Zu *in vivo*-Untersuchungen mittels SPINE und TAP wurden die Gene der Köderproteine entweder in den Vektor pSET152 (native Genexpression) oder in den Expressionsvektor pIJ6902 (Proteinüberproduktion mittels Thiostrepton-induzierbarem *tipA*-Promotor) eingefügt. Die Nukleotidsequenz des *Strep-Tag*<sup>®</sup> II wurde anschließend über eine Linker-Sequenz C-terminal an die Gene der Köderproteine ligiert. Für den TAP-Versuch wurde ein modifiziertes TAP-Tag verwendet, das zur Reinigung von Proteinkomplexen aus GC-reichen Bakterien geeignet ist (Pimentel-Schmitt, 22.01.2007). Die Gensequenz des TAP-Tags wurde für *S. davawensis* Codon-optimiert und mittels *in vitro*-Gensynthese hergestellt. Anschließend wurde die Gensequenz C-terminal an das Gen des jeweiligen Köderproteins ligiert. Als Kontrolle diente für beide *in vivo*-Nachweismethoden eine gleich behandelte Kultur von *S. davawensis* Wildtyp. Die eluierten Proteine aller PPI-Nachweismethoden wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem denaturierenden

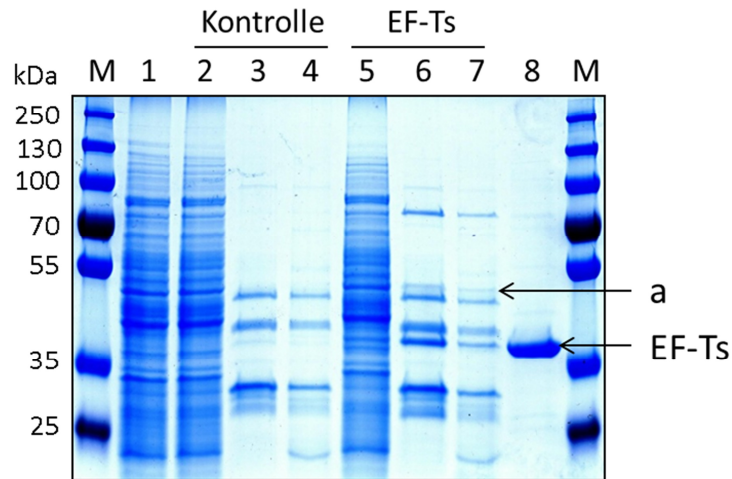
PA-Gel aufgetrennt. Nicht im Kontrollversuch auftretende Proteinbanden wurden mittels Massenspektrometrie analysiert und identifiziert. Im Fall des TAP-Versuches wurde u. a. auf die Analyse mittels Gelelektrophorese verzichtet und das Eluat direkt mittels Massenspektrometrie analysiert.

### 5.2.1 Die Interaktion von *S. davawensis* EF-Ts und EF-Tu1 als Kontrollexperiment der PPI-Nachweismethoden

Um die jeweiligen PPI-Nachweismethoden zu validieren, wurde die Interaktion der Elongationsfaktoren Ts (EF-Ts, *elongation factor thermo stable*) und Tu (EF-Tu, *elongation factor thermo unstable*) als Kontrollversuch gewählt. Die Interaktion beider Elongationsfaktoren wurde bereits in *E. coli* als auch in *Streptomyces aureofaciens* nachgewiesen (Weiser & Ruusala, 1986; Kawashima *et al.*, 1996). EF-Tu ist eines der in der Zelle am häufigsten vorkommenden Proteine und die Elongationsfaktoren EF-Ts und EF-Tu sind universell in jedem Organismus vorhanden. *S. davawensis* besitzt drei EF-Tu kodierende Gene, deren Expressionsprodukte mögliche Interaktionspartner von EF-Ts sein könnten. Diese sind *tuf1* (BN159\_3731), *tuf2* (BN159\_1096) und *tuf3* (BN159\_7275), welche 96,2%, 93,0% und 93,8% Sequenzidentität mit den Genen der drei EF-Tu-Spezies aus *Streptomyces ramocissimus* besitzen (Hoogvliet *et al.*, 1999).

Zur nativen Expression von *tsf* *in vivo* wurde die gesamte Nukleotidsequenz des *rpsB-tsfs*-Operons (BN159\_2783-2784) (Bendiak & Friesen, 1981; An *et al.*, 1981; Sanangelantoni, 1990) mit dem stromaufwärts gelegenen Promotorbereich von 271 bp aus *S. davawensis* in pSET152 eingefügt. Das Gen *rpsB* kodiert hierbei das ribosomale Protein S2. Zum Nachweis von PPI mit Hilfe von EF-Ts als Köderprotein wurden jeweils *S. davawensis*-Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase verwendet. Aufgrund der erhöhten Zellteilungsrate bzw. des erhöhten Myzelwachstums zu dieser Wachstumsphase ist zu erwarten, dass die Translationsrate und somit die Proteinkonzentrationen der Elongationsfaktoren ebenfalls am höchsten sind. Wurde EF-Ts für *in vivo*-PPI-Nachweismethoden in *S. davawensis* mit Hilfe des Expressionsvektors pIJ6902 jedoch überproduziert, wurden die Kulturen über die exponentielle Wachstumsphase hinaus sieben Tage in Anwesenheit von Thiostrepton kultiviert.

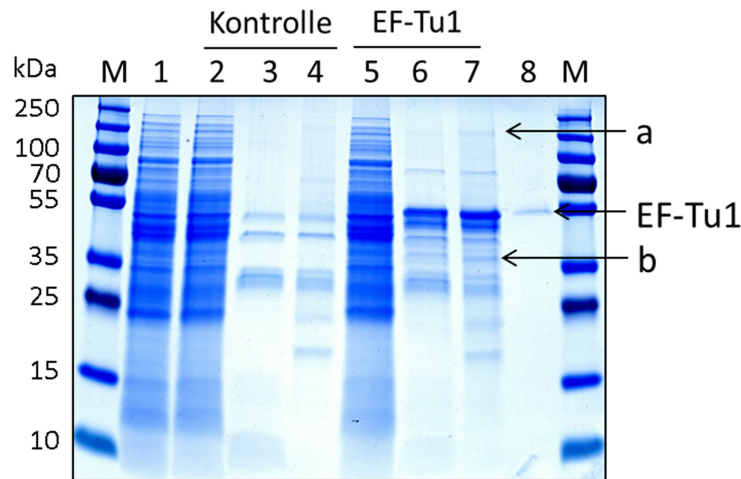
Die PPI von EF-Ts und EF-Tu wurde zunächst *in vitro* mit dem *pull-down*-Versuch verifiziert, bei dem EF-Ts als Köderprotein verwendet wurde. Wie aus Abbildung 35 zu erkennen ist, war nur Proteinbande a neben EF-Ts-His<sub>6</sub> (UniProt-Datenbank-Eintrag K4R1D9) ein erdenklicher Kandidat für die in *S. davawensis* möglich vorkommenden EF-Tu-Spezies EF-Tu1-3, welche ein theoretisches MG von 43,9 kDa, 44,1 kDa und 41,2 kDa besitzen. Die massenspektrometrische Analyse identifizierte die markierte Proteinbande a als EF-Tu1 (UniProt-Datenbank-Eintrag K4R4U8). *S. davawensis* produziert unter Laborbedingungen somit höchstwahrscheinlich nur EF-Tu1. Die Elongationsfaktoren EF-Tu2 und EF-Tu3 wurden nicht nachgewiesen.



**Abbildung 35: EF-Tu1 wird in *S. davawensis* unter Laborbedingungen exprimiert und interagiert mit EF-Ts.** Zur Analyse der Wechselwirkung von EF-Ts und EF-Tu mittels *pull-down* wurde EF-Ts mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag als Köderprotein verwendet. Der zellfreie Extrakt von *S. davawensis* aus der exponentiellen Wachstumsphase wurde mit ungekoppelter (Kontrolle, 2-4) und EF-Ts-His<sub>6</sub>-gekoppelter (EF-Ts, 5-7) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose vier Stunden lang bei 4 °C inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden entfernt, das Eluat gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. (1) Zellfreier Rohextrakt vor Zugabe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose mit und ohne immobilisiertem Köderprotein, Kontrollversuch: (2) nicht gebundene Proteine (Durchfluss), (3) konzentriertes Eluat, (4) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine. *Pull-down* mit EF-Ts-His<sub>6</sub> (EF-Ts): (5) nicht gebundene Proteine (Durchfluss), (6) konzentriertes Eluat, (7) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine, (8) gereinigtes EF-Ts-His<sub>6</sub> (ca. 10 µg). Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Um die Interaktion von EF-Ts mit EF-Tu1 während der exponentiellen Wachstumsphase unter Laborbedingungen in YS-Medium zu verifizieren, wurde ein reverser *pull-down*-Versuch mit EF-Tu1 als Köderprotein durchgeführt (Abb. 36). Die mittels EF-Tu1-His<sub>6</sub> coeluierten Proteine (Proteinbande a und b, Spur 7) wurden massenspektrometrisch jedoch beide als EF-Tu1 (UniProt-Datendank-Eintrag K4R4U8) und nicht als EF-Ts identifiziert. Die Analysen deuteten darauf hin, dass das um ca. 10 kDa kleinere EF-Tu1 der Proteinbande b C-terminal deletiert war. Dagegen handelte es sich bei Proteinbande a vermutlich um das Dimer von EF-Tu1.

Da die PPI von EF-Ts und EF-Tu1 mittels *pull-down* somit nur mit EF-Ts als Köderprotein nachgewiesen werden konnte, wurde für die weiteren *in vivo*-PPI-Nachweismethoden SPINE und TAP nur EF-Ts und nicht EF-Tu1 als Köderprotein verwendet.

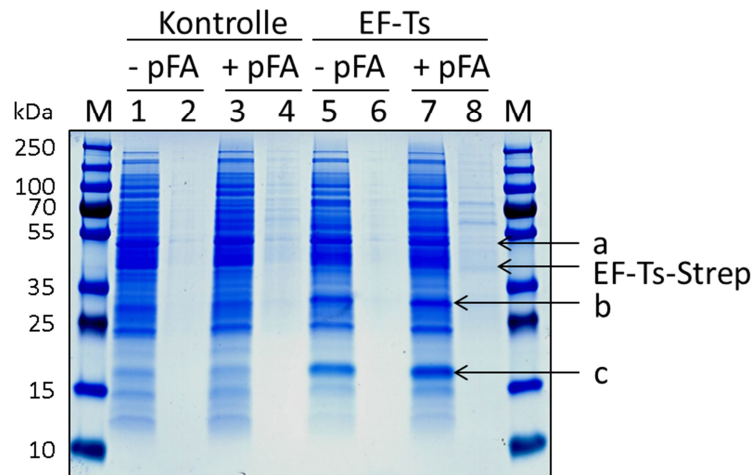


**Abbildung 36: Die Wechselwirkung von EF-Ts und EF-Tu1 aus *S. davawensis* ist mit EF-Tu1 als Köderprotein nicht zu verifizieren.** Für den reversen *pull-down*-Versuch wurde EF-Tu1 mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag als Köderprotein verwendet. Zellfreier Extrakt einer Kultur von *S. davawensis* aus der exponentiellen Wachstumsphase wurde mit ungekoppelten (Kontrolle, 2-4) und EF-Tu1-His<sub>6</sub>-gekoppelten (EF-Tu1, 5-7) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose vier Stunden lang bei 4 °C inkubiert. Die ungebundenen Proteine wurden entfernt, das Eluat gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. (1) Zellfreier Rohextrakt vor Zugabe von Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose mit und ohne immobilisiertem Köderprotein, Kontrollversuch: (2) nicht gebundene Proteine (Durchfluss), (3) konzentriertes Eluat, (4) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine. EF-Tu1-*pull-down*: (5) nicht gebundene Proteine (Durchfluss), (6) konzentriertes Eluat, (7) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine, (8) gereinigtes EF-Tu1-His<sub>6</sub>-Tag nach Kopplung der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose (15 µl). Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Um die PPI von EF-Ts und EF-Tu1 von *S. davawensis* mittels SPINE *in vivo* nachzuweisen, wurde das Gen des Köderproteins EF-Ts (*tsf*) zunächst unter Kontrolle des nativen Promotors im Stamm *S. davawensis*::*pSETrpstsfStrep* exprimiert. Als Kontrollversuch diente eine unter gleichen Bedingungen gewachsene Kultur von *S. davawensis* Wildtyp. Die Wechselwirkung von Proteinen wurde dadurch fixiert, indem jeweils einer Kulturhälfte vor der Zellernte Paraformaldehyd (pFA) zugegeben wurde. Nach gelelektrophoretischer Analyse konnten im PA-Gel jedoch in den Proben der Eluate keine Proteine detektiert werden (nicht gezeigt). Deshalb wurde in einem nächsten Versuch das Köderprotein EF-Ts mit C-terminalem Strep-Tag II in *S. davawensis*::*pIJtsfStrep* sieben Tage lang überproduziert. Als Kontrollversuch diente eine ebenso lang gewachsene Kultur von *S. davawensis* Wildtyp. Die Kulturen wurden wie im vorherigen Versuch vor der Zellernte geteilt und mit pFA behandelt. Abbildung 37 zeigt das PA-Gel, mit dem nicht gebundene (Durchfluss) und gebundene Proteine (Eluate) gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt wurden. Trotz induzierter Expression des *tsf*-Gens wurden im Eluat des SPINE-Versuches nur geringe Mengen Protein gereinigt. Das Köderprotein EF-Ts-Strep mit einem MG von ca. 31,2 kDa wurde in der mit pFA-behandelten Kultur massenspektrometrisch identifiziert (Spur8, UniProt-Datenbank-Eintrag K4R1D9). Proteinbande a, welche ein MG von ca. 40-44 kDa aufwies, konnte als dessen Proteininteraktionspartner EF-Tu1 (UniProt-Datendank-Eintrag K4R4U8) identifiziert werden. Die zusätzlichen Proteinbanden b und c im Durchfluss des SPINE-Versuches



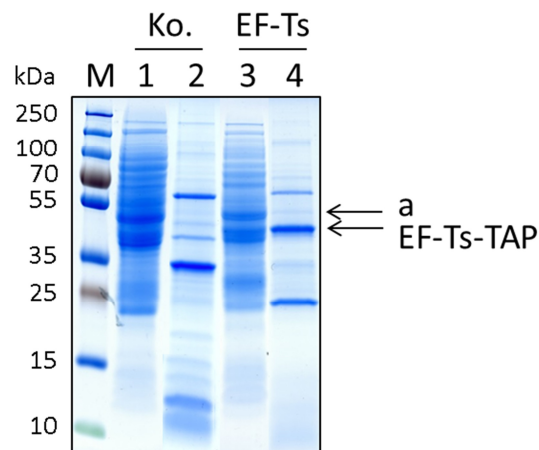
mit EF-Ts-Strep als Köderprotein wurden massenspektrometrisch als HTH-ähnliches Transkriptionsaktivatorprotein TipA identifiziert (UniProt-Datendank-Eintrag K4QWJ7). Die Anwesenheit des Proteins beweist, dass die Expression des Gens *tsf-Strep* unter Kontrolle des Thiostrepton-induzierten *tipA*-Promotors stattfand. Somit konnte gezeigt werden, dass der Nachweis einer PPI mittels SPINE *in vivo* zwar nicht unter nativen Expressionsbedingungen jedoch bei Überproduktion des Köderproteins in *S. davawensis* möglich ist.



**Abbildung 37: Die Wechselwirkung von EF-Ts und EF-Tu1 ist in *S. davawensis* bei Überproduktion des Köderproteins EF-Ts *in vivo* mittels SPINE nachweisbar.** Das Köderprotein EF-Ts mit C-terminalem Strep-Tag II wurde in *S. davawensis::pIJtsfStrep* in Anwesenheit von Thiostrepton bei 30°C in TSB-Medium überproduziert. Nach sieben Tagen wurden die Kulturen von *S. davawensis* Wildtyp (Kontrolle) und *S. davawensis::pIJtsfStrep* (EF-Ts) geteilt und jeweils einer Kulturhälfte Paraformaldehyd (pFA) zugegeben. Nicht gebundene Proteine (Durchfluss) und gebundene Proteine (Eluat) wurden gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Kontrollversuch: (1) Durchfluss ohne pFA, (2) Eluat ohne pFA, (3) Durchfluss mit pFA, (4) Eluat mit pFA. SPINE mit EF-Ts als Köderprotein: (5) Durchfluss ohne pFA, (6) Eluat ohne pFA, (7) Durchfluss mit pFA, (8) Eluat mit pFA. Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Da die Proteinmengen der coeluierten Interaktionspartner EF-Ts und EF-Tu1 trotz induzierter Expressionsbedingungen des Köderproteins EF-Ts-Strep mittels SPINE nicht sehr hoch waren, wurde im Weiteren die TAP-Methode angewendet. Diese *in vivo*-Nachweismethode verspricht aufgrund ihrer zwei aufeinanderfolgenden Reinigungsschritte auch unter nativen Genexpressionsbedingungen des Köderproteins hohe Mengen an spezifisch bindenden Proteinen. Wie auch für den SPINE-Versuch wurde das Gen des Köderproteins EF-Ts mit C-terminalem TAP-Tag zunächst unter Kontrolle des nativen Promotors in *S. davawensis::rpstsfTAP* exprimiert. Als Kontrollversuch diente wie im SPINE-Versuch eine unter gleichen Bedingungen gewachsene Kultur von *S. davawensis* Wildtyp. Spezifisch bindende Proteine wurden nach Reinigung mittels TCA gefällt, konzentriert gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Im PA-Gel wurden jedoch wie zunächst auch im SPINE-Versuch keine Proteine detektiert (nicht gezeigt), weshalb das Köderprotein EF-Ts-TAP daraufhin ebenfalls überproduziert wurde. Hierfür wurde *S. davawensis::pIJtsfTAP* als Produktionsstamm verwendet. Als Kontrollversuch diente

erneut eine Kultur von *S. davawensis* Wildtyp. Anders als für einen TAP-Versuch üblich wurden die Proben jedoch zusätzlich mit pFA behandelt, um die Wahrscheinlichkeit einer Coelution von EF-Ts-TAP und EF-Tu1 zu erhöhen. Die TCA-gefällten Proteine (Eluat) wurden anschließend gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt. Tatsächlich konnte das Köderprotein EF-Ts-TAP diesmal deutlich überproduziert im Eluat des Coomassie-gefärbten PA-Gels detektiert und mittels Massenspektrometrie identifiziert werden (UniProt-Datenbank-Eintrag K4R1D9) (Abb. 38, Spur 4). Obwohl das theoretische MG von EF-Ts-TAP ca. 35 kDa beträgt, lief das Köderprotein im PA-Gel bei einem MG von etwa 40 kDa, was aber auf die Ungenauigkeit des Proteinmarkers zurückzuführen ist. Die Proteinbande a konnte mittels Massenspektrometrie als EF-Tu1 identifiziert werden (UniProt-Datenbank-Eintrag K4R4U8). Trotz zwei aufeinanderfolgender Reinigungsschritte wurden mit EF-Ts-TAP und EF-Tu1 viele andere Proteine gereinigt, wodurch diese *in vivo*-PPI-Nachweismethode nicht spezifischer als die SPINE-Methode zu sein scheint.



**Abbildung 38: Die Wechselwirkung von EF-Ts und EF-Tu1 ist in *S. davawensis* bei Überproduktion des Köderproteins EF-Ts *in vivo* mittels TAP nachweisbar.** Das Köderprotein EF-Ts mit C-terminalem TAP-Tag wurde in *S. davawensis::pIJtsfTAP* in Anwesenheit von Thiostrepton bei 30°C in TSB-Medium überproduziert. Nach sieben Tagen wurden die Kulturen von *S. davawensis* Wildtyp (Kontrolle = Ko.) und *S. davawensis::pIJtsfTAP* (EF-Ts) geteilt und jeweils einer Kulturhälfte Paraformaldehyd (pFA) zugegeben. Nicht gebundene Proteine (Durchfluss) und gebundene Proteine (Eluat) wurden gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Kontrollversuch: (1) Durchfluss, (2) Eluat. EF-Ts-TAP-Versuch: (3) Durchfluss, (4) Eluat. Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: *PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

### 5.2.2 Putative PPI der *S. davawensis* Roseoflavinbiosyntheseenzyme

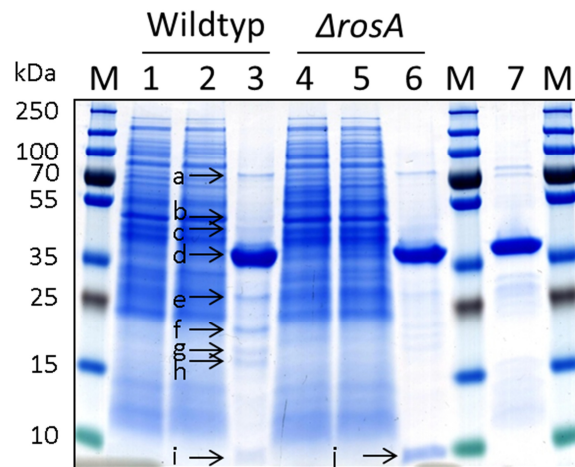
Da zu Beginn dieser Arbeit RosA das einzig bekannte Enzym der RoF-Biosynthese war, wurde RosA als Köderprotein verwendet, um eine mögliche PPI zwischen RosA und Enzymen der RF-Biosynthese als auch weiterer möglicher RoF-Biosyntheseenzyme zu identifizieren. Die Promotorsequenz des Operons (*BN159\_8026-8035*), in welchem das *S. davawensis* Gen *rosA* (*BN159\_8032*) lokalisiert ist, war zu Beginn dieser Arbeit noch nicht charakterisiert. In der von diesem Operon stromaufwärts liegenden Nukleotidsequenz konnten jedoch putative Promotorsequenzen (-10 und -35 Promotorregion) identifiziert werden (Jankowitsch *et al.*, 2011). Zur nativen Expression



von *rosA* wurde deshalb diese 387 bp lange Nukleotidsequenz zusammen mit *rosA* und dessen stromaufwärts gelegener 12 bp langen Shine-Dalgarno-Sequenz in pSET152 ligiert.

RosA wird nachweislich erst in der stationären Wachstumsphase von *S. davawensis* produziert (Jankowitsch *et al.*, 2011). Um mögliche mit RosA interagierende Proteine zu reinigen, wurde deshalb für alle PPI-Versuche eine *S. davawensis*-Kultur aus der stationären Wachstumsphase verwendet, die nachweislich RoF produzierte.

Zum anfänglichen *screening* möglicher Interaktionspartner von RosA wurden *in vitro*-pull-down-Versuche durchgeführt. Hierzu wurde RosA mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag als Köderprotein und zellfreie Extrakte von *S. davawensis* Wildtyp als auch von einer *S. davawensis* RosA-Disruptionsmutante (*S. davawensis*  $\Delta$ *rosA*) (Jankowitsch *et al.*, 2011) verwendet. Letztere diente zur Kontrolle, um auszuschließen, dass normalerweise mit RosA interagierende Proteine im *S. davawensis* Rohextrakt nicht vom genomkodierten RosA zurückgehalten werden, sondern mit dem immobilisierten Köderprotein RosA-His<sub>6</sub> eluieren. Die gereinigten Proteine wurde gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau gefärbt. Abbildung 39 zeigt das PA-Gel mit markierten Proteinbanden a-j, die definiert genug aufgetrennt waren, um sie massenspektrometrisch zu analysieren. Aus Tabelle 45 können hierzu die detaillierten Angaben zu den dazugehörigen UniProt-Datenbank-Einträgen, *S. davawensis* Genannotationen, Gennamen und Proteinfunktionen entnommen werden.



**Abbildung 39: Pull-down-Analyse von mit *S. davawensis* RosA putativ interagierenden Proteinen.**

Zur Untersuchung möglicher Proteinwechselwirkungen mit *S. davawensis* RosA wurde zellfreier Extrakt von *S. davawensis* Wildtyp (Wildtyp, 1-3) und einer *S. davawensis* *rosA*-Disruptionsmutante ( $\Delta$ *rosA*, 4-6) aus stationärer Wachstumsphase mit RosA-His<sub>6</sub>-gekoppelter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose vier Stunden lang bei 4°C inkubiert. Der Rohextrakt, nicht gebundene Proteine (Durchfluss) und gebundene Proteine (Eluat) wurden gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Wildtyp: (1) zellfreier Extrakt, (2) Durchfluss, (3) Eluat.  $\Delta$ *rosA* (Kontrollversuch): (4) zellfreier Extrakt, (5) Durchfluss, (6) Eluat, (7) gereinigtes RosA-His<sub>6</sub>-Tag (ca. 10  $\mu$ g). Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: *PageRuler*<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

**Tabelle 45: Mittels MALDI TOF/TOF-Massenspektrometrie identifizierte Proteine des *pull-down*-Versuchs mit RosA-His<sub>6</sub> als Köderprotein in *S. davawensis* Wildtyp und  $\Delta$ rosA. Angegeben sind die in den entsprechenden Proteinbanden a-j (Abb. 39) identifizierten Proteine mit UniProt-Datenbank-Eintrag (UniProt-Nr.), *S. davawensis* Genannotationsnummer, dazugehörigen Gennamen (falls bekannt) und Protein bzw. putativ wahrscheinlichem Protein nach NCBI Protein BLAST.**

Gel-bande	UniProt-Nr.	Gen-annotations-nr.	Gen-name	Protein
<b>a</b>	K4RFM2	BN159_8032	<i>rosA</i>	RosA, SAM-abhängige Methyltransferase
	K4R1X3	BN159_2929		Lösliches ABC Transporter-Bindeprotein
	K4R1D5	BN159_2511		Hypothetisches Protein; Polyketid-Cyclase SnoaL-ähnliche Domäne
<b>b</b>	K4R610	BN159_4404		Molybdän-Cofaktor Biosynthese-Protein
<b>c</b>	K4QYB7	BN159_1431		Putative Multikupfer-Oxidase
<b>d</b>	K4RFM2	BN159_8032	<i>rosA</i>	RosA, SAM-abhängige Methyltransferase
	K4R1H7	BN159_5757		PhoH-ähnliches Protein ( <i>phosphate-starvation inducible protein</i> )
<b>e</b>	K4RFM2	BN159_8032	<i>rosA</i>	RosA, SAM-abhängige Methyltransferase
	K4R1H7	BN159_5757		PhoH-ähnliches Protein ( <i>phosphate-starvation inducible protein</i> )
	K4R0T8	BN159_1885		Hypothetisches Protein; SAM-abhängige Methyltransferase AdoMet-MTase Superfamilie
	K4QY68	BN159_4627	<i>glpQ1</i>	Putative Glycerophosphoryl-Diesterphosphodiesterase 1
	K4R953	BN159_4840	<i>phoU2</i>	Phosphat-Modulator
	K4QTV3	BN159_2672	<i>gluB</i>	Glutamat-Bindeprotein
<b>f</b>		BN159_8032	<i>rosA</i>	RosA, SAM-abhängige Methyltransferase
	K4R337	BN159_3111		Hypothetisches Protein; enthält eine hochkonservierte Zink-Finger-Domäne (CGNR Zink-Finger) zur Bindung von DNA
	K4QXX5	BN159_4512		Transkriptionsregulator, (UbiC Transkriptionsregulator-assoziierte (UTRA) Domäne-enthaltendes Protein)
<b>g</b> <b>h</b>	K4R337	BN159_3111		Hypothetisches Protein; enthält eine hochkonservierte Zink-Finger-Domäne (CGNR Zink-Finger) zur Bindung von DNA
<b>i</b> <b>j</b>	K4QXP8	BN159_1333		Dodecin

Mit Hilfe der MALDI TOF/TOF-Massenspektrometrie wurden insgesamt dreizehn verschiedene putative RosA-Interaktionspartner identifiziert. RosA war hierbei in den Proteinbanden a, d, e und f, welche ein MG von ca. 75 kDa, 39 kDa, 27 kDa und 23 kDa besaßen. Dabei handelte es sich bei Proteinbande d eindeutig um das intakte dem Rohextrakt jeweils zugegebene Köderprotein RosA-His<sub>6</sub> mit einem MG von 39 kDa. Unter den anderen identifizierten Proteinen befand sich zusammen mit RosA in Proteinbande e das Glutamat-Bindeprotein GluB. Da neueste Studien zeigten, dass die RoF-Biosynthese vom Aminogruppen-Donor Glutamat abhängig ist, wäre eine Wechselwirkung von GluB mit Enzymen der RoF-Biosynthese vorstellbar. Weiterhin wurden zusammen mit RosA drei Proteine gereinigt, deren Genexpression durch das



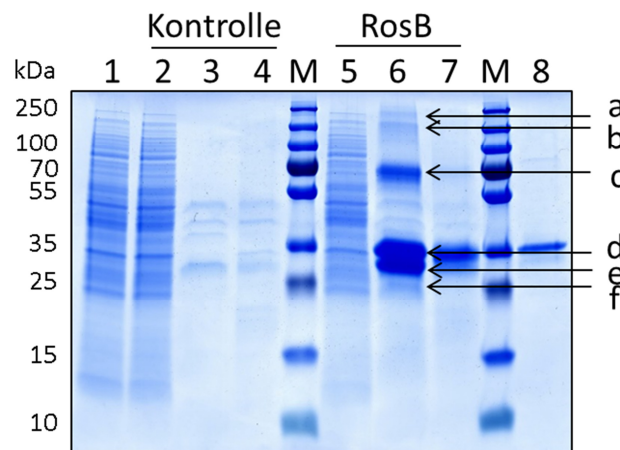
**Tabelle 46: Mittels MALDI TOF/TOF-Massenspektrometrie identifizierte Proteine des SPINE-Versuches mit RosA-Strep als Köderprotein in *S. davawensis::pSETrosAStrep* (Gel A) und *S. davawensis::pIJrosAStrep* (Gel B).** Angegeben sind die in den entsprechenden Proteinbanden a-d des PA-Gels A und Proteinbanden a-f des PA-Gels B (entsprechend Abb. 40) identifizierten Proteine mit UniProt-Datenbank-Eintrag (UniProt-Nr.), *S. davawensis* Genannotationsnummer, dazugehörigen Gennamen (falls bekannt) und Protein bzw. putativ wahrscheinlichem Protein nach NCBI Protein BLAST.

Gel-bande	UniProt-Nr.	Gen-annotationsnr.	Gen-name	Protein
<b>Gel A</b>				
a				Nicht identifizierbar
b				Nicht identifizierbar
c	K4R466	<i>BN159_3471</i>	<i>pccB7</i>	Propionyl-Coenzym A Carboxylase, $\beta$ -Kette
d	K4RFM2	<i>BN159_8032</i>	<i>rosa</i>	RosA, SAM-abhängige Methyltransferase
<b>Gel B</b>				
a	K4R9Y1	<i>BN159_5501</i>	<i>accA1</i>	Acetyl-/Propionyl-Coenzym A Carboxylase, $\alpha$ -Kette
b				Nicht identifizierbar
c	K4R0U5	<i>BN159_5502</i>		Methylcrotonoyl-Coenzym A Carboxylase, $\beta$ -Kette
d	K4R4U8	<i>BN159_3731</i>	<i>tuf1</i>	Elongationsfaktor Tu1
e	K4R9G3	<i>BN159_5341</i>		Lösliches Bindeprotein eines ABC-Transporters für Zucker
f				Nicht identifizierbar

Insgesamt konnten sechs von insgesamt zehn markierten Proteinbanden der mittels SPINE und RosA-Strep gereinigten Proteine aus *S. davawensis::pSETrosAStrep* (Abb. 40, Gel A) und *S. davawensis::pIJrosAStrep* (Abb. 40, Gel B) massenspektrometrisch identifiziert werden. Einige dieser Proteine lagen trotz vorheriger Konzentrierung in zu geringen Mengen vor, so dass eine Analyse nicht möglich war. Das Köderprotein RosA-Strep wurde nur im Eluat von *S. davawensis::pSETrosAStrep* (Proteinbande d) jedoch trotz Überproduktion nicht im Eluat von *S. davawensis::pIJrosAStrep* identifiziert. Vermutlich könnte es sich aber bei Proteinbande f in Gel B um das Köderprotein RosA-Strep mit ca. 39 kDa handeln. Unter induzierten Expressionsbedingungen wurde zudem der Elongationsfaktor EF-Tu1 und ein lösliches Bindeprotein eines ABC-Transporters für Zucker nachgewiesen (Gel B). Es ist wahrscheinlich, dass das Transporterprotein und EF-Tu1 unspezifisch von der Strep-Tactin-Säulenmatrix gebunden wurden. Weiterhin wurden in Gel A und B die Proteine Propionyl-Coenzym A Carboxylase, Acetyl-/Propionyl-Coenzym A Carboxylase und Methylcrotonoyl-Coenzym A Carboxylase mittels MALDI TOF/TOF-Massenspektrometrie identifiziert. Hierbei handelt es sich jeweils um Carboxylasen, die Biotin als Cofaktor binden. Biotin bindet jedoch spezifisch an die Strep-Tactin-Säulenmatrix, weshalb diese Carboxylasen höchstwahrscheinlich über ihren Cofaktor unabhängig von RosA-Strep ebenfalls unspezifisch gereinigt wurden.

Die Ergebnisse des *pull-down*- und SPINE-Versuches mit RosA-His<sub>6</sub> bzw. RosA-Strep als Köderprotein zeigten somit keine Übereinstimmungen. Die mittels *pull-down* nachgewiesenen möglichen Interaktionspartner von RosA konnten nicht mit Hilfe von *in vivo*-Untersuchungen verifiziert werden.

Da das zweite Enzym der RoF-Biosynthese aus *S. davawensis* zum Ende dieser Arbeit identifiziert werden konnte (Schwarz *et al.*, 2016), wurde im Folgenden ein *pull-down*-Versuch mit RosB als Köderprotein durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die Ergebnisse des *pull-down*- bzw. SPINE-Versuches mit RosA als Köderprotein verifiziert werden können oder andere gebundene Proteine weitere Aufschlüsse zu PPI innerhalb der RoF-Biosyntheseenzyme zulassen. Hierzu wurde RosB mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag heterolog in *E. coli* produziert und bis zur apparenten Homogenität gereinigt. RosB-His<sub>6</sub> wurde mit zellfreiem Extrakt einer Kultur von *S. davawensis* Wildtyp aus der stationären Wachstumsphase inkubiert, gebundene Proteine gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie Brilliant Blau angefärbt. Zur Kontrolle wurde zellfreier Extrakt von *S. davawensis* Wildtyp mit ungekoppelter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose inkubiert. Abbildung 41 zeigt das entsprechende PA-Gel mit den mittels MALDI TOF/TOF-Massenspektrometrie analysierten und identifizierten Proteinbanden a-f.



**Abbildung 41: Pull-down-Analyse von mit *S. davawensis* RosB putativ interagierenden Proteinen.** Zur Untersuchung möglicher Wechselwirkungen wurde zellfreier Extrakt von *S. davawensis* Wildtyp aus der stationären Wachstumsphase mit ungekoppelter (Kontrolle, 2-4) sowie mit RosB-His<sub>6</sub>-gekoppelter (RosB, 5-6) Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose vier Stunden lang bei 4 °C inkubiert. Der Rohextrakt, nicht gebundene Proteine (Durchfluss), gebundene Proteine (Eluat) sowie nach Elution noch an der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine wurden gelelektrophoretisch in einem PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie Brilliant Blau angefärbt. (1) Zellfreier Extrakt, Kontrolle: (2) Durchfluss, (3) Eluat, (4) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine, *pull-down* mit RosB-His<sub>6</sub> (RosB): (5) Durchfluss, (6) Eluat, (7) nach Elution noch an Ni<sup>2+</sup>-NTA-Sepharose bindende Proteine, (8) gereinigtes RosB-His<sub>6</sub> (ca. 4 µg). Die markierten Proteinbanden (Pfeil) wurden mittels MALDI TOF/TOF identifiziert. M: PageRuler<sup>TM</sup> Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific).

Die massenspektrometrische Analyse ergab, dass in allen Proteinbanden nur RosB vorhanden war. Der RosB-His<sub>6</sub>-*pull-down* konnte somit leider nicht die Ergebnisse des RosA-His<sub>6</sub>-*pull-downs* belegen, noch weitere Erkenntnisse über andere mögliche PPI innerhalb der RoF-Biosynthese aufdecken.

Darüber hinaus wurden weder mit RosA noch mit RosB als Köderprotein Enzyme der RF-Biosynthese gereinigt. Eine Verbindung der Flavinstoffwechselwege von Primär- und Sekundärmetabolismus ist demnach in *S. davawensis* JCM4913 unwahrscheinlich.

## 6 Diskussion

### 6.1 Untersuchungen zur Funktion und zu biochemischen Eigenschaften von Dodecin

Zum ersten Mal konnte 2009 für Prokaryoten gezeigt werden, dass ein Protein namens Dodecin aus dem Archaeon *H. salinarum* RF nicht nur für die FMN- und FAD-Synthese zwischenspeichert, sondern die Zelle auch durch Quenchen und gerichteten Abbau vor reaktiven RF-Derivaten schützt (Grininger *et al.*, 2009; Staudt *et al.*, 2012). Weitere Studien haben ergeben, dass Dodecin nicht nur in Archaeen, sondern auch in anderen Bakterien, darunter jedoch nur Bodenbakterien, pathogene sowie extremophile Bakterien, vertreten ist (Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a; Staudt *et al.*, 2012). Da bakterielle Dodecine FMN und archaeale Dodecine RF affiner binden, wird vermutet, dass Dodecine trotz hoher struktureller Ähnlichkeit unterschiedliche Funktionen haben könnten (Staudt *et al.*, 2012). Obwohl es viele Strukturanalysen an bakteriellen Dodecinen gibt, wurde die Funktion bisher noch nicht *in vivo* untersucht.

Analysen mittels NCBI ProteinBlast zeigten, dass Dodecin in fast allen Streptomyzetenarten vorhanden ist und sich deren Proteinsequenzen zu mindestens 71% gleichen, darunter auch *S. davawensis*. Letzteres besitzt bei Vergleich mit bekannten Dodecinen anderer Bakterien die meiste Ähnlichkeit mit Dodecinen anderer Actinobakterien wie *S. coelicolor* und *M. tuberculosis*. Das Dodecin von *S. coelicolor*, einem RoF-sensitiven Vertreter der Streptomyzeten und genetisch dem *S. davawensis* nah verwandt, besitzt 72% Sequenzidentität mit dem *S. davawensis* Dodecin. Es stellte sich daher die Frage, welche Funktion das flavinbindende Dodecin in *S. davawensis* einnimmt, welches das selten produzierte Antibiotikum RoF synthetisiert. Ziel dieser Arbeit war somit die Ermittlung dieser Fragestellung mittels *in vivo*-Untersuchungen in *S. davawensis* mit besonderem Schwerpunkt auf der Biosynthese von RoF und die RoF-Resistenz. Darüber hinaus sollte in diesem Zusammenhang ein möglicher Einfluss von oxidativem Stress auf die Zelle untersucht werden. Da sich *S. davawensis* und *S. coelicolor* aufgrund ihrer Dodecine zu unterscheiden scheinen, wurden die Proteine beider Streptomyzeten in einem weiteren Teilprojekt zusätzlich auf ihre biochemischen Eigenschaften untersucht.

#### 6.1.1 Die Funktion von Dodecin im Flavinstoffwechsel von *S. davawensis*

Die Konstruktion einer *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante wies daraufhin, dass Dodecin unter Laborbedingungen nicht essentiell für *S. davawensis* ist, was auch mit Beobachtungen über das archaeale *H. salinarum* übereinstimmt (Grininger *et al.*, 2009). Daraufhin wurde die Expression des Dodecin-Gens im Wachstumsverlauf des *S. davawensis* Wildtyps über einen Zeitraum von vierzehn Tagen anhand von zellfreiem Extrakt untersucht. Das Expressionsprofil zeigte, dass Dodecin in *S. davawensis* erst zu Beginn der stationären Wachstumsphase produziert wird und die Produktion im Verlauf der spät stationären Wachstumsphase weiter zunimmt. Das Dodecin-Transkript war jedoch bereits in der exponentiellen Wachstumsphase nachweisbar. Kontrollversuche zur Transkription des *S. coelicolor* Dodecin-Gens *SCO0915* wiesen auf eine ähnliche Regulation. Aufgrund eines fehlenden spezifischen Antikörpers konnte hierfür jedoch kein Genprodukt nachgewiesen werden. Es ist aber anzunehmen, dass das *S. coelicolor*

Dodecin-Gen unter normalen Wachstumsbedingungen ähnlich wie das *S. davawensis* Dodecin-Gen reguliert exprimiert wird. Dies würde *in vivo*-Untersuchungen zum Expressionsprofil des *H. salinarum* Dodecins entsprechen (Grininger *et al.*, 2009). Das Dodecin-Transkript wurde in dieser Studie ebenfalls bereits in der exponentiellen Wachstumsphase des Archaeons nachgewiesen, während das Protein selbst erst zu Beginn des stationären Wachstums synthetisiert wurde. Es wird angenommen, dass die Expression in *H. salinarum* translational reguliert wird. Aufgrund dessen könnte es sich bei der Dodecin-Produktion in *S. davawensis* ebenso um eine translationale Regulation handeln. In diesem Fall könnte die Translation beispielsweise durch eine zur Dodecin-mRNA komplementären *antisense*-RNA (aRNA) verhindert werden, indem die aRNA einer wachstumsabhängigen Transkriptionsregulation unterliegt. Kleine nicht-kodierende RNAs (snRNA, *small non-coding* RNA) kommen als regulatorische Elemente häufig in Streptomyzeten vor. In *S. coelicolor* wurden z. B. 99, in *Streptomyces avermitilis* 59 und in *Streptomyces venezuelae* 79 aRNAs identifiziert, die bis auf elf bisherige Ausnahmen meist artspezifisch sind (Heueis *et al.*, 2014). Northern-Blot-Analysen mit einer entsprechenden Sonde könnten Hinweise darauf geben.

Aufgrund der wachstumsphasenabhängigen Synthese wurde zunächst vermutet, dass das *S. davawensis* Dodecin möglicherweise in der Biosynthese des Antibiotikums RoF oder dem dazugehörigen Resistenzmechanismus als flavinbindendes Protein beteiligt sein könnte. Im Fall von *S. coelicolor* wurde davon ausgegangen, dass es eher eine mögliche Rolle bei der Resistenz spielen könnte. Dass Dodecin im Stande ist, RoF zu binden, wurde bereits anhand des Dodecins aus *M. tuberculosis* gezeigt, einem pathogenen Vertreter der Actinobakterien (Mathes *et al.*, 2009). Obwohl bakterielle Dodecine FMN mit höherer Affinität binden, war es denkbar, dass es möglicherweise neben FMN zu Beginn der stationären Wachstumsphase zusätzlich auch RF bindet. Neben dem Ausgangssubstrat FMN für die RoF-Biosynthese würde somit unter wachstumslimitierenden Bedingungen ebenfalls der Nachschub an FMN gewährleistet werden, indem Dodecin gleichzeitig RF zur FMN-Synthese zwischenspeichert. Dass Dodecin ebenfalls erst in der stationären Wachstumsphase produziert wird, würde diese These nur unterstützen. Aufgrund dessen wurden zunächst Langzeitwachstumsversuche mit dem *S. davawensis* Wildtyp und der Dodecin-Disruptionsmutante durchgeführt und die intrazelluläre Konzentration von RF und RoF als auch die in das Medium abgegebene extrazelluläre RoF-Konzentration beider Stämme mittels HPLC gemessen. Zwar wurde im *S. davawensis* Wildtyp gegenüber der Dodecin-Disruptionsmutante eine leicht erhöhte RF-Konzentration gemessen, diese besaß aber keinen signifikanten Effekt auf die für beide Stämme gemessenen RoF-Konzentrationen. Für das vor kurzem zweite an der RoF-Synthese beteiligte Enzym RosB, eine 8-Demethyl-8-aminoriboflavin-5'-phosphatsynthase, konnte gezeigt werden, dass nicht RF sondern vielmehr FMN als direktes Vorläufermolekül zur Synthese von RoF genutzt wird (Schwarz *et al.*, 2016). Während des Langzeitwachstumsversuchs wurden neben den Konzentrationen von RF und RoF auch die intrazellulären Konzentrationen von FMN und FAD bestimmt. Obwohl in dieser Arbeit im *S. davawensis* Wildtyp gegenüber der Dodecin-Disruptionsmutante intrazellulär eine nahezu doppelt so hohe FMN-Konzentration gemessen wurde, wirkte sich diese jedoch ebenfalls nicht signifikant auf die intra- oder extrazellulären RoF-Konzentrationen aus. Liegt Dodecin in hohen Konzentrationen in der Zelle vor, bindet es neben FMN auch



RF. Die eigentliche Hauptfunktion des *S. davawensis* Dodecins scheint aber nicht das Aufrechterhalten der RoF-Biosynthese zu sein, indem es die RoF-Vorläufermoleküle RF und FMN bindet. Die Disruption des Dodecin-Gens hatte nachweislich keinen Effekt auf die Synthese von RoF.

Da die RoF-Biosynthese in *S. davawensis* durch Dodecin nicht beeinflusst zu sein schien, wurde im Folgenden untersucht, ob Dodecin möglicherweise RoF intrazellulär binden könnte, bevor dieses aus der Zelle exportiert wird. Dodecin würde somit RoF oder auch mutmaßlich in der Zelle bereits umgesetztes RoFMN und RoFAD abfangen, bevor diese an Stelle von FMN und FAD in Flavoenzymen oder Flavoproteinen binden und diese inhibieren könnten. Demnach wäre Dodecin maßgeblich im Resistenzmechanismus von *S. davawensis* gegenüber RoF beteiligt. Wurde der *S. davawensis* Wildtyp und zwei verschiedene Klone der Dodecin-Disruptionsmutante zusammen mit dem RoF-sensitiven *S. coelicolor* auf einem mit 200  $\mu\text{M}$  RoF versetzten Nährboden ausgestrichen, wuchsen der Wildtyp und die Disruptionsmutanten gleich gut. Das Wachstum des Kontrollstamms *S. coelicolor* wurde inhibiert. Auch vermochte die Überproduktion des *S. davawensis* Dodecins im Gram-positiven und RoF-sensitiven *B. subtilis* Marburg 168 (Wildtyp) diesem in Anwesenheit von RoF kein Wachstumsvorteil zu verleihen. Das *S. davawensis* Dodecin kann trotz flavinbindender Eigenschaften folglich nicht im RoF-Resistenzmechanismus von *S. davawensis* beteiligt sein, noch einem RoF-sensitiven Organismus durch Überproduktion Resistenz übertragen. Dies entspricht auch Studien am *S. davawensis* *ribB*-RNA-Schalter, einem FMN-RNA-Schalter in der 5'-UTR der *rib*-mRNA, der die RF-Synthese auf translationaler Ebene durch Bindung von FMN *feedback*-reguliert (Pedrolli *et al.*, 2012). Hierbei konnte gezeigt werden, dass der native *ribB*-RNA-Schalter durch FMN jedoch nicht durch RoFMN beeinflusst wird. Der RoF-Resistenzmechanismus in *S. davawensis* ist deshalb höchstwahrscheinlich nur durch diesen spezialisierten FMN-RNA-Schalter begründet.

Die Überproduktion des *S. coelicolor* Dodecins in *B. subtilis* Marburg 168 wies unter Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  RoF zunächst auch nicht daraufhin, dass dieses im RoF-Resistenzmechanismus involviert sein würde, da die Überproduktion keinen signifikanten positiven Effekt auf das Wachstum von *B. subtilis* im Vergleich zu den Kontrollstämmen hatte. Dass die überproduzierten Dodecine beider Stämme jedoch die Flavine RF und RoF oder möglicherweise deren Derivate gebunden hatten, wurde daran beobachtet, dass die Zellsedimente von *B. subtilis* nach Ernte deutlich gelb bzw. rot gefärbt waren. Wie bereits erwähnt, ergaben frühere Studien, dass bakterielle Dodecine FMN mit höherer Affinität binden als RF (Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a). Es stellte sich für diese Arbeit daher die Frage, ob das Dodecin aus dem RoF-produzierenden *S. davawensis* RoF bzw. dessen Derivate RoFMN und RoFAD affiner bindet als das Dodecin aus dem RoF-sensitiven *S. coelicolor*. Um dies zu untersuchen, wurden beide Dodecine in den Stämmen *E. coli* CpXFMN und CpXFAD in Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  RF und RoF heterolog überproduziert und die an den Dodecinen gebundenen Flavine sowie deren Konzentrationen mittels HPLC bestimmt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Affinität von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin gegenüber FMN mehr oder minder gleich war. Unter Zugabe von RoF zeigten beide Dodecine ebenfalls hohe Affinitäten für RoFMN. Jedoch scheint *S. coelicolor* neben RoFMN auch eine hohe Affinität für RoF zu besitzen, welches jeweils zu nahezu 42-48% gebunden wurde. Für andere bakterielle Dodecine wurde ebenfalls gezeigt, dass



sie Flavine relativ unspezifisch und größtenteils über deren Isoalloxazin-Ringsystem binden (Grininger *et al.*, 2006a; Grininger *et al.*, 2006b; Meissner *et al.*, 2007; Grininger *et al.*, 2009; Mathes *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011a). Hierbei werden besonders kleinere Flavine mit hoher Affinität gebunden. Deswegen ist es zum einen nicht erstaunlich, dass die größeren Flavine FAD und RoFAD von beiden Streptomyzeten-Dodecinen kaum (< 1%) bis gar nicht gebunden wurden und zum anderen, dass auch das *S. coelicolor* Dodecin RoF und RoFMN bindet. Ohne Bestimmung genauere Dissoziationskonstanten ist jedoch keine nähere Aussage über die mögliche Schutzfunktion vor RoF-Derivaten zu treffen. Interessant wäre jedoch, ein Expressionsprofil des *S. coelicolor* Dodecin-Gens in Abhängigkeit von *S. davawensis* physiologisch exportierten RoF-Konzentrationen (maximal 20  $\mu\text{M}$ ) zu erstellen. Um auszuschließen, dass das *S. coelicolor* Dodecin wirklich nicht als Substratfalle (*scavenger*) für antibiotische oder inhibitorische Flavine wie RoF oder RoFMN dient, sollte eine mögliche regulierte Expression unter Zugabe dieser Flavine untersucht werden.

Im Fall von *S. davawensis* Dodecin scheint die Hauptfunktion auch in Anwesenheit von RoF und RoFMN die Speicherung von FMN zu sein. Wie bereits erwähnt, konnten in Langzeitwachstumsversuchen mit dem *S. davawensis* Wildtyp und der Dodecin-Disruptionsmutante während der stationären Wachstumsphase nach vierzehn Tagen im Wildtyp gegenüber der Mutante eine nahezu doppelt so hohe FMN-Konzentration gemessen werden. Die Messungen deuteten darauf hin, dass die Expression von Dodecin mit der Menge an nachweisbarem FMN korreliert. Tatsächlich konnte für die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die FMN-Mengen in der exponentiellen und spät stationären Wachstumsphase kaum unterscheiden. Diese Vermutung stimmt ebenfalls mit Untersuchungen am *H. salinarum* Dodecin überein (Grininger *et al.*, 2009). Es wird angenommen, dass das archaeale Dodecin zu ungünstigen Wachstumsbedingungen wie der stationären Wachstumsphase ein RF-Depot aufbaut, um dieses bei Übergang zu günstigeren Wachstumsbedingungen wieder frei zugeben. So wird auch in dieser Arbeit vermutet, dass Dodecin im Flavinstoffwechsel von *S. davawensis* ein Speicherprotein von hauptsächlich FMN darstellt. Durch Änderung der äußeren Bedingungen und Anregung des Zellwachstums kann so das von Dodecin gebundene FMN als Cofaktor für Flavoenzyme wieder frei gegeben werden. Da Streptomyzeten wie das archaeale *H. salinarum* Bodenorganismen sind, hängt deren Wachstumsgeschwindigkeit von denen im Boden vorliegenden Nährstoffen ab. Werden die Nährstoffe für das Wachstum von Streptomyzeten limitierend, differenziert sich deren Substratmyzel in Luftmyzel, von welchem anschließend die zur Verbreitung nötigen Sporen abgeschnürt werden (Chater, 2011). Sobald sich die Wachstumsbedingungen verbessern, keimen die Sporen aus. Es wäre deshalb interessant zu untersuchen, ob Dodecin auch in Sporen von Streptomyzeten produziert vorliegt und FMN für die Keimung bereithält.

### 6.1.2 Dodecin steht unter der Regulation der durch Plumbagin induzierten oxidativen Stressantwort in *S. davawensis*

*In vivo*- und *in vitro*-Studien am *H. salinarum* Dodecin ergaben, dass das archaeale Dodecin ein bifunktionelles Protein ist und neben einer Speicherfunktion von RF auch reaktive RF-Derivate durch Quenchen, Photodealkylierung oder Photoreduktion abbaut (Bieger *et al.*, 2003; Grininger *et al.*, 2009; Staudt *et al.*, 2012). Expressionsprofile des *H. salinarum* Dodecins als auch die des in dieser Arbeit untersuchten *S. davawensis* Dodecins zeigten, dass Dodecin zu Beginn der stationären Wachstumsphase mit zunehmender Menge produziert wird (Grininger *et al.*, 2009). Frühere Untersuchungen wiesen nach, dass einige transkriptionale Regulationen der Nährstofflimitierung während der stationären Wachstumsphase der des oxidativen Stresses in Bakterien ähnlich sind (DeMaio *et al.*, 1996; Rava *et al.*, 1999; McDougald *et al.*, 2002; Hümpel *et al.*, 2010). In Betracht dessen liegt daher die Vermutung nahe, dass Dodecin nicht nur im Zuge der Nährstofflimitierung in der stationären Wachstumsphase, sondern möglicherweise auch während des oxidativen Stresses eine für die Zelle wichtige Rolle einnimmt. Obwohl Proteinstrukturanalysen darauf hindeuten, dass bakterielle Dodecine weniger zum Quenchen von FMN geeignet sind als archaeale Dodecine zum Quenchen von RF (Staudt *et al.*, 2012), ist anzunehmen, dass auch das *S. davawensis* Dodecin aufgrund des zum archaealen *H. salinarum* Dodecin ähnlichen Expressionsprofils eine ähnliche Funktion haben könnte.

Um dies zu untersuchen, wurde der *S. davawensis* Wildtyp, die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante und vergleichend der *S. coelicolor* Wildtyp den verschiedenen *redox cycling* und Superoxidationradikal-generierenden Agenzien Nitrofurantoin (100  $\mu$ M), Paraquat (500  $\mu$ M) und Plumbagin (20  $\mu$ M) ausgesetzt. Hierbei wurde gezeigt, dass beide *S. davawensis*-Stämme bei Wachstum auf DNA-Nährböden als auch in YS-Medium resistent gegenüber Nitrofurantoin und Paraquat sind. Gleiches konnte für *S. coelicolor* bei Wachstum auf DNA-Nährböden beobachtet werden. Mutationsanalysen in *S. coelicolor* A3(2) zeigten, dass die Paraquat-Resistenz über eine transkriptionale Regulation des *pqrAB*-Operons verliehen wird, welches für den negativen Regulator PqrA und die Paraquat-Effluxpumpe PqrB kodiert und bereits bei Konzentrationen von 200  $\mu$ M Paraquat induziert wird (Cho *et al.*, 2003). *S. davawensis* besitzt ein dem *S. coelicolor* homologes Operon (*BN159\_7015-7076*), dessen Genprodukte mit denen des *S. coelicolor* PqrA und PqrB zu 86% (*BN159\_7015*) und 87% (*BN159\_7016*) ähnlich sind. Darüber hinaus haben Untersuchungen mit *Streptomyces toyocaenis* gezeigt, dass die membrangebundene Serin/Threonin (Ser/Thr)-Proteinkinase StoPK-1 in einem Signalweg involviert ist, der sensitiv gegenüber durch Paraquat und Nitrofurantoin induzierten oxidativen Stress ist (Neu *et al.*, 2002). Die *S. coelicolor* Ser/Thr-Proteinkinase PkaF, welches eine homologes Protein zu StoPK-1 ist, konnte die Paraquat- und Nitrofurantoin-Sensitivität einer *S. toyocaenis* StoPK-1-Mutante wieder komplementieren. *S. davawensis* besitzt in seinem Genom das Gen *BN159\_6328*, welches für die Ser/Thr-Proteinkinase Spk1 kodiert. Sequenzanalysen ergaben, dass diese zu 77% der Proteinkinase PkaF aus *S. coelicolor* und zu 79% der Proteinkinase StoPK-1 aus *S. toyocaenis* ähnlich ist. Es ist daher anzunehmen, dass die Paraquat- und Nitrofurantoin-Resistenz in beiden *S. davawensis*-Stämmen ähnlich wie in *S. coelicolor* und *S. toyocaenis* über das *pqrAB*-Operon und über einen gegenüber oxidativen Stress sensitiven und durch eine Ser/Thr-Proteinkinase

regulierten Signalweg reguliert wird. Eine regulierende Funktion von Dodecin in der oxidativen Stressantwort gegenüber Nitrofurantoin und Paraquat wäre somit ausgeschlossen.

Dagegen wies der *S. davawensis* Wildtyp im Gegensatz zur *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante als auch zum *S. coelicolor* Wildtyp in YS-Medium einen signifikanten Plumbagin-sensitiven Wachstumsphänotyp auf. Differentielle Metabolomanalysen der drei Stämme unter für den *S. davawensis* Wildtyp subletalen Plumbaginkonzentrationen zeigten, dass die beiden *S. davawensis*-Stämme unterschiedlich auf das *redox cycling* Agens reagieren. Die Regulation der Metabolite wies darauf hin, dass die *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante grundsätzlich stressresistenter zu sein scheint als der Wildtyp. Auch war die Stressantwort der Dodecin-Disruptionsmutante der des *S. coelicolor* Wildtyps ähnlicher. Da aufgrund der differentiellen Metabolomanalyse keine definitive Aussage über die Funktion von Dodecin getroffen werden konnte, wurde im Folgenden mit allen Streptomyzetenstämmen eine differentielle Transkriptomanalyse unter für den *S. davawensis* Wildtyp subletalen Plumbaginkonzentrationen durchgeführt. Diese zeigte, dass die transkriptionale Regulation auf Plumbagin in *S. coelicolor* nicht sehr ausgeprägt war. Dies mag daran liegen, dass die verwendete Plumbaginkonzentration für *S. coelicolor* zu gering war, um eine signifikante Stressantwort auszulösen. Lediglich Gene einer generellen Stressantwort waren reguliert. Darunter befanden sich Gene zur Synthese von Trehalose und für den Import von Glutamat, welche die generelle Stressantwort durch Beeinflussung des Sigma-Faktor RpoS ( $\sigma^{38}$ ) induzieren (Loewen *et al.*, 1998). Reprimiert waren interessanterweise dagegen Gene zur Synthese des Signalmoleküls  $\gamma$ -Butyrolacton (Polkade *et al.*, 2016), unter deren Regulation in *S. coelicolor* u. a. das *cpk*-Gencluster steht. Dieses ist in der Synthese eines gelben Pigments und eines antibiotischen Polyketids involviert (Pawlik *et al.*, 2007; Gottelt *et al.*, 2010). Da Glutamat ein Substrat der Cpk-Syntheseproteine ist, wird vermutet, dass die Expression des *cpk*-Genclusters somit nach Behandlung mit Plumbagin durch Repression der  $\gamma$ -Butyrolacton-Synthese und -Transportproteine reduziert wird, um so wiederum die Glutamatkonzentration in der Zelle für die generelle Stressantwort zusätzlich zu erhöhen. Des Weiteren war auch die Transkription von Genen, die Syntheseeenzyme von Glycerophospholipiden kodieren, aktiviert und von Genen, die Enzyme des Abbaus von Glycerophospholipiden kodieren, reprimiert. Dies lässt auf eine durch oxidativen Stress induzierte Lipidperoxidation vermuten. Da jedoch keine anderen signifikante Gene einer oxidativen Stressantwort reguliert waren, ist davon auszugehen, dass *S. coelicolor* jedoch mehr einer generellen als einer oxidativen Stressbedingung unterlag. Untersuchungen haben ergeben, dass das durch Superoxidanionradikale induzierbare SoxRS-System in *S. coelicolor* A3(2) durch Plumbagin erst ab einer Konzentration von 25-50  $\mu$ M aktiv ist (Singh *et al.*, 2013). SoxR (*SCO1697*) oder andere durch das SoxRS-System in *S. coelicolor* regulierten Gene waren weder in der exponentiellen noch in der stationären Wachstumsphase unter Plumbagin signifikant erhöht transkribiert (Naseer *et al.*, 2014). Es sind demnach wohl sehr viel höhere Plumbaginkonzentrationen notwendig, um eine oxidative Stressantwort in *S. coelicolor* zu erzeugen. Auch das *redox cycling* Agens Paraquat induziert SoxR unter einer Konzentration von 1 mM nicht (Singh *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2015), woraus vermutet wird, dass die spezifische Stressantwort auf Superoxidanionradikale in *S. coelicolor* nicht so sensitiv ist wie in *S. davawensis*. Sollte Dodecin in *S. coelicolor*

eine Funktion in der oxidativen Stressantwort übernehmen, müssten hierzu Versuche bei sehr viel höheren Plumbaginkonzentrationen durchgeführt werden.

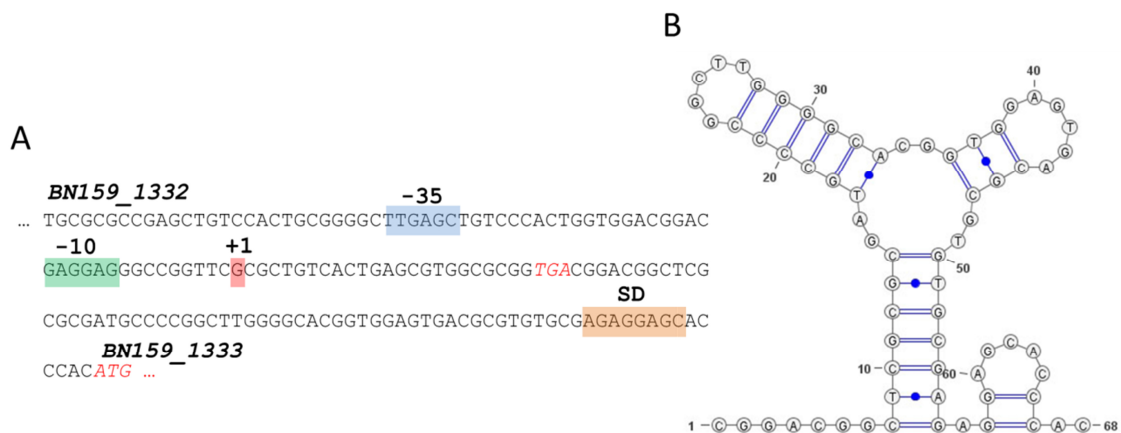
Dagegen scheint das *S. davawensis* Dodecin unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress eine Rolle zu spielen. Die differentielle Transkriptomanalyse des mit Plumbagin behandelten und in der exponentiellen Wachstumsphase geernteten *S. davawensis* Wildtyps zeigte, dass Dodecin im Vergleich zum Kontrollversuch etwa 4,3-fach erhöht transkribiert wurde. Interessanterweise waren die Gene des stromaufwärts gelegenen *egt*-Operons (*BN159\_1330-1331*) zur Biosynthese von Ergothionein ebenfalls in ähnlicher Stärke verstärkt transkribiert (5,4-fach bzw. 6,4-fach). Ergothionein ist ein Antioxidans, welches im Zuge des oxidativen Stresses in einigen Pilzen, Actinobakterien und Cyanobakterien produziert wird, darunter auch *S. coelicolor* A3(2) (Genghof *et al.*, 1956; Genghof & Vandamme, 1964; Pfeiffer *et al.*, 2011; Nakajima *et al.*, 2015). Genomanalysen haben gezeigt, dass die *egt*-Gene *SCO0910-SCO0913* (Nakajima *et al.*, 2015) im Genom von *S. coelicolor* ebenfalls stromaufwärts des Dodecin-Gens lokalisiert sind (Abb. 13). In *S. coelicolor* ist lediglich ein zusätzliches Gen (*SCO0914*), welches für einen Zuckertransporter kodiert, revers zwischen dem *egt*-Operon und dem Dodecin-Gen lokalisiert. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass die Lage des Dodecin-Gens zum *egt*-Operon in beiden Streptomyzetenstämmen konserviert ist. Dagegen liegt das *egt*-Operon im pathogenen *M. tuberculosis* an einer ganz anderen Stelle im Genom, weshalb die Lage der *egt*-Gene zum Dodecin-Gen innerhalb der Actinobakterien nicht konserviert zu sein scheint.

In *M. tuberculosis* wurde gezeigt, dass die Ergothioneinbiosynthese durch ein Redoxsensorprotein WhiB3 reguliert wird (Saini *et al.*, 2016). WhiB3 fungiert hierbei als Repressor und gibt die Promotorsequenz des *egt*-Operons frei, sobald das 4Fe-4S-Zentrum z. B. durch reaktive Sauerstoffderivate oxidiert wird und WhiB3 seine Konformation ändert. Nach Behandlung mit Plumbagin war in *S. davawensis* Wildtyp ebenfalls die Transkription eines *wbl* (*WhiB like*)-Gens reprimiert, dessen Genprodukt jedoch nur zu 44 % mit dem des *M. tuberculosis* WhiB3 (*Rv3416*) identisch ist. Mehr Übereinstimmungen besitzt das *S. davawensis* Wbl Protein mit dem *M. tuberculosis* WhiB1 (*Rv3219*, 73%), dem *S. coelicolor* WblE (*SCO5240*, 98%), dem *Corynebacterium glutamicum* WhcE (*egp\_0878*; 73%) sowie dem WblE aus *Bifidobacterium longum* (*BL1011*; 69%). (Garg *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2005; Averina *et al.*, 2012). Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gene von WblE aus *B. longum* als auch von WhcE aus *C. glutamicum* im Verlauf der stationären Wachstumsphase exprimiert werden und deren Expression sowie auch die des Gens von *M. tuberculosis* WhiB1 durch oxidativen Stress reguliert wird (Kim *et al.*, 2005; Alam *et al.*, 2009; Averina *et al.*, 2012). Es ist daher anzunehmen, dass das *S. davawensis* Wbl (WblE) ähnlich wie das *M. tuberculosis* WhiB3 die Transkription des *egt*-Operons unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress reguliert.

Die Tatsache, dass das *S. davawensis* Dodecin-Gen als auch zwei der Ergothioneinbiosynthesegene nach Behandlung mit Plumbagin mehr oder weniger gleich stark transkribiert wurden, deutet auf eine Co-Regulation der Gene hin. Sequenzanalysen des *S. davawensis* Genoms wiesen zwar nach, dass Dodecin durch ein einzelständiges Gen mit einer eigenen Promotorsequenz kodiert wird (Abb. 42), die putative -10 (GAGGAG) als auch -35 (TTGAGC) Promotorregion ist jedoch im stromaufwärts gelegenen Gen *egtD* (*BN159\_1332*) lokalisiert. Der putative Transkriptionsstartpunkt

des Dodecin-Gens ist ebenfalls im Gen *egtD* lokalisiert. Mittels mFold (Zuker, 2003) wurde in der nicht-kodierenden Genomsequenz zwischen *egt*-Operon und dem Dodecin-Gen, also der putativen Terminationsregion des *egt*-Operons, eine Haarnadelstruktur identifiziert. Da es sich hierbei höchstwahrscheinlich um eine Rho-unabhängige Transkriptionstermination handeln muss, wird demnach eine Co-Transkription des *egt*-Operons mit dem Dodecin-Gen unter oxidativem Stress ausgeschlossen.

Aufgrund der, wie bereits erwähnten, ähnlich hohen Transkriptionsraten könnte stattdessen vermutet werden, dass das *egt*-Operon als auch das Dodecin-Gen unter transkriptionaler Kontrolle des WblE Transkriptionsfaktors stehen, dessen Genexpression durch Plumbagin reguliert wird. Dies konnte anhand von Transkriptomanalysen der Plumbagin-behandelten Dodecin-Disruptionsmutante jedoch nicht verifiziert werden. In der Disruptionsmutante waren die Gene des *egt*-Operons nicht erhöht transkribiert. Wäre WblE ein nur durch Plumbagin abhängiger Transkriptionsregulator, der die Expression des Dodecin-Gens und der *egt*-Gene induziert, hätte das *egt*-Operon bei gleichen Plumbaginkonzentrationen auch in der Disruptionsmutante reguliert sein müssen. Die im *S. davawensis* Wildtyp induzierte *egt*-Expression muss demnach in direkter Verbindung zur Expression von Dodecin und/oder zu dessen Funktion stehen. Um diese Vermutungen zu untersuchen, müssten hierzu weitere Versuche zur Plumbaginsensitivität sowie zur Transkription des *egt*-Operons als auch des Dodecin-Gens in einer *S. davawensis* *wblE*-Disruptionsmutante durchgeführt werden.



**Abbildung 42: Putativer Promotor des Dodecin-Gens sowie putative Terminator-Haarnadelstruktur des *egt*-Operons in der potentiellen 5'-UTR des Dodecin-Gens aus *S. davawensis*.** (A) Die Promotorsequenzen der -10 (grün) und der -35 (blau) Region als auch der Transkriptionsstartpunkt des Dodecin-Gens *BN159\_1333* (rot) sind im Gen *egtD* (*BN159\_1332*) des *egt*-Operons lokalisiert. Die putative Shine-Dalgarno (SD)-Sequenz des Dodecin-Gens (orange) ist 6 nt vom Startkoden ATG entfernt. Start- und Stoppkodon der Gene sind jeweils in kursiv und rot markiert. (B) Putative Haarnadelstruktur zur Transkriptionstermination des *egtABCD*-Transkripts mit Hilfe der Software mFold und Varna erstellt (Zuker, 2003; Darty *et al.*, 2009).

Es wäre anzunehmen, dass der *S. davawensis* Wildtyp gegenüber Plumbagin-induziertem oxidativen Stress aufgrund der erhöhten Expression des *egt*-Operons resistenter sein sollte. Wachstumsversuche zeigten jedoch, dass der Wildtyp in YS-Medium nur bei subletalen Konzentrationen von 15  $\mu\text{M}$  wachsen kann, während die Dodecin-Disruptionsmutante selbst bei Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$  ohne große Defizite wächst. Die verminderte Sensitivität der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante gegenüber Plumbagin-induziertem oxidativen Stress scheint somit aufgrund fehlender *egt*-Genexpression auf eine grundsätzlich anders regulierte oxidative Stressantwort hinzuweisen, bei der die Abwesenheit von Dodecin nicht nachteilig für die Zelle ist. Oder anders gesagt, die Expression des Dodecin-Gens führt vermutlich im *S. davawensis* Wildtyp im Gegensatz zur Dodecin-Disruptionsmutante zu erhöhtem oxidativen Stress oder einem möglichen wachstumsinhibierenden Nährstoffmangel.

Studien haben gezeigt, dass Dodecin aus *H. salinarum* oxidiertes und angeregtes RF mit Hilfe eines gekoppelten Elektronen- und Protonentransfers regenerieren kann (Staudt *et al.*, 2012). Flavine sind aufgrund ihres reaktiven Isoalloxazin-Ringsystems gute Zielmoleküle für reaktive Sauerstoffderivate. Die Behandlung von Zellen mit Plumbagin erzeugt oxidativen Stress, was zu einem Anstieg intrazellulär oxidiertes und angeregter Flavine führt. Bakterielle Dodecine binden wie auch archaeale Dodecine Flavine im oxidierten Zustand (Meissner *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011a). Es wäre daher vorstellbar, dass die erhöhte Transkription des *S. davawensis* Dodecin-Gens eine Folge der erhöhten Mengen oxidiertes und angeregter Flavine und damit eine Folge von oxidativem Stress ist.

Transkriptom- und Proteomanalysen in Organismen, die kein Dodecin-Gen besitzen, ergaben, dass die Induktion von oxidativem Stress und gleichzeitiger Inhibition der Zellatmung mittels Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Cyanid oder Plumbagin zu einer erhöhten Genexpression von Flavin-Reduktasen führt. Untersuchungen in *E. coli* wiesen nach, dass  $\text{FADH}_2$  Eisenionen ( $\text{Fe}^{3+}$ ) reduziert, was in einer Fenton-Reaktion mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  die Bildung von Hydroxylradikalen ( $\text{OH}^\cdot$ ) zur Folge hat. Diese Radikale sind sehr reaktiv und können zu Basenmodifikationen oder Strangbrüchen führen (Hutchinson, 1985; Aruoma *et al.*, 1989). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Flavin-Reduktase Fre unter oxidativem Stress für eine Neubildung von  $\text{FADH}_2$  sorgt, wenn die NADH-Dehydrogenase der Atmungskette gleichzeitig inhibiert ist. Die vermehrte Produktion von  $\text{OH}^\cdot$  führt in *E. coli* zu DNA-Schäden, welche wachstumsinhibierend sind. Eine *fre*-Mutante war  $\text{H}_2\text{O}_2$ -resistent (Woodmansee & Imlay, 2002). In *B. subtilis* wurden nach Plumbaginbehandlung vermehrt die Gene der FMN-Reduktasen NfrA1 und NfrA2 transkribiert (Reddy *et al.*, 2015). Die durch oxidativen Stress generierten oxidierten Flavine wurden in diesen Bakterien demnach ständig wieder reduziert.

Die differentiellen Transkriptomanalysen von *S. davawensis* Wildtyp nach Plumbaginbehandlung zeigten aber weder eine erhöhte Transkription von Flavin-Reduktasen noch die von RF-Synthesegenen oder von Genen einer Flavokinase oder FAD-Synthetase. Dies lässt darauf schließen, dass RF bzw. FMN und FAD nicht verstärkt synthetisiert und oxidierte Flavine anders als in *E. coli* und *B. subtilis* nicht in einem kontinuierlichen Zyklus reduziert wurden. Es ist anzunehmen, dass die oxidierten Flavine größtenteils durch die erhöhte Menge an Dodecin gebunden und somit der Zelle entzogen wurden. Obwohl vermutet wird, dass bakterielle Dodecine angeregte Flavine nicht so gut quenchen wie archaeale Dodecine (Staudt *et al.*, 2012), wären diese im *S. davawensis* Dodecin vor generierten ROS geschützt und würden vermutlich auch

wieder regeneriert. Das in der durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  getriebenen Fenton-Reaktion entstehende  $\text{Fe}^{3+}$  könnte jedoch durch fehlende reduzierte Flavine nicht wieder reduziert werden. Die Transkriptomanalyse ergab, dass während der exponentiellen Wachstumsphase verstärkt Gene von Siderophoren exprimiert wurden. Hierdurch wurde höchstwahrscheinlich der Mangel an  $\text{Fe}^{2+}$  ausgeglichen und der Elektronen-Donor der Fenton-Reaktion gesichert. Die Folgen für den *S. davawensis* Wildtyp wären demnach sowohl ein durch Dodecin verursachter Flavinmangel als auch weitere durch ROS induzierte Zellschäden wie beispielsweise durch  $\text{OH}^\cdot$  induzierte DNA-Schäden. Das Wachstum von *S. davawensis* wäre dadurch stark eingeschränkt und würde den Plumbagin-sensitiven Phänotyp erklären.

In der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante war nach Plumbaginbehandlung ebenfalls keine veränderte Genexpression von Flavin-Reduktasen feststellbar. Dementsprechend würden die oxidierten Flavine in Abwesenheit von Dodecin entweder frei im Cytoplasma vorliegen oder von anderen Proteinen gebunden sein und wären somit potentielle Zielmoleküle für ROS. Es wird vermutet, dass eine erhöhte Menge an oxidierten und/oder angeregten Flavinen die veränderte oxidative Stressantwort nach Plumbaginbehandlung in der Dodecin-Disruptionsmutante bewirkt. Da die Disruptionsmutante vermutlich ohne Dodecin keinen Flavinmangel aufweist und so lebensfähig bliebe, würde durch generierte ROS die OxyRS- und/oder SoxRS-abhängige Stressantwort aktiviert. Zwar waren in der Disruptionsmutante keine Gene einer  $\text{O}_2^-$ -abbauenden Superoxid-Dismutase verändert exprimiert, dafür jedoch vermehrt Gene von Katalasen und/oder Peroxidasen sowie von Bacterioferritin. Es wurde beispielsweise die signifikant erhöhte Transkription eines Bacterioferritins nachgewiesen, dessen Genprodukt 61% Sequenzähnlichkeit mit dem des *M. tuberculosis* (*Rv1876*) und 63% Sequenzähnlichkeit mit dem des *Mycobacterium smegmatis* (*MSMEG\_3564*) Bacterioferritins besitzt (Gupta *et al.*, 2008; Janowski *et al.*, 2008). Bacterioferritine bauen  $\text{H}_2\text{O}_2$  ab, indem sie  $\text{Fe}^{2+}$  oxidieren und gleichzeitig binden, die normalerweise im Verlauf einer Fenton-Reaktion weitere ROS produzierten (Lee *et al.*, 2016). Weiterhin wurde in der Dodecin-Disruptionsmutante die erhöhte Transkription des Gens einer ebenfalls in *Streptomyces venezuelae* kodierten Bromoperoxidase-Katalase (*SVEN\_4860*; 91% Sequenzähnlichkeit) als auch einer in *Streptomyces reticuli* kodierten CpeB Katalase-Peroxidase (87% Sequenzähnlichkeit) (Facey *et al.*, 1996; Zou *et al.*, 1999) nachgewiesen. Das Gen von CpeB aus *S. reticuli* liegt in einem Operon stromabwärts des für das Regulatorprotein FurS (*ferric uptake regulator*) kodierenden Gens, welches seine eigene Transkription als auch die des Gens CpeB durch Bindung von  $\text{Fe}^{2+}$  reguliert (Ortiz de Orué Lucana & Schrepf, 2000). In der Dodecin-Disruptionsmutante war ebenfalls die Transkription eines *furS*-ähnlichen Gens erhöht, das genau stromaufwärts vom *S. davawensis* *cpeB* lokalisiert ist. Da das *S. davawensis* FurS 89% Sequenzähnlichkeit mit dem des *S. reticuli* FurS besitzt, wird angenommen, dass dieses eine ähnliche Funktion in *S. davawensis* besitzt. Fur-Proteine regulieren in vielen Bakterien zusammen mit dem Co-Repressor  $\text{Fe}^{2+}$  die Expression von Eisenaufnahmeproteinen, wie z. B. Siderophoren (Escolar *et al.*, 1999; Cornelis *et al.*, 2011). Tatsächlich waren in der Dodecin-Disruptionsmutante während der stationären Wachstumsphase unter Plumbagin-induziertem oxidativen Stress besonders die Transkription vieler Gene von Siderophoren und deren Transportern erhöht. Demnach schien die Dodecin-Disruptionsmutante während der stationären Wachstumsphase unter Eisenmangel zu stehen. Betrachtet man die Gene, die in der

exponentiellen Wachstumsphase während des durch Plumbagin induzierten oxidativen Stresses vermehrt exprimiert werden, handelt es sich dabei um Proteine und Enzyme, die Häm-Gruppen mit einem zentralen  $\text{Fe}^{2+}$  als aktives Zentrum besitzen (z. B. Bromoperoxidase-Katalase, CpeB) oder  $\text{Fe}^{2+}$  zur Reduktion von reaktiven Sauerstoffderivaten verwenden (z. B. Bacterioferritin). Da nicht auszuschließen ist, dass neben dem enzymkatalysierten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Abbau dennoch die Fenton-Reaktion abläuft, käme es somit in der Disruptionsmutante durch einen erhöhten Einbau bzw. Verbrauch von  $\text{Fe}^{2+}$  zu einem  $\text{Fe}^{2+}$ -Mangel. Hierdurch würde der Co-Repressor  $\text{Fe}^{2+}$  dem Transkriptionsfaktor FurS entzogen, welcher wiederum durch Änderung seiner Konformation die Promotorsequenzen der Gene von Siderophor-Syntheseproteinen und -Transportern zur Expression freigebe. Das Gen *furS* war in der Disruptionsmutante erhöht exprimiert, da in der stationären Wachstumsphase höchstwahrscheinlich wieder genug  $\text{Fe}^{2+}$  in die Zelle importiert wurde. Hierdurch wäre es der Zelle schließlich möglich, die Siderophor-Expression und somit auch den Eisenimport wieder zu inhibieren. Die Stressantwort der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante hätte somit zur Folge, dass die intrazelluläre Konzentration von OH<sup>-</sup> als auch der Anteil an durch OH<sup>-</sup> beschädigter chromosomaler DNA relativ gering wäre. Die Transkriptomanalysen lassen aber auch darauf schließen, dass in der Dodecin-Disruptionsmutante beschädigte DNA besser geschützt und repariert wird als im Wildtyp. Anders als im *S. davawensis* Wildtyp waren in der exponentiellen als auch in der stationären Wachstumsphase Gene von DNA-Reparaturproteinen reguliert, darunter Bacterioferritin und DNA-Endo-/Exonukleasen. Während letztere einzelne mutierte oder zusätzlich eingebaute Basen entfernen können, sind Bacterioferritine in der Lage, als eine Art Chaperon die DNA vor Schäden durch OH<sup>-</sup> zu schützen (Lee *et al.*, 2016). Die Dodecin-Disruptionsmutante besäße demnach gegenüber dem Wildtyp eindeutig einen Wachstumsvorteil, da sie aufgrund eines vermutlich relativ normalen Flavinstoffwechsels als auch intakter DNA replikations- und teilungsfähig bliebe.

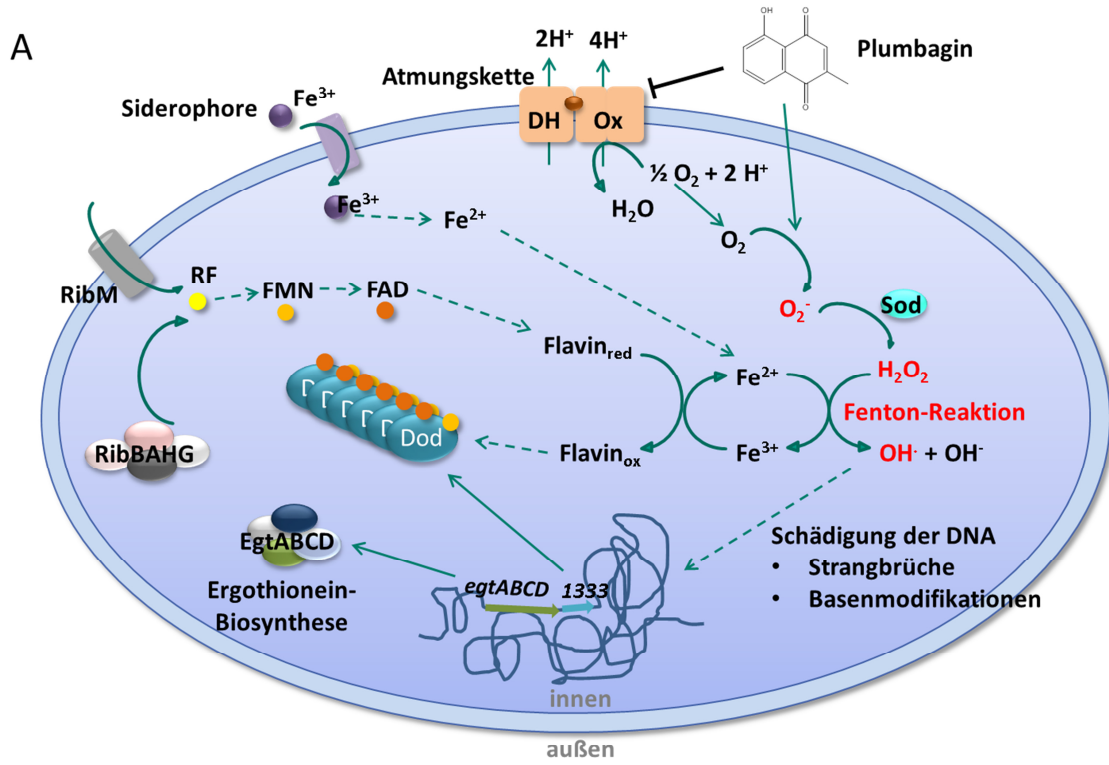
Darüber hinaus waren in der Disruptionsmutante anders als im Wildtyp zusätzlich weitere Gene reguliert, deren Produkte in der allgemeinen oxidativen Stressantwort beteiligt sind. Darunter befanden sich z. B. die Gene der Chaperone GroEL und GroES und die einer putativen Thiosulfat-Reduktase. Studien wiesen nach, dass GroEL/ES durch Oxidation inaktivierte Rhodanese, welche als Thiosulfat-Reduktase während oxidativen Stresses das Mycothion-Pendant Glutathion in *Azotobacter vinelandii* regeneriert, selbst wieder reaktiviert (Melkani *et al.*, 2004; Remelli *et al.*, 2012). Die *S. davawensis* Thiosulfat-Reduktase ist der Rhodanese RhIA (*SSCG\_01126*) von *Streptomyces clavuligerus* zu 89% ähnlich (Nardiz *et al.*, 2011). Es wird deshalb angenommen, dass in der Dodecin-Disruptionsmutante die Chaperone GroEL/ES und die Thiosulfat-Reduktase (Rhodanese) an der Mycothion-Regeneration während durch Plumbagin induziertem oxidativen Stress beteiligt sind. Daraus ließe sich wiederum vermuten, dass das Antioxidans Mycothiol in der Dodecin-Disruptionsmutante anders als im Wildtyp eine wichtigere Rolle als Ergothionein einnehmen würde. Dies stünde jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen in *S. coelicolor* A3(2), in denen gezeigt wurde, dass Ergothionein ein potenteres Reduktionsmittel zu sein scheint als Mycothiol (Nakajima *et al.*, 2015). Aus den bisherigen Ergebnissen und Diskussionspunkten ist jedoch eher zu schließen, dass der oxidative Stress in der Dodecin-Disruptionsmutante weniger schädlich zu sein scheint als im *S. davawensis* Wildtyp. Da der oxidative Stress im *S. davawensis* Wildtyp durch eine verminderte Stressantwort und dem vermutlich



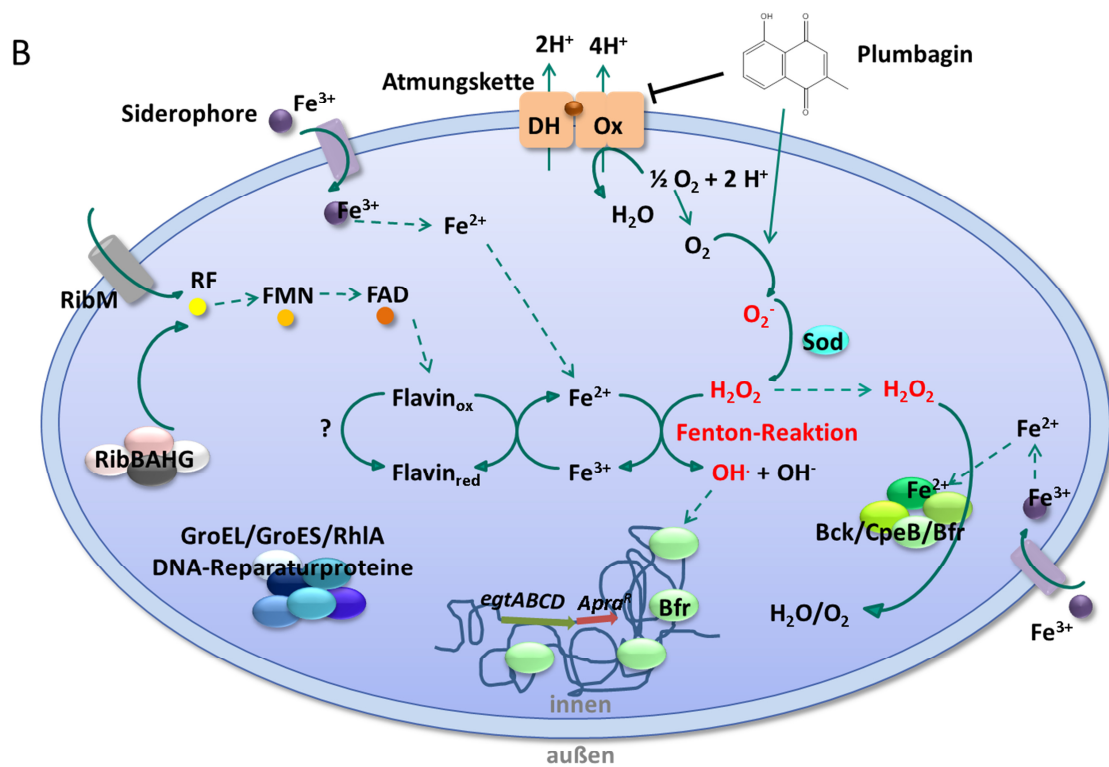
zusätzlich durch Dodecin verursachten Flavinmangel sehr viel größer ist als in der Dodecin-Disruptionsmutante, wurden im Wildtyp vermutlich auch die Gene der Ergothioneinbiosynthese erhöht exprimiert. Die chromosomale Lokalisation des Dodecin-Gens zu der des *egt*-Operons scheint in *S. davawensis* somit eine funktionelle Konservierung zu sein. Ein Schema der putativen oxidativen Stressantwort auf Plumbagin im *S. davawensis* Wildtyp als auch der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante ist in Abbildung 43 dargestellt.

Da die Produktion von Dodecin durch Plumbagin induzierten oxidativen Stress starke Wachstumshemmungen zur Folge hat, ist bisher nicht ersichtlich, welche übergeordnete Funktion Dodecin in *S. davawensis* einnimmt. Es könnte vermutet werden, dass Dodecin in *S. davawensis* Teil eines programmierten Zelltods ist. Die Abwesenheit von Dodecin führt bei gleichen extrazellulären oxidativen Stressbedingungen nur durch Regulation einer anderen Stressantwort dazu, dass die Zelle lebensfähig bleibt. Frühere Studien wiesen bereits nach, dass einzelne Gene die Lebensfähigkeit einer Zelle in Anwesenheit eines bestimmten letalen Faktors dramatisch beeinflussen können (Lewis, 2000). Beispiele hierfür sind *vncS* aus *Streptococcus pneumoniae* (Novak *et al.*, 1999) sowie *sulA*, *hip*, *mar* und *fre* aus *E. coli* (Piddock & Walters, 1992; Black *et al.*, 1994; Goldman *et al.*, 1996; Woodmansee & Imlay, 2002). Dabei müssen die Genprodukte nicht einmal selbst den programmierten Zelltod einleiten, sondern können beispielsweise die Expression anderer daran beteiligter Gene beeinflussen (Novak *et al.*, 1999). In Hinblick auf weitere Untersuchungen sind daher noch viele Fragen zu klären, die über den Zeitrahmen dieser Arbeit hinausgegangen wären. Sollte Dodecin wirklich im programmierten Zelltod beteiligt sein, wäre dies in Betracht dessen, dass Dodecin vor allem auch in vielen pathogenen Bakterien wie *M. tuberculosis* und *Pseudomonas aeruginosa* zu finden ist, ein guter Ansatzpunkt zur Erstellung neuer antimikrobieller Therapien.

**Abbildung 43: Putative Folgen der durch Plumbagin induzierten oxidativen Stressantwort (A) in *S. davawensis* Wildtyp und (B) in der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante (Abbildung auf folgender Seite).** (A) Plumbagin inhibiert im *S. davawensis* Wildtyp die Atmungskette, was zur Bildung von sogenannten Superoxidanionradikalen ( $O_2^-$ ) führt.  $O_2^-$  wird mittels Superoxid-Dismutase (Sod) in Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) umgewandelt, was in einer Fenton-Reaktion mit reduzierten Eisenionen ( $Fe^{2+}$ ) zu DNA-schädigenden Hydroxylradikalen ( $OH^\cdot$ ) umgesetzt wird. Trotz Flavinproduktion durch Enzyme der Riboflavinbiosynthese RibBAHG kommt es aufgrund der Bindung oxidierter Flavine von Dodecin (Dod, 1333) zu einem relativen Flavinmangel. Eisenionen ( $Fe^{3+}$ ) der Fenton-Reaktion können ohne reduzierte Flavine nicht zu  $Fe^{2+}$  reduziert werden. Der  $Fe^{2+}$ -Mangel wird durch gesteigerten Eisenimport mit Hilfe von Siderophoren ausgeglichen. Der dadurch erhöhte oxidative Stress führt zur Aktivierung des Ergothioneinbiosynthese-Operons (*egtABCD*). Durch Flavinmangel und oxidative Zellschäden, welche aufgrund von  $OH^\cdot$  entstehen, ist der Wildtyp nicht mehr replikations- und teilungsfähig. (B) In der *S. davawensis* Dodecin-Disruptionsmutante wird ein Großteil von  $H_2O_2$  über Katalasen, Peroxidasen und Bacterioferritin (Bck, CpeB, Bfr) abgebaut, während nur ein geringer Anteil in  $OH^\cdot$  umgewandelt wird. Der hohe Verbrauch von  $Fe^{2+}$  für eisenabhängige Enzyme und durch die Fenton-Reaktion wird durch den Eisenimport mit Hilfe von Siderophoren ausgeglichen. Die chromosomale DNA wird vor möglichen Schäden mit Hilfe von Bacterioferritin geschützt und bereits entstandene Strangbrüche oder Basenmodifikationen durch DNA-Reparaturproteine repariert. Weitere Schutzproteine wie Chaperone (GroEL/ES) und die putativ in der Mycothion-Regeneration involvierte Thiosulfat-Reduktase (RhlA) tragen zusätzlich zur Plumbagin-Resistenz der Dodecin-Disruptionsmutante bei.



*Streptomyces davawensis* JCM4913 Wildtyp



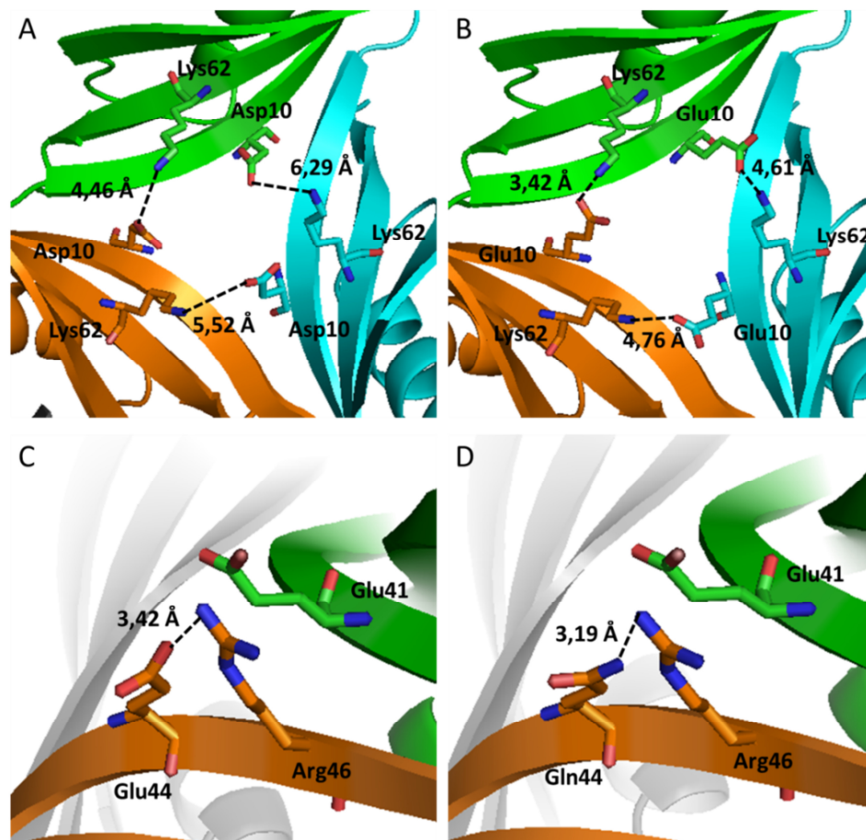
*Streptomyces davawensis* JCM4913 Dodecin-Disruptionsmutante

### 6.1.3 Biochemischer Vergleich der Dodecine von *S. davawensis* JCM4913 und *S. coelicolor* A3(2)

Mit Hinblick auf die höchstwahrscheinlich unterschiedlichen Funktionen im Flavinstoffwechsel und in der oxidativen Stressantwort der Dodecine von *S. davawensis* und *S. coelicolor*, sollten die beiden Proteine auch bezüglich ihrer biochemischen Eigenschaften miteinander verglichen werden. Hierzu wurden die Dodecine zunächst auf ihre Dodecamer-Stabilität und ihre flavinbindenden Eigenschaften u. a. mit Hilfe von Dodecin-Punktmutanten als auch im Besonderen durch Auflösung der Proteinkristallstruktur des *S. davawensis* Dodecins untersucht.

Die Vermutung unterschiedlicher zellulärer Funktionen wurde zusätzlich durch die Beobachtung unterstützt, dass die Dodecine beider Streptomyzetenstämme trotz einer Sequenzübereinstimmung von 72% unterschiedliche Stabilitäten in ihrer dodecameren Proteinstruktur aufweisen. Dies wurde gezeigt, nachdem die Dodecine in *E. coli* Rosetta 2(DE3) heterolog überproduziert und mittels Affinitätschromatographie bis zur apparenten Homogenität gereinigt wurden. Während das *S. davawensis* Dodecin mit Hilfe einer denaturierenden Gelelektrophorese in einem Polyacrylamid (PA)-Gel nur als Monomer aufgetrennt wurde, lag das *S. coelicolor* Dodecin als Dodecamer und sogar z. T. als aggregierte Dodecamere vor. Chemische Behandlungen mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS), den Disulfidbrücken-reduzierenden Chemikalien Dithiothreitol und  $\beta$ -Mercaptoethanol als auch mit dem Komplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) unter gleichzeitiger Hitzeeinwirkung besaßen so gut wie keinen Einfluss auf die Stabilität des Multimers. Erst die Behandlung mit der chaotropen Verbindung Harnstoff und zusätzlicher Hitzeeinwirkung ließ *S. coelicolor* Dodecin in seine Monomere zerfallen. Ohne zusätzliche Hitzeeinwirkung tolerierte das Dodecin Harnstoffkonzentrationen bis 8 M. *S. coelicolor* Dodecin ist somit nachweislich sehr viel thermo- und salzstabiler als das *S. davawensis* Dodecin. Ähnliches wurde auch für das *M. tuberculosis* Dodecin festgestellt, welches ebenfalls thermostabil ist und Salzkonzentrationen bis 5 M NaCl toleriert (Liu *et al.*, 2011a). In dieser Studie wurde herausgefunden, dass die Stabilität des *M. tuberculosis* Dodecins vorwiegend auf drei Salzbrücken zwischen den Aminosäuren E10-K62, R29-D69 und E41-R46 beruht. Proteinsequenzvergleiche des *M. tuberculosis* Dodecins mit denen der Streptomyzeten Dodecine zeigten, dass sich das *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin zwar gemeinsam in der dritten Salzbrücke R29-E69 von der des *M. tuberculosis* Dodecins unterscheiden, sich das *S. davawensis* jedoch allein nur in der ersten Salzbrücke D10-K62 von den anderen beiden Dodecinen unterscheidet. Es war daher anzunehmen, dass Aspartat an der Sequenzposition 10 die thermische und salzbedingte Instabilität des *S. davawensis* Dodecins hervorruft. Tatsächlich wies eine *S. davawensis* Dodecin-Punktmutante, die Glutamat anstelle von Aspartat an Position 10 besitzt (*Sdav*(D10E)), eine erhöhte thermische Stabilität auf und lag in einem denaturierenden PA-Gel als Dodecamer vor. Ein zweiter Aminosäureaustausch (K62A), resultierend in *Sdav*(D10E/K62A), destabilisierte das *S. davawensis* Dodecin wieder. Eine *S. coelicolor* Dodecin-Punktmutante mit Aminosäureaustausch Lysin gegen Alanin an Position 62 (*Scoel*(K62A)) war gleichermaßen destabilisiert. Anhand der in dieser Arbeit gelösten *S. davawensis* Dodecin Kristallstruktur kann gezeigt werden, dass die zusätzliche Methylengruppe am Aminosäurerest des Glutamats in *Sdav*(D10E) demnach die ionische Wechselwirkung zu K62 von durchschnittlich 5,32 Å auf 4,26 Å verkürzt

(Abb. 44, A und B). Es ist demnach schwerer, diese energetisch aufzubrechen, weshalb das Dodecamer der Punktmutante *Sdav*(D10E) und das des *S. coelicolor* Wildtyp-Dodecins thermisch stabiler ist.



**Abbildung 44: Strukturanalyse der *S. davawensis* Dodecin-Punktmutanten *Sdav*(D10E) und *Sdav*(E44Q) mit *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin.** Durch Mutation der Aminosäure 10 von (A) Aspartat (D10) im *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin in (B) Glutamat (E10) in *Sdav*(D10E) verkürzen sich die Abstände der Salzbrücken-bildenden Aminosäurereste und die dodecamere Struktur wird stabilisiert. (C) Die Carboxylgruppe von Glutamat 44 (E44) im *S. davawensis* Dodecin lenkt den Aminosäurerest von Arginin 46 (R46) ab, welches mit Glutamat 41 (E41) eine Salzbrücke aufbaut. Durch Mutation von E44 in (D) Glutamin 44 (Q44) wird der Aminosäurerest von R46 in *Sdav*(E44Q) in Richtung E41 abgestoßen. Hierdurch wird die Salzbrücke verstärkt und die dodecamere Struktur stabilisiert. Die Simulationen der Aminosäuremutationen und die Berechnungen der Abstände zwischen den Aminosäureresten wurden mit Pymol erstellt.

Um weitere Aminosäuren zu identifizieren, die zur Stabilität des Dodecamers von *S. coelicolor* beitragen, wurde die Sequenz des *S. davawensis* Dodecins schrittweise mittels *site-directed* Mutagenese der des *S. coelicolor* Dodecins angepasst. Interessanterweise zeigten Analysen mittels Größenausschlusschromatographie, dass jede Dodecin-Punktmutante wie auch das *S. davawensis* Wildtyp-Dodecin als Dodecamer vorlag. Analysen mittels nativer *Blue Native* (BN)-Gelelektrophorese zeigten jedoch, dass nur *Sdav*(D10E) und die Dodecin-Punktmutante *Sdav*(E44Q) als Dodecamer stabilisiert waren. Während Proteine mittels Größenausschlusschromatographie rein nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden, werden Proteine in der BN-Gelelektrophorese zusätzlich durch den Farbstoff Coomassie G-250 negativ geladen. Dies kann zu verschiedenem Laufverhalten von Proteinen führen und

die unterschiedlichen Ergebnisse beider nativer Analysemethoden erklären. Mit Hilfe der BN-Gelelektrophorese konnte so für die Dodecin-Punktmutante *Sdav*(E44Q) eine Stabilisierung der Multimerisierung nachgewiesen werden. Die Proteinkristallstruktur des *S. davawensis* Dodecins zeigt, dass die Aminosäure an Position 44 in möglicher Wechselwirkung mit dem benachbarten Arginin an Position 46 in der Flavinbindetasche steht. Wie bereits erwähnt, bildet R46 des einen Monomers in einem Dodecin-Trimer mit E41 des zweiten Monomers eine Salzbrücke. Das benachbarte E44 in *S. davawensis* Dodecin ist aber ungünstig auf diese Salzbrücke ausgerichtet. Die Carboxylgruppe von E44 ist nur ca. 3,42 Å von der Aminogruppe von R46 entfernt und schwächt so die ionische Wechselwirkung zwischen den beiden Monomeren (Abb. 44, C). In einer Simulation der Punktmutante *Sdav*(E44Q) zeigt dagegen die Aminogruppe von Q44 in einem Abstand von 3,19 Å auf R46 und stößt deren Aminosäurerest in Richtung der Carboxylgruppe von E41. Hierdurch würde die ionische Wechselwirkung zwischen diesen beiden Aminosäuren wieder verstärkt (Abb. 44, D). Das Dodecamer von *Sdav*(E44Q) ist somit stabiler als das des *S. davawensis* Wildtyp-Dodecins. Aufgrund dessen, dass in dieser Mutante dennoch nur zwei Salzbrücken bestehen (R29-D69, E41-R46), ist *Sdav*(E44Q) nativ zwar stabiler, thermisch aber dennoch instabiler als *Sdav*(D10E), welches zwei starke Salzbrücken (E10-K62, R29-D69) und eine durch D10 beeinflusste schwache Salzbrücke (E41-R46) besitzt. Umgekehrt war das Dodecamer einer *S. coelicolor* Punktmutante *Scoel*(Q44E) nicht destabilisiert, da dieses hauptsächlich durch die Salzbrücken E10-K62 und R29-E69 gehalten wird. Die zum R46 benachbarte Aminosäure E44 schwächt die ionische Wechselwirkung zwischen E41-R46 nur mäßig. Wird jedoch zusätzlich auch die ionische Wechselwirkung zwischen E10 und K62 gestört (*Scoel*(Q44E/K62A)), zerfällt das *S. coelicolor* Dodecin völlig zu Trimere. Wie auch im *M. tuberculosis* Dodecin scheinen demnach auch im *S. coelicolor* Dodecin vorwiegend Salzbrücken die thermische und salzbedingte Stabilität hervorzurufen (Liu *et al.*, 2011a). Darüber hinaus zeigten aber die Mutationsanalysen dieser Arbeit, dass nicht nur die an den Salzbrücken beteiligten Aminosäuren, sondern auch die diese umgebenden Aminosäuren einen wesentlichen Anteil an der Stabilität der dodecameren Struktur beitragen.

Die Instabilität des dodecameren *S. davawensis* Dodecins ist darüber hinaus vermutlich auf weitere strukturelle Unterschiede zum *M. tuberculosis* bzw. *S. coelicolor* Dodecin zurückzuführen. Die Analysen der Proteinkristallstruktur weisen darauf hin, dass die Ionenbindung im Ionenkanal 1 des *S. davawensis* Dodecins im Vergleich zum *M. tuberculosis* Dodecin möglicherweise geschwächt oder sogar gestört ist. Hierbei konnte dargestellt werden, dass der Abstand vom ionenbindenden Asparagin an Position 20 (D20) des Trimers zum gebundenen Ion im Zentrum des Ionenkanals durchschnittlich mit 6,02 Å größer ist als im *M. tuberculosis* Dodecin (5,09 Å). Wird angenommen, dass dies wirklich zu einer Bindungsschwäche oder sogar zum Verlust der Ionenbindung führt, würde der Ionenkanal 1 nicht mehr durch Protein-Ionen-Wechselwirkungen sondern nur noch durch Protein-Protein-Wechselwirkungen gehalten werden. Der Ionenkanal 1 wäre destabilisiert und könnte mit weniger Energieverlust aufgebrochen werden. Darüber hinaus scheint der Ionenkanal 1 des *S. davawensis* Dodecins gegenüber dem *M. tuberculosis* Dodecin asymmetrisch aufgebaut zu sein. Während in letzterem die Abstände des D20 eines Monomers jeden Trimers zum Zentrum des Ionenkanals etwa gleich sind (maximal 0,1 Å Unterschied), ist in *S. davawensis* Dodecin jeweils ein D20 eines Trimers mehr als 0,3 bis 0,7 Å vom

Ionenkanalzentrum entfernt als die anderen. Bezieht man hierzu zusätzlich die erhöhte Oberflächenpolarität des *S. davawensis* Dodecins gegenüber dem *M. tuberculosis* Dodecin mit ein, könnte bei geschwächter bzw. gestörter Ionenbindung, einem asymmetrischen Aufbau sowie zusätzlich erhöhter Polarität (Hydrophilie) die Interaktion zwischen Protein und umgebendem Lösungsmittel erhöht werden. Hierdurch könnten beispielsweise vermehrt Ionen oder andere gelöste Substanzen in das Dodecin-Dodecamer eindringen, was letztendlich zur erhöhten Instabilität des dodecameren *S. davawensis* Dodecins führen würde.

Untersuchungen an thermo- und salzstabilen Proteinen haben ergeben, dass deren Stabilität durch verschiedene strukturelle Eigenschaften hervorgerufen werden kann. Dies können z. B. ein hoher Oligomerisierungsgrad, erweiterte Sekundärstrukturen, kürzere Proteinschleifen (*loops*), ein erhöhter Anteil an Prolin und ein geringer Anteil an Glutamin, eine hohe Anzahl intramolekularer Ionenpaarungen (Salzbrücken), ein geringer Anteil hydrophober Aminosäurereste sowie eine verminderte Kontaktfläche zwischen Proteinoberfläche und umgebendem Lösungsmittel sein (Pieper *et al.*, 1998; Cambillau & Claverie, 2000; Jaenicke, 2000; Luke *et al.*, 2007; Esclapez *et al.*, 2007; Tadeo *et al.*, 2009). Das *M. tuberculosis*, *S. coelicolor* und *S. davawensis* Dodecin sind sich strukturell jedoch sehr ähnlich und der Anteil an Prolin (eines pro Monomer) und Glutamin (vier bis sechs pro Monomer) ist für alle Dodecine relativ gleich. In dieser Arbeit wurde jedoch gezeigt, dass das *S. davawensis* Dodecin trotz einer hydrophileren Proteinoberfläche instabiler ist als das *M. tuberculosis* und *S. coelicolor* Dodecin. Anhand von Proteinstrukturanalysen wurde dargelegt, dass demnach die verminderte Anzahl und Stärke der intramolekularen ionischen Wechselwirkungen als auch die Asymmetrie des *S. davawensis* Dodecins die eigentliche Ursache für die erhöhte Instabilität des dodecameren *S. davawensis* Dodecins ist.

Interessanterweise konnte aber gezeigt werden, dass die Stabilität des *S. davawensis* Dodecin-Dodecamers unter denaturierenden Bedingungen durch Zugabe von RoF stark erhöht werden konnte (Abb. 31). Da dies bei Zugabe von RF nicht der Fall war, muss dieser Effekt durch die zusätzliche Dimethylaminogruppe am C(8)-Atom des Isoalloxazin-Ringsystems von RoF liegen. Die Proteinsequenzanalysen des *S. davawensis* und *M. tuberculosis* Dodecins zeigten, dass die flavinbindenden Aminosäuren völlig miteinander übereinstimmen. Tatsächlich konnte bereits für das *M. tuberculosis* Dodecin gezeigt werden, dass auch dieses RoF bindet (Mathes *et al.*, 2009). Der Nachweis erfolgte hier ebenfalls mit einer denaturierenden PAGElektrophorese, bei der mit RoF *in vivo* beladenes und gereinigtes *M. tuberculosis* Dodecin aufgetrennt wurde. Innerhalb dieser Arbeit war es jedoch nicht möglich, eine Proteinkristallstruktur des *S. davawensis* Dodecins mit gebundenem RoF bzw. RoFMN zu erhalten. Da Flavine von Dodecinen im oxidierten Zustand gebunden werden und in reduziertem Zustand dissoziieren (Grininger *et al.*, 2009), könnte es demnach sein, dass die Bedingungen der Proteinkristallisation zu einer Reduktion der zunächst gebundenen Flavine geführt haben. Dies hätte eine Kristallisation von *S. davawensis* Dodecin und Flavinmolekülen verhindert, was auch in Studien mit dem *M. tuberculosis* Dodecin der Fall war (Liu *et al.*, 2011a). Deshalb kann nur vermutet werden, dass möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Dimethylaminogruppe von RoF und umgebenden Aminosäureresten in der Flavinbindetasche von Dodecin die dodecamere Struktur stabilisieren. Durch die zusätzliche Dimethylaminogruppe am C(8)-Atom des Isoalloxazin-Ringsystems würde dieser in der Bindungstasche mehr Platz einnehmen,

der die Abstände zwischen dem Ringsystem und den direkt benachbarten Aminosäuren verringern würde. Hierdurch müssten mehr Wassermoleküle aus der Bindungstasche verdrängt werden und hydrophobe Wechselwirkungen intensivierten die Bindung von RoF und somit auch von RoFMN. Des Weiteren könnten von der Dimethylaminogruppe schwach elektrostatische Anziehungskräfte ausgehen. Obwohl die Methylgruppen einen positiven induktiven Effekt ausüben, also elektronenschiebend wirken, wird dieser durch den positiven mesomeren Effekt des Stickstoffs am Isoalloxazin-Ringsystem überlagert. Der Stickstoff wird hierdurch partiell positiv geladen und vermindert so die Elektronendichte der gebundenen Methylgruppen. Die Dimethylaminogruppe könnte deshalb schwach elektrostatische Wechselwirkungen mit umgebenden negativen Aminosäureresten eingehen, was eine Stabilisierung des Dodecamers begünstigen könnte. Um diese Vermutungen jedoch zu bestätigen, müsste das *S. davawensis* Dodecin mit RoF bzw. RoFMN unter oxidativen Bedingungen kristallisiert werden.

Folglich konnte anhand der gelösten Proteinstruktur des *S. davawensis* Dodecins sowie verschiedener Punktmutanten von *S. davawensis* und *S. coelicolor* Dodecin gezeigt werden, dass die geringe Stabilität des dodecameren *S. davawensis* Dodecins hauptsächlich durch die Aminosäure D10 verursacht wird. Zusätzlich negativ beeinflusste ionische Wechselwirkungen, die leicht asymmetrische Struktur des Ionenkanals und die daraus resultierende gestörte Ionenbindung sowie eine erhöhte Oberflächenpolarität tragen zu einer bislang nicht bekannten Instabilität des dodecameren Proteins aller bisher untersuchten Dodecine bei. Die durch Bindung von RoF erhöhte Stabilität des Dodecamers wird hierbei auf verstärkte elektrostatische Wechselwirkungen zwischen der Dimethylaminogruppe von RoF und umgebenden Aminosäuren in der Flavinbindetasche zurückgeführt.

Die Stabilität von Proteinen ist meist an die gegebenen Wachstumsbedingungen des jeweiligen Organismus angepasst. Proteine extremophiler Prokaryoten, wie z. B. *H. salinarum* oder *T. thermophilus*, müssen aufgrund hoher Salzkonzentrationen oder hoher Temperaturen stabiler sein als die mesophiler Prokaryoten. Obwohl es sich aber bei *S. davawensis* und *S. coelicolor* um jeweils ubiquitär vorkommende Bodenbakterien mit mehr oder minder ähnlichen Wachstumsbedingungen handelt, weisen deren Dodecine unterschiedliche Proteinstabilitäten auf. Die Gründe hierfür, die möglicherweise evolutions- und funktionsbedingt sind, bleiben zunächst weiterhin unklar und benötigen intensivere Untersuchungen des gesamten bisher noch relativ unerforschten Streptomyzeten *S. davawensis* JCM4913. *In vivo*- als auch *in vitro*-Studien zu Dodecinen anderer mesophiler Bakterien könnten dabei weitere hilfreiche Aufschlüsse zur Funktion geben.

## 6.2 Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen der Roseoflavinbiosyntheseenzyme in *S. davawensis*

Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Stoffwechsellzyme besonders in Zellbereichen hoher Viskosität befinden (Spitzer & Poolman, 2013). Einige von diesen ordnen sich als Multiproteinkomplexe an, um Intermediate der Stoffwechselwege auf direktem Weg zwischen den aktiven Zentren weiterzureichen (Milani *et al.*, 2003). Dieser Vorgang wird als *substrate channeling* bezeichnet und ermöglicht eine schnelle und energieeffiziente Umsetzung von Intermediaten. Die RF- und RoF-Biosyntheseenzyme von *S. davawensis* sind Enzyme sowohl des Primär- als auch des Sekundärmetabolismus. Sie werden deshalb ebenfalls in den eher löslichen Bereichen des Cytosols vermutet und liegen demnach zueinander in räumlicher Nähe vor. Erste Studien zur RoF-Biosynthese ergaben, dass RF das Vorläufersubstrat von RoF ist und die RoF-Biosynthese in *S. davawensis* gesteigert werden konnte, indem einer Kultur von *S. davawensis* zusätzlich RF zugegeben wurde (Matsui *et al.*, 1979). Später wurde herausgefunden, dass nicht RF sondern Flavinmononukleotid (FMN) das Vorläufersubstrat der RoF-Biosynthese ist (Schwarz *et al.*, 2016). Deshalb wurde anfangs angenommen, dass Enzyme der RF- und der RoF-Biosynthese möglicherweise über direkte Protein-Protein-Interaktion (PPI) in Kontakt stehen könnten und Intermediate der beiden Synthesewege durch *substrate channeling* unter den aktiven Zentren weiter reichen. Die Anordnung zu einem aus mehreren Enzymen bestehenden Multiproteinkomplex wurde dabei nicht ausgeschlossen, da auch die Lumazin-Synthase und die RF-Synthase der RF-Biosynthese in anderen Bakterien einen übergeordneten Enzymkomplex bilden (Fischer & Bacher, 2005). Ziel des zweiten Teilprojekts dieser Arbeit war es, anhand der RF- und RoF-Biosynthese eine direkte Verbindung von Primär- und Sekundärmetabolismus in *S. davawensis* aufzuzeigen und bis dato weitere unbekannte Enzyme der RoF-Biosynthese zu identifizieren. Um dies zu untersuchen, wurden verschiedene PPI-Nachweismethoden (*pull-down*, *strep-tag-protein-interaction-experiment* (SPINE), *tandem affinity purification* (TAP)) angewendet.

### 6.2.1 Die Eignung von *pull-down*, SPINE und TAP zur Untersuchung von PPI in *S. davawensis*

Studien zu PPI wurden mit den auf Affinitätschromatographie beruhenden Nachweismethoden *pull-down*, SPINE und TAP bisher gar nicht oder nur selten in Streptomyzeten durchgeführt. Um die Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen, sollten deshalb die gewählten Methoden zunächst validiert werden. Hierzu wurde die PPI der Elongationsfaktoren EF-Ts und EF-Tu gewählt, welche schon in *E. coli* und in *Streptomyces aureofaciens* nachgewiesen werden konnte (Weiser & Ruusala, 1986; Kawashima *et al.*, 1996). Tatsächlich konnte mit allen drei PPI-Nachweismethoden die PPI des *S. davawensis* EF-Ts und EF-Tu validiert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass diese Methoden grundsätzlich für Nachweise von PPI in *S. davawensis* geeignet sind. Obwohl *S. davawensis* wie auch *Streptomyces ramocissimus* in seinem Genom drei Gene besitzt, die für EF-Tu kodieren (*tuf1-3*) (Hoogvliet *et al.*, 1999), interagiert das Köderprotein EF-Ts unter Versuchsbedingungen in *S. davawensis* nur mit EF-Tu1. Es wird angenommen, dass die Gene der anderen EF-Tu-Derivate EF-Tu2 und EF-Tu3 stressreguliert sind und deshalb unter normalen Wachstumsbedingungen nicht exprimiert werden. Dies würde Untersuchungen zu den EF-Tu-Derivaten aus



*S. coelicolor* A3(2) entsprechen, der nur zwei EF-Tu-Gene (*tuf1*, *tuf3*) besitzt und *tuf3* ebenfalls stressreguliert ist (Olsthoorn-Tieleman *et al.*, 2001).

Die Versuche zeigten jedoch, dass gerade die *in vivo*-PPI-Nachweismethoden in *S. davawensis* nicht sehr sensitiv waren, wie es oft in Studien anderer Organismen beschrieben wird. Die Selektivität und Effizienz der Nachweismethoden sollte erreicht werden, indem das Gen des Köderproteins unter nativen Bedingungen exprimiert wird und die interagierenden Proteine im Fall der TAP-Methode sogar über zwei aufeinanderfolgende Reinigungsschritte eluiert werden (Rigaut *et al.*, 1999; Herzberg *et al.*, 2007). Hierdurch sollte es besonders möglich sein, auch schwache PPI nachzuweisen und interagierende Proteine hoch selektiv zu reinigen. Die PPI des *S. davawensis* EF-Ts und EF-Tu1 konnte jedoch mittels SPINE und TAP-Methode erst verifiziert werden, nachdem das Köderprotein überproduziert, die PPI der Interaktionspartner durch Paraformaldehyd fixiert und das Eluat anschließend zusätzlich mittels Trichloressigsäure gefällt und so konzentriert gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Aus den Versuchsergebnissen lässt sich demnach schließen, dass nicht jede Nachweismethode für jeden Mikroorganismus geeignet ist bzw. zunächst adaptiert werden muss. Die *pull-down*-Versuche veranschaulichten zudem, dass nicht jedes Protein als Köderprotein geeignet ist. Während mit EF-Ts-His<sub>6</sub> als Köderprotein EF-Tu1 coeluiert werden konnte, war dies im reversen *pull-down*-Versuch mit EF-Tu1-His<sub>6</sub> nicht möglich. Dies mag daran liegen, dass EF-Tu das in der Zelle am häufigsten vorkommende Protein und somit leicht zu reinigen ist (Furano, 1975; van der Meide *et al.*, 1983). Proteine, die in nur geringen Konzentrationen vorliegen und zudem möglicherweise in wenig viskosen Bereichen des Cytosols lokalisiert sind, sind mit dem Köderprotein eher schwer zu reinigen. Da Studien ergaben, dass das *E. coli* EF-Tu im gesamten Cytosol lokalisiert ist und nicht unterhalb der Zellmembran im sogenannten Cytogel vorliegt (Schilstra *et al.*, 1984), wird angenommen, dass dies ebenfalls für EF-Tu1 als auch für EF-Ts in *S. davawensis* der Fall ist. Die Wahrscheinlichkeit eines häufigen Zusammentreffens der interagierenden Proteine würde hierdurch aufgrund der geringen Viskosität in Bereichen des Cytosols und der hohen Diffusionsgeschwindigkeit der Proteine geringer werden. Zudem hängt die Wahrscheinlichkeit einer Reinigung beider Proteine auch von der Stärke und Dauer der Interaktion ab. Im SPINE-Versuch wird daher Paraformaldehyd genutzt, um auch transiente und schwache PPI zu fixieren und nachzuweisen. Dennoch wurden in allen drei PPI-Nachweismethoden neben den gesuchten Proteinen EF-Ts und EF-Tu1 auch viele unspezifisch an die Affinitätsmatrix bindende Proteine gereinigt. So kann daraus geschlossen werden, dass sich die SPINE- und die TAP-Methode für *S. davawensis* nur eignet, sofern die Interaktionspartner bekannt sind. Der *pull-down*-Versuch eignet sich auch in *S. davawensis* vorzugsweise nur zum Nachweis sehr starker PPI und als anfängliches *screening* möglicher noch unbekannter Interaktionspartner mit dem Köderprotein.

### 6.2.2 Die potentiellen Interaktionspartner der RoF-Biosyntheseenzyme RosA und RosB

Um mit den RoF-Biosyntheseenzymen interagierende Proteine zu identifizieren, wurde das anfangs allein bekannte Enzym RosA als Köderprotein verwendet. Das zum Ende unabhängig von dieser Arbeit zweite identifizierte RoF-Biosyntheseenzym RosB (Schwarz *et al.*, 2016) wurde nur noch als Köderprotein in einem *pull-down*-Versuch angewendet.

Zum anfänglichen *screening* möglicher PPI wurde RosA mit C-terminalem His<sub>6</sub>-Tag (RosA-His<sub>6</sub>) zunächst in einem *pull-down*-Versuch als Köderprotein eingesetzt. Im Vergleich zur nachfolgenden Untersuchung mittels SPINE wurden mit Hilfe des *pull-down*-Versuchs die meisten Proteine gereinigt. Dies lag wahrscheinlich daran, dass das Köderprotein RosA-His<sub>6</sub> hierfür in sehr hoher Konzentration (ca. 1 mg gereinigtes Protein) eingesetzt wurde. Die trotz Überproduktion des Köderproteins mit Hilfe des *in vivo*-SPINE-Versuchs gereinigten und identifizierten Proteine stimmten jedoch mit keinem der im *pull-down* coeluierten Proteine überein. Gründe hierfür könnten sein, dass die in diesen Versuchen verwendeten Rohextrakte zwar von *S. davawensis*-Zellen aus der stationären Wachstumsphase stammen, sich die jeweilige Zusammensetzung der Proteome aber unterschied. Es ist sehr wahrscheinlich, dass abundante und klebrige (*sticky*) Proteine in beiden Rohextrakten mit dem Köderprotein in Wechselwirkung treten, wie z. B. das bereits erwähnte Protein EF-Tu als auch Proteine mit intrinsisch gestörter Faltung (Furano, 1975; van der Meide *et al.*, 1983; Uversky, 2011). Aber auch Peptide schnell denaturierender Proteine können unspezifische Wechselwirkungen mit Proteinen eingehen und falsch-positive PPI erzeugen. Es ist daher vorstellbar, dass die mittels *pull-down* und SPINE gereinigten Proteine unspezifisch mit dem Köderprotein oder der Bindungsmatrix interagiert haben. Die unterschiedlichen Ergebnisse beider PPI-Nachweismethoden könnten auch dadurch hervorgerufen worden sein, dass sehr schwache und transiente PPI trotz der Zugabe von Paraformaldehyd (pFA) mittels SPINE nicht identifiziert wurden. Da pFA nur einen sogenannten Schnappschuss des zellulären Protein-Interaktions zum Zeitpunkt der pFA-Zugabe widerspiegelt, können auch mittels SPINE nicht alle PPI aufgezeigt werden, die in der Zelle wirklich stattfinden. Umgekehrt vernetzt pFA zum Zeitpunkt der Zugabe alle Proteine, die nicht weiter als 2 Å voneinander entfernt sind. Hierdurch können auch Proteine miteinander vernetzt werden, die unter normalen Bedingungen nicht miteinander interagieren und somit zu den unterschiedlichen Ergebnissen der Reinigungsmethoden führen.

Unter den mittels *pull-down* und dem Köderprotein RosA-His<sub>6</sub> coeluierten Proteinen befanden sich zunächst mehrere Proteine, deren Gene unter direkter oder indirekter Kontrolle des *pho*-Regulons stehen, welches durch das Zwei-Komponentensystem PhoR und PhoP gebildet wird (Fernández-Martínez *et al.*, 2012). Das *S. davawensis* PhoH-ähnliche Protein ist dem PhoH von *Streptomyces albus*, *Streptomyces phaeochromogenes* und *Streptomyces griseus* nach Proteinsequenzanalysen zu 96-97% ähnlich und wird in *Corynebacterium glutamicum* und *E. coli* nachweislich unter Phosphat-limitierenden Bedingungen produziert (Kim *et al.*, 1993; Ishige *et al.*, 2003). Studien in *E. coli* lassen vermuten, dass das bisher noch nicht charakterisierte Protein wahrscheinlich eine biologische Funktion im Transport oder der Speicherung von Phosphat besitzt (Kim *et al.*, 1993). Das mit RosA-His<sub>6</sub> coeluierte PhoU2 ist dem *S. coelicolor* A3(2) PhoU zu 92% ähnlich, welches als Teil des PhoR-PhoP-Systems die Signalkaskade dieses Systems moduliert (Martín *et al.*, 2012). Daneben wurde auch

eine putative Glycerophosphoryl-Diesterphosphodiesterase GlpQ1 identifiziert, welche jedoch nicht der extrazellulären GlpQ1 von *S. coelicolor* A3(2) entspricht (*SCO1565*, 30% Sequenzähnlichkeit), sondern eher einer von vier intrazellulären Glycerophosphoryl-Diesterphosphodiesterasen (*SCO3679*, 87% Sequenzähnlichkeit). Diese steht nach Untersuchungen in *S. coelicolor* jedoch nicht unter der Kontrolle des *pho*-Regulons (Santos-Beneit *et al.*, 2009). Glycerophosphoryl-Diesterphosphodiesterasen sind normalerweise im Abbau von Glycerophosphodiester beteiligt, die als Phosphat- und Kohlenstoffquelle dienen. Da die putative *S. davawensis* GlpQ1 dennoch zusammen mit PhoH und PhoU coeluiert wurde, ist anzunehmen, dass auch GlpQ1 in *S. davawensis* möglicherweise der Regulation des *pho*-Regulons untersteht. Da für den *pull-down*-Versuch mit RosA-His<sub>6</sub> Rohextrakt von Zellen aus der stationären Wachstumsphase verwendet wurde, könnte es demnach sein, dass unter den nährstofflimitierenden Bedingungen vor allem auch Proteine des *pho*-Regulons induziert waren. Eine direkte PPI zwischen RosA und denen zum Phosphatstoffwechsel zugehörigen Proteinen ist jedoch auszuschließen. Es ist eher zu vermuten, dass die RoF-Biosynthese in *S. davawensis* wie auch die Biosynthese anderer Antibiotika und Sekundärmetabolite in anderen Streptomyzeten durch anorganischen Phosphat und somit durch das *pho*-Regulon reguliert wird (Lebrihi *et al.*, 1987; Mendes *et al.*, 2007; Santos-Beneit *et al.*, 2011). Es wäre demnach interessant, die RoF-Biosynthese in der stationären Wachstumsphase von *S. davawensis* unter nicht-limitierenden Phosphatkonzentrationen zu untersuchen.

Neben den durch das *pho*-Regulon kontrollierten Proteinen wurde mit RosA-His<sub>6</sub> auch ein Protein mit SnoaL-ähnlicher Domäne coeluiert. SnoaL ist eine Polyketidcyclase, die in Streptomyzeten in der Biosynthese von Polyketid-Antibiotika die Ringstruktur durch eine Aldolkondensation bewirkt (Sultana *et al.*, 2004). Der erst kürzlich größtenteils aufgeklärte Biosyntheseweg von RoF lässt jedoch nicht vermuten, dass ein SnoaL-ähnliches Enzym daran beteiligt ist (Schwarz *et al.*, 2016; Jhulki *et al.*, 2016). Da die meisten Streptomyzeten meist nicht nur ein Antibiotikum produzieren, ist es eher wahrscheinlich, dass dieses Protein im Biosyntheseweg eines anderen von *S. davawensis* produzierten Antibiotikums oder Sekundärmetabolits involviert ist.

Das mittels RosA-His<sub>6</sub> im *pull-down* coeluierte Glutamat-Bindeprotein GluB steht jedoch in enger Verbindung mit dem Biosyntheseweg von RoF. Neueste Studien haben ergeben, dass zur Synthese von RoF aus FMN Glutamat als Aminogruppen-Donor benötigt wird (Schwarz *et al.*, 2016; Jhulki *et al.*, 2016). Die Glutamat-abhängige Reaktion wird aber durch das erste Enzym der RoF-Biosynthese, RosB, katalysiert (Schwarz *et al.*, 2016). Die RosA-katalysierte Reaktion ist dagegen von S-Adenosylmethionin abhängig (Jankowitsch *et al.*, 2011). Es ist daher unwahrscheinlich, dass GluB mit RosA in direkter PPI steht. Möglich ist aber, dass GluB während der stationären Wachstumsphase als Speicherprotein des Aminogruppen-Donors Glutamat für die Glutamat-abhängige RoF-Biosynthese dient. Diese Hypothese müsste jedoch beispielsweise mit Hilfe von Mutationsanalysen weiter untersucht werden.

Interessant war jedoch vor allem, dass mit RosA-His<sub>6</sub> ein bisher nicht charakterisiertes lösliches Transporter-Bindeprotein gereinigt wurde (*BN159\_2929*). Da bisher der eigentliche RoF-Exporter von *S. davawensis* noch nicht identifiziert wurde, ist dies hierfür ein möglicher Kandidat. Es ist vorstellbar, dass das terminale RoF-Biosyntheseenzym RosA mit dem Bindeprotein eines Exporters in Wechselwirkung tritt, um das RF-Derivat mit antibiotischer Wirkung möglichst schnell aus der Zelle zu

transportieren. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Resistenz von *S. davawensis* gegenüber seines selbst produzierten Antibiotikums RoF höchstwahrscheinlich nur über den FMN-RNA-Schalter der *rib*-mRNA ermöglicht wird (Pedrolli *et al.*, 2012). Untersuchungen in *E. coli* belegten jedoch, dass Flavoenzyme durch die RoF-Derivate RoFMN und RoFAD inhibiert werden können (Langer & Hashimoto *et al.*, 2013). Aufgrund fehlender Belege kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass diese RoF-Derivate auch in *S. davawensis* in hohen Konzentrationen möglicherweise Flavoenzyme inhibieren können. Demnach ist es vorstellbar, dass ein Transporter wie auch in *Streptomyces kasugaensis* zur Resistenz gegenüber des selbst produzierten Antibiotikums beitragen könnte (Ikeno *et al.*, 2000). Um diese Vermutung zu bestätigen, müsste beispielsweise eine Mutationsanalyse durchgeführt werden, indem das Gen *BN159\_2929* des identifizierten Transporter-Bindeproteins in *S. davawensis* disruptiert wird. Wäre die Disruptionsmutante gegenüber dem *S. davawensis* Wildtyp sensitiv gegenüber RoF, würde dies die obig beschriebene Theorie unterstützen.

Wurde RosB-His<sub>6</sub> als Köderprotein für einen *pull-down* verwendet, konnte keines der im RosA-His<sub>6</sub>-*pull-down* eluierten Proteine verifiziert werden. Neueste Studien zur Proteinstruktur von RosB deuten darauf hin, dass es sich um ein Tetramer handelt (unveröffentlicht). Dies würde erklären, weshalb RosB in mehreren Proteinbanden des PA-Gels mittels MALDI-TOF-MS identifiziert wurde.

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass mit denen in dieser Arbeit angewendeten und auf Affinitätschromatographie beruhenden Reinigungsmethoden zwei Proteine identifiziert werden konnten, die möglicherweise mit den RoF-Biosyntheseenzymen RosA und RosB in Wechselwirkung stehen. Mit Ausnahme des identifizierten löslichen ABC Transporter-Bindeproteins (*BN159\_2929*) und Glutamat-Bindeproteins GluB ist es unwahrscheinlich, dass RosA und RosB eine direkte PPI mit einem der in den jeweiligen *pull-down*-Versuchen identifizierten Proteinen bzw. untereinander eingehen. Weder in den *pull down*-Versuchen mit RosA-His<sub>6</sub> bzw. RosB-His<sub>6</sub> noch im SPINE-Versuch mit RosA-Strep als Köderprotein wurden darüber hinaus Proteine der RF-Biosynthese gereinigt. Eine direkte Verbindung der RF- und RoF-Biosynthesewege von Primär- und Sekundärmetabolismus über direkte PPI der beteiligten Enzyme in *S. davawensis* ist daher eher auszuschließen. In Hinblick darauf, dass die angewendeten PPI-Nachweismethoden nachweislich relativ unspezifisch sind, sollten hierzu weitere und genauere Techniken angewendet werden. Hierbei könnte untersucht werden, ob RosB aufgrund dessen Glutamat-abhängigen Reaktion mit dem Glutamat-Bindeprotein GluB oder ob RosA mit dem löslichen ABC Transporter-Bindeprotein in Wechselwirkung tritt. Neben bereits erwähnten Mutationsanalysen könnten beispielweise mit Hilfe von *bacterial-two-hybrid* als auch isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) und *MicroScale Thermophoresis* (NanoTemper Technologies) weitere Erkenntnisse erlangt werden (Ramsay *et al.*, 1986; Karimova *et al.*, 1998; Wienken *et al.*, 2010).

Aufgrund dessen, dass die Streptomyzeten *S. davawensis* und *S. cinnabarinus* die bisher einzigen bekannten Produzenten des seltenen RF-Derivats RoF und selbst noch kaum untersucht sind, wird es weiterhin spannend bleiben, mittels PPI evtl. auch Biosynthesewege neuer Antibiotika und anderer Sekundärmetabolite zu identifizieren. Das mit Hilfe durch TAP gereinigte Proteine, massenspektrometrischen Analysen und Inferenz erstellte Interaktom von *E. coli* zeigt, dass mehr als zweidrittel der Proteine durch

transiente oder dauerhafte Wechselwirkungen in Kontakt stehen können (Butland *et al.*, 2005). Durch die Erstellung von Interaktomen können somit manchmal auch bisher nicht charakterisierten Proteinen eine biologische Funktion zugewiesen werden. Dies ist im Besonderen bei unbekanntem Streptomyzetenarten von hoher Bedeutung, da diese eine neben Pilzen die am meisten Antibiotika produzierende Gattung ist. Gerade in der heutigen Zeit von multiresistenten pathogenen Stämmen ist es daher wichtig, so schnell wie möglich neue Gruppen von Antibiotika zu identifizieren und deren Biosynthesewege zur Herstellung neuer synthetischer Antibiotika aufzuklären.

## 7 Literaturverzeichnis

- Akanmu, D., Cecchini, R., Aruoma, O. I. & Halliwell, B. (1991). The antioxidant action of ergothioneine. *Arch Biochem Biophys* **288**, 10–16.
- Alam, M. S., Garg, S. K. & Agrawal, P. (2009). Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS J* **276**, 76–93.
- An, G., Bendiak, D. S., Mamelak, L. A. & Friesen, J. D. (1981). Organization and nucleotide sequence of a new ribosomal operon in *Escherichia coli* containing the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts. *Nucl Acids Res* **9**, 4163–4172.
- Arias, A. A., Lambert, S., Martinet, L., Adam, D., Tenconi, E., Hayette, M.-P., Ongena, M. & Rigali, S. (2015). Growth of desferrioxamine-deficient *Streptomyces* mutants through xenosiderophore piracy of airborne fungal contaminations. *FEMS Microbiol Ecol* **91**.
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E. & Dizdaroglu, M. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem* **264**, 20509–20512.
- Averina, O. V., Zakharevich, N. V. & Danilenko, V. N. (2012). Identification and characterization of WhiB-like family proteins of the *Bifidobacterium* genus. *Anaerobe* **18**, 421–429.
- Bacher, A. (1991). Riboflavin kinase and FAD synthetase. In *Chemistry and biochemistry of flavoenzymes*, pp. 349–370. Edited by F. Müller. Boca Raton: CRC Press.
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y. & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, physiology and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 1–43.
- Barona-Gómez, F., Lautru, S., Francou, F.-X., Leblond, P., Pernodet, J.-L. & Challis, G. L. (2006). Multiple biosynthetic and uptake systems mediate siderophore-dependent iron acquisition in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23877. *Microbiology* **152**, 3355–3366.
- Barquera, B., Zhou, W., Morgan, J. E. & Gennis, R. B. (2002). Riboflavin is a component of the Na<sup>+</sup>-pumping NADH-quinone oxidoreductase from *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10322–10324.
- Becker, D. F., Zhu, W. & Moxley, M. A. (2011). Flavin redox switching of protein functions. *Antioxid Redox Signal* **14**, 1079–1091.
- Bendiak, D. S. & Friesen, J. D. (1981). Organization of genes in the four minute region of the *Escherichia coli* chromosome: Evidence that *rpsB* and *tsf* are Co-transcribed. *Molec Gen Genet* **181**, 356–362.
- Bennett, P. M., Grinsted, J. & Richmond, M. H. (1977). Transposition of TnA does not generate deletions. *Molec Gen Genet* **154**, 205–211.
- Bentley, S. D., Brown, S., Murphy, L. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Parkhill, J., Barrell, B. G., McCormick, J. R. & Santamaria, R. I. & other authors (2004). SCP1, a 356 023 bp linear plasmid adapted to the ecology and developmental biology of its host, *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol Microbiol* **51**, 1615–1628.

- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A. & Kieser, H. & other authors (2002).** Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141–147.
- Bérdy, J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)*. **58**, 1–26.
- Bertani, G. (1951).** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **62**, 293–300.
- Bibb, M. J., Freeman, R. F. & Hopwood, D. A. (1977).** Physical and genetical characterisation of a second sex factor, SCP2, for *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Molec Gen Genet* **154**, 155–166.
- Bieger, B., Essen, L.-O. & Oesterhelt, D. (2003).** Crystal structure of halophilic Dodecin. *Structure* **11**, 375–385.
- Bierman, M., Logan, R., O'Brien, K., Seno, E. T., Nagaraja Rao, R. & Schoner, B. E. (1992).** Plasmid cloning vectors for the conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli* to *Streptomyces* spp. *Gene* **116**, 43–49.
- Black, D. S., Irwin, B. & Moyed, H. S. (1994).** Autoregulation of hip, an operon that affects lethality due to inhibition of peptidoglycan or DNA synthesis. *J Bacteriol* **176**, 4081–4091.
- Blanchard, J. L., Wholey, W. Y., Conlon, E. M., Pomposiello, P. J. & Sonenshein, A. (2012).** Correction. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. *PLoS One* **7**.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014).** Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120.
- Bornemann, S. (2002).** Flavoenzymes that catalyse reactions with no net redox change. *Nat Prod Rep* **19**, 761–772.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Bush, M. J., Chandra, G., Bibb, M. J., Findlay, K. C. & Buttner, M. J. (2016).** Genome-wide chromatin immunoprecipitation sequencing analysis shows that WhiB Is a transcription factor that cocontrols its regulon with WhiA to initiate developmental cell division in *Streptomyces*. *MBio* **7**.
- Butland, G., Peregrín-Alvarez, J. M., Li, J., Yang, W., Yang, X., Canadien, V., Starostine, A., Richards, D. & Beattie, B. & other authors (2005).** Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature* **433**, 531–537.
- Cabiscol, E., Tamarit, J. & Ros, J. (2000).** Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol* **3**, 3–8.
- Cambillau, C. & Claverie, J. M. (2000).** Structural and genomic correlates of hyperthermostability. *J Biol Chem* **275**, 32383–32386.
- Cerdeño, A. M., Bibb, M. J. & Challis, G. L. (2001).** Analysis of the prodiginine biosynthesis gene cluster of *Streptomyces coelicolor* A3(2): New mechanisms for chain initiation and termination in modular multienzymes. *Chem Biol* **8**, 817–829.
- Challis, G. L. & Hopwood, D. A. (2003).** Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci USA* **100 Suppl 2**, 14555–14561.

- Chater, K. F. (1972).** A morphological and genetic mapping study of white colony mutants of *Streptomyces coelicolor*. *J Gen Microbiol* **72**, 9–28.
- Chater, K. F. (2011).** Differentiation in *Streptomyces*: the properties and programming of diverse cell types. In *Streptomyces. Molecular biology and biotechnology*, pp. 43–86. Edited by P. Dyson. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., van der Horst, G. T. J., Batschauer, A. & Ahmad, M. (2011).** The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Rev Plant Biol* **62**, 335–364.
- Cho, Y.-H., Kim, E.-J., Chung, H.-J., Choi, J.-H., Chater, K. F., Ahn, B.-E., Shin, J.-H. & Roe, J.-H. (2003).** The pqrAB operon is responsible for paraquat resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **185**, 6756–6763.
- Christie, J. M., Gawthorne, J., Young, G., Fraser, N. J. & Roe, A. J. (2012).** LOV to BLUF: flavoprotein contributions to the optogenetic toolkit. *Mol Plant* **5**, 533–544.
- Christie, J. M., Reymond, P., Powell, G. K., Bernasconi, P., Raibekas, A. A., Liscum, E. & Briggs, W. R. (1998).** Arabidopsis NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science* **282**, 1698–1701.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M. & Briggs, W. R. (1999).** LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8779–8783.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L. (1972).** Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **69**, 2110–2114.
- Cooper, L. E., O'Leary, S. E. & Begley, T. P. (2014).** Biosynthesis of a thiamin antivitamin in *Clostridium botulinum*. *Biochemistry* **53**, 2215–2217.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C. & Vinckx, T. (2011).** Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria. *Metallomics* **3**, 540–549.
- Crack, J. C., den Hengst, C. D., Jakimowicz, P., Subramanian, S., Johnson, M. K., Buttner, M. J., Thomson, A. J. & Le Brun, N. E. (2009).** Characterization of 4Fe-4S-containing and cluster-free forms of *Streptomyces* WhiD. *Biochemistry* **48**, 12252–12264.
- Darty, K., Denise, A. & Ponty, Y. (2009).** VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* **25**, 1974–1975.
- Davis, N. K. & Chater, K. F. (1990).** Spore colour in *Streptomyces coelicolor* A3(2) involves the developmentally regulated synthesis of a compound biosynthetically related to polyketide. *Mol Microbiol* **4**, 1679–1691.
- DeMaio, J., Zhang, Y., Ko, C., Young, D. B. & Bishai, W. R. (1996).** A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 2790–2794.
- den Hengst, C. D. & Buttner, M. J. (2008).** Redox control in actinobacteria. *Biochim Biophys Acta* **1780**, 1201–1216.
- Driessen, A. J. & Nouwen, N. (2008).** Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* **77**, 643–667.
- Dunlap, P. (2014).** Biochemistry and genetics of bacterial bioluminescence. In *Bioluminescence: fundamentals and applications in biotechnology - Volume 1*, pp. 37–64. Edited by G. Thouand & R. Marks. Berlin, Heidelberg, s.l.: Springer Berlin Heidelberg.



- Edmondson, D. & Ghisla, S. (1999).** Flavoenzyme structure and function. Approaches using flavin analogues. *Methods Mol Biol* **131**, 157–179.
- Edward, A. M. (2014).** Structure and general properties of flavins. In *Flavins and Flavoproteins. Methods and Protocols*, pp. 3–13. Edited by S. Weber & E. Schleicher. New York, NY: Humana Press.
- Elvin, S. & Bingham, A. (1991).** Electroporation-induced transformation of *Escherichia coli*. Evaluation of a square waveform pulse. *Lett Appl Microbiol* **12**, 39–42.
- Esclapez, J., Pire, C., Bautista, V., Martínez-Espinosa, R. M., Ferrer, J. & Bonete, M. J. (2007).** Analysis of acidic surface of *Haloferax mediterranei* glucose dehydrogenase by site-directed mutagenesis. *FEBS Letters* **581**, 837–842.
- Escobar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. (1999).** Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**, 6223–6229.
- Facey, S. J., Gross, F., Vining, L. C., Yang, K. & van Pée, K. H. (1996).** Cloning, sequencing and disruption of a bromoperoxidase-catalase gene in *Streptomyces venezuelae*: evidence that it is not required for chlorination in chloramphenicol biosynthesis. *Microbiology* **142** ( Pt 3), 657–665.
- Fernández-Martínez, L. T., Santos-Beneit, F. & Martín, J. F. (2012).** Is PhoR-PhoP partner fidelity strict? PhoR is required for the activation of the pho regulon in *Streptomyces coelicolor*. *Mol Genet Genomics* **287**, 565–573.
- Fiehe, K., Arenz, A., Drewke, C., Hemscheidt, T., Williamson, R. T. & Leistner, E. (2000).** Biosynthesis of 4'-O-methylpyridoxine (Ginkgotoxin) from primary precursors. *J Nat Prod* **63**, 185–189.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2005).** Biosynthesis of flavocoenzymes. *Nat Prod Rep* **22**, 324–350.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2008).** Biosynthesis of vitamin B2: Structure and mechanism of riboflavin synthase. *Arch Biochem Biophys* **474**, 252–265.
- Flett, F., Mersinias, V. & Smith, C. P. (1997).** High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol Lett* **155**, 223–229.
- Fraaije, M. & Mattevi, A. (2000).** Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem Sci* **25**, 126–132.
- Fu, H., ed. (2004).** *Protein-protein interactions. Methods and applications*. Totowa, NJ: Humana Press.
- Fuhrer, T., Heer, D., Begemann, B. & Zamboni, N. (2011).** High-throughput, accurate mass metabolome profiling of cellular extracts by flow injection–time-of-flight mass spectrometry. *Anal Chem* **83**, 7074–7080.
- Furano, A. V. (1975).** Content of elongation factor Tu in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **72**, 4780–4784.
- Garg, S. K., Suhail Alam, M., Soni, V., Radha Kishan, K. V. & Agrawal, P. (2007).** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* WhiB1/Rv3219 as a protein disulfide reductase. *Protein Expr Purif* **52**, 422–432.
- Gassner, G. T., Ludwig, M. L., Gatti, D. L., Correll, C. C. & Ballou, D. P. (1995).** Structure and mechanism of the iron-sulfur flavoprotein phthalate dioxygenase reductase. *FASEB J* **9**, 1411–1418.

- Gauden, M., Grinstead, J. S., Laan, W., van Stokkum, I. H. M., Avila-Perez, M., Toh, K. C., Boelens, R., Kaptein, R. & van Grondelle, R. & other authors (2007).** On the role of aromatic side chains in the photoactivation of BLUF domains. *Biochemistry* **46**, 7405–7415.
- Genghof, D. S., Inamine, E., Kovalenko, V. & Melville, D. B. (1956).** Ergothioneine in microorganisms. *J Biol Chem* **223**, 9–17.
- Genghof, D. S. & Vandamme, O. (1964).** Biosynthesis of ergothioneine and hercynine by mycobacteria. *J Bacteriol* **87**, 852–862.
- Ghisla, S. & Massey, V. (1989).** Mechanisms of flavoprotein-catalyzed reactions. *Eur J Biochem* **181**, 1–17.
- Goldman, J. D., White, D. G. & Levy, S. B. (1996).** Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother* **40**, 1266–1269.
- Golemis, E. A. & Adams, P. D., eds. (2005).** *Protein-protein interactions: A molecular cloning manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- González-Flecha, B. & Demple, B. (1995).** Metabolic sources of hydrogen peroxide in aerobically growing *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **270**, 13681–13687.
- Gottelt, M., Kol, S., Gomez-Escribano, J. P., Bibb, M. & Takano, E. (2010).** Deletion of a regulatory gene within the *cpk* gene cluster reveals novel antibacterial activity in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology* **156**, 2343–2353.
- Greer, L. F. 3. & Szalay, A. A. (2002).** Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* **17**, 43–74.
- Grill, S., Busenbender, S., Pfeiffer, M., Kohler, U. & 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**, 1546–1553.
- Grill, S., Yamaguchi, H., Wagner, H., Zwahlen, L., Kusch, U. & Mack, M. (2007).** Identification and characterization of two *Streptomyces davawensis* riboflavin biosynthesis gene clusters. *Arch Microbiol* **188**, 377–387.
- Grininger, M., Nöll, G., Trawöger, S., Sinner, E.-K. & Oesterheldt, D. (2008).** Electrochemical switching of the flavoprotein dodecin at gold surfaces modified by flavin-DNA hybrid linkers. *Biointerphases* **3**, 51–58.
- Grininger, M., Seiler, F., Zeth, K. & Oesterheldt, D. (2006b).** Dodecin sequesters FAD in closed conformation from the aqueous solution. *J Mol Biol* **364**, 561–566.
- Grininger, M., Staudt, H., Johansson, P., Wachtveitl, J. & Oesterheldt, D. (2009).** Dodecin is the key player in flavin homeostasis of archaea. *J Biol Chem* **284**, 13068–13076.
- Grininger, M., Zeth, K. & Oesterheldt, D. (2006a).** Dodecins: a family of lumichrome binding proteins. *J Mol Biol* **357**, 842–857.
- Gupta, V., Gupta, R. K., Khare, G., Salunke, D. M. & Tyagi, A. K. (2008).** Cloning, expression, purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of bacterioferritin A from *Mycobacterium tuberculosis*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* **64**, 398–401.
- Gust, B., Challis, G. L., Fowler, K., Kieser, T. & Chater, K. F. (2003).** PCR-targeted *Streptomyces* gene replacement identifies a protein domain needed for biosynthesis of the sesquiterpene soil odor geosmin. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 1541–1546.

- Gutiérrez Sánchez, C., Su, Q., Schonherr, H., Grininger, M. & Nöll, G. (2015).** Multi-Ligand-Binding Flavoprotein Dodecin as a Key Element for Reversible Surface Modification in Nano-biotechnology. *ACS Nano* **9**, 3491–3500.
- Gutiérrez-Preciado, A., Torres, A. G., Merino, E., Bonomi, H. R., Goldbaum, F. A. & García-Angulo, V. A. (2015).** Extensive identification of bacterial riboflavin transporters and their distribution across bacterial species. *PLoS One* **10**, e0126124.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557–580.
- Harwood, C. R. & Cutting, S. M., eds. (1990).** *Molecular biological methods for bacillus*. Chichester: Wiley.
- Hemberger, S., Pedrolli, D. B., Stolz, J., Vogl, C., Lehmann, M. & 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**, 119.
- Herzberg, C., Weidinger, L. A. F., Dörrbecker, B., Hübner, S., Stülke, J. & Commichau, F. M. (2007).** SPINE: a method for the rapid detection and analysis of protein-protein interactions in vivo. *Proteomics* **7**, 4032–4035.
- Heueis, N., Vockenhuber, M. P. & Suess, B. (2014).** Small non-coding RNAs in *streptomyces*. *RNA Biol* **11**, 464–469.
- Hilker, R., Stadermann, K. B., Doppmeier, D., Kalinowski, J., Stoye, J., Straube, J., Winnebald, J. & Goesmann, A. (2014).** ReadXplorer-visualization and analysis of mapped sequences. *Bioinformatics* **30**, 2247–2254.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Cullum, J. A. & Oliver, S. G. (1989).** Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**, 272–277.
- Hoogvliet, G., van Wezel, G. P. & Kraal, B. (1999).** Evidence that a single EF-Ts suffices for the recycling of multiple and divergent EF-Tu species in *Streptomyces coelicolor* A3(2) and *Streptomyces ramocissimus*. *Microbiology* **145**, 2293–2301.
- Hopwood, D. A. (2006).** Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet* **40**, 1–23.
- Hopwood, D. A. (2007).** *Streptomyces in nature and medicine. The antibiotic makers*. Oxford u.a.: Oxford Univ. Press.
- Hu, C. D., Chinenov, Y. & Kerppola, T. K. (2002).** Visualization of Interactions among bZIP and Rel Family Proteins in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation. *Mol Cell* **9**, 789–798.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E. & Briggs, W. R. (1997).** Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* **278**, 2120–2123.
- Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., Karoonuthaisiri, N., Lih, C.-J. & Kao, C. M. & other authors (2005).** Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol Microbiol* **58**, 1276–1287.
- Huang, X., Holden, H. M. & Raushel, F. M. (2001).** Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annu Rev Biochem* **70**, 149–180.
- Hümpel, A., Gebhard, S., Cook, G. M. & Berney, M. (2010).** The SigF regulon in *Mycobacterium smegmatis* reveals roles in adaptation to stationary phase, heat, and oxidative stress. *J Bacteriol* **192**, 2491–2502.

- Hutchinson, F. (1985).** Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. In *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, pp. 115–154. Edited by W. E. Cohn & K. Moldave. Orlando: Academic Press.
- Ikeno, S., Yamane, Y., Ohishi, Y., Kinoshita, N., Hamada, M., Tsuchiya, K. S. & Hori, M. (2000).** ABC Transporter genes, *kasKLM*, responsible for self-resistance of a kasugamycin producer strain. *J Antibiot (Tokyo)* **53**, 373–384.
- Ishige, T., Krause, M., Bott, M., Wendisch, V. F. & Sahm, H. (2003).** The phosphate starvation stimulation of *Corynebacterium glutamicum* determined by DNA Microarray analyses. *J Bacteriol* **185**, 4519–4529.
- Jaenicke, R. (2000).** Do ultrastable proteins from hyperthermophiles have high or low conformational rigidity? *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 2962–2964.
- Jankowitsch, F., Kühm, C., Kellner, R., Kalinowski, J., Pelzer, S., Macheroux, P. & 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**, 38275–38285.
- Jankowitsch, F., Schwarz, J., Ruckert, C., Gust, B., Szczepanowski, R., Blom, J., Pelzer, S., Kalinowski, J. & Mack, M. (2012).** Genome sequence of the bacterium *Streptomyces davawensis* JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseoflavin. *J Bacteriol* **194**, 6818–6827.
- Janowski, R., Auerbach-Nevo, T. & Weiss, M. S. (2008).** Bacterioferritin from *Mycobacterium smegmatis* contains zinc in its di-nuclear site. *Protein Sci* **17**, 1138–1150.
- Jhulki, I., Chanani, P. K., Abdelwahed, S. H. & Begley, T. P. (2016).** A remarkable oxidative cascade that replaces the Riboflavin C8 methyl with an amino group during Roseoflavin biosynthesis. *J Am Chem Soc* **138**, 8324–8327.
- Joosten, V. & van Berkel, W. J. H. (2007).** Flavoenzymes. *Curr Opin Chem Biol* **11**, 195–202.
- Juri, N., Kubo, Y., Kasai, S., Otani, S., Kusunose, M. & Matsui, K. (1987).** Formation of roseoflavin from 8-amino- and 8-methylamino-8-demethyl-D-riboflavin. *J Biochem* **101**, 705–711.
- Kang, S. H., Huang, J., Lee, H. N., Hur, Y. A., Cohen, S. N. & Kim, E. S. (2007).** Interspecies DNA microarray analysis identifies WblA as a pleiotropic down-regulator of antibiotic biosynthesis in *Streptomyces*. *J Bacteriol* **189**, 4315–4319.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A. & Ladant, D. (1998).** A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 5752–5756.
- Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S. & Leberman, R. (1996).** The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu - EF-Ts complex at 2.5 Å resolution. *Nature* **379**, 511–518.
- Kelly, W. L., Pan, L. & Li, C. (2009).** Thiostrepton biosynthesis: prototype for a new family of bacteriocins. *J Am Chem Soc* **131**, 4327–4334.
- Keseler, I. M., Mackie, A., Peralta-Gil, M., Santos-Zavaleta, A., Gama-Castro, S., Bonavides-Martinez, C., Fulcher, C., Huerta, A. M. & Kothari, A. & other authors (2013).** EcoCyc: fusing model organism databases with systems biology. *Nucleic Acids Res* **41**, D605-12.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A., eds. (2000).** *Practical Streptomyces genetics*. Norwich Research Park: John Innes Centre.

- Kim, S. K., Makino, K., Amemura, M., Shinagawa, H. & Nakata, A. (1993).** Molecular analysis of the *phoH* gene, belonging to the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 1316–1324.
- Kim, T.-H., Park, J.-S., Kim, H.-J., Kim, Y., Kim, P. & Lee, H.-S. (2005).** The *whcE* gene of *Corynebacterium glutamicum* is important for survival following heat and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* **337**, 757–764.
- Kirby, R. & Carton, W. C. (2011).** Genome architecture. In *Streptomyces. Molecular biology and biotechnology*, pp. 5–26. Edited by P. Dyson. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Kis, K. & Bacher, A. (1995).** Substrate channeling in the lumazine synthase/riboflavin synthase complex of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* **270**, 16788–16795.
- Kono, N., Arakawa, K., Ogawa, R., Kido, N., Oshita, K., Ikegami, K., Tamaki, S. & Tomita, M. (2009).** Pathway projector: web-based zoomable pathway browser using KEGG atlas and Google Maps API. *PLoS One* **4**, e7710.
- Laemmli, U. K. (1970).** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of *Bacteriophage T4*. *Nature* **227**, 680–685.
- Lakey, J. H., Lea, E. J., Rudd, B. A., Wright, H. M. & Hopwood, D. A. (1983).** A new channel-forming antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) which requires calcium for its activity. *J Gen Microbiol* **129**, 3565–3573.
- Lamberti, A., Sanges, C., Chambery, A., Migliaccio, N., Rosso, F., Di Maro, A., Papale, F., Marra, M. & Parente, A. & other authors (2011).** Analysis of interaction partners for eukaryotic translation elongation factor 1A M-domain by functional proteomics. *Biochimie* **93**, 1738–1746.
- Lamla, T. & Erdmann, V. A. (2004).** The Nano-tag, a streptavidin-binding peptide for the purification and detection of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* **33**, 39–47.
- Langer, S., Hashimoto, M., Hobl, B., Mathes, T. & Mack, M. (2013).** Flavoproteins are potential targets for the antibiotic roseoflavin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **195**, 4037–4045.
- Langer, S., Nakanishi, S., Mathes, T., Knaus, T., Binter, A., Macheroux, P., Mase, T., Miyakawa, T., Tanokura, M. & Mack, M. (2013).** The flavoenzyme azobenzene reductase AzoR from *Escherichia coli* binds roseoflavin mononucleotide (RoFMN) with high affinity and is less active in its RoFMN form. *Biochemistry* **52**, 4288–4295.
- Langmead, B. & Salzberg, S. L. (2012).** Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* **9**, 357–359.
- Lebrihi, A., Germain, P. & Lefebvre, G. (1987).** Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 130–135.
- Lee, E. R., Blount, K. F. & Breaker, R. R. (2009).** Roseoflavin is a natural antibacterial compound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. *RNA Biol* **6**, 187–194.
- Lee, K.-L., Singh, A. K., Heo, L., Seok, C. & Roe, J.-H. (2015).** Factors affecting redox potential and differential sensitivity of SoxR to redox-active compounds. *Mol Microbiol* **97**, 808–821.
- Lee, S., Chung, J. M., Yun, H. J., Won, J. & Jung, H. S. (2016).** New insight into multifunctional role of peroxiredoxin family protein: Determination of DNA

- protection properties of bacterioferritin comigratory protein under hyperthermal and oxidative stresses. *Biochem Biophys Res Commun* **469**, 1028–1033.
- Lengeler, J. W., Drews, G. & Schlegel, H. G., eds. (1999).** *Biology of the prokaryotes*. Stuttgart: Thieme.
- Lewis, K. (2000).** Programmed death in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 503–514.
- Li, W., Ju, J., Osada, H. & Shen, B. (2006).** Utilization of the methoxymalonyl-acyl carrier protein biosynthesis locus for cloning of the tautomycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces spiroverticillatus*. *J Bacteriol* **188**, 4148–4152.
- Liu, F., Xiong, J., Kumar, S., Yang, C., Ge, S., Li, S., Xia, N. & Swaminathan, K. (2011a).** Structural and biophysical characterization of *Mycobacterium tuberculosis* dodecin Rv1498A. *J Struct Biol* **175**, 31–38.
- Liu, Z., Tan, C., Guo, X., Kao, Y. T., Li, J., Wang, L., Sancar, A. & Zhong, D. (2011b).** Dynamics and mechanism of cyclobutane pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**, 14831–14836.
- Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J. & Sparling, R. (1998).** Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can J Microbiol (Canadian Journal of Microbiology)* **44**, 707–717.
- Luke, K. A., Higgins, C. L. & Wittung-Stafshede, P. (2007).** Thermodynamic stability and folding of proteins from hyperthermophilic organisms. *FEBS J* **274**, 4023–4033.
- Macheroux, P., Kappes, B. & Ealick, S. E. (2011).** Flavogenomics - a genomic and structural view of flavin-dependent proteins. *FEBS J* **278**, 2625–2634.
- Martín, J. F., Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Sola-Landa, A., Smith, M. C. M., Ellingsen, T. E., Nieselt, K., Burroughs, N. J. & Wellington, E. M. H. (2012).** Transcriptomic studies of phosphate control of primary and secondary metabolism in *Streptomyces coelicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol* **95**, 61–75.
- Massey, V. (1995).** Introduction: flavoprotein structure and mechanism. *FASEB J* **9**, 473–475.
- Massey, V. (2000).** The Chemical and Biological Versatility of Riboflavin. *Biochem Soc Trans (Biochemical Society Transactions)* **28**, 283–296.
- Masuda, S. & Bauer, C. E. (2002).** AppA is a blue light photoreceptor that antirepresses photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *Cell* **110**, 613–623.
- Mataga, N., Chosrowjan, H., Shibata, Y., Tanaka, F., Nishina, Y. & Shiga, K. (2000).** Dynamics and mechanisms of ultrafast fluorescence quenching reactions of flavin chromophores in protein nanospace. *J Phys Chem* **104**, 10667–10677.
- Mathes, T., Vogl, C., Stolz, J. & Hegemann, P. (2009).** In vivo generation of flavoproteins with modified cofactors. *J Mol Biol* **385**, 1511–1518.
- Matsui, K., Juri, N., Kubo, Y. & Kasai, S. (1979).** Formation of roseoflavin from guanine through riboflavin. *J Biochem* **86**, 167–175.
- Mattatall, N. R. & Sanderson, K. E. (1996).** *Salmonella typhimurium* LT2 possesses three distinct 23S rRNA intervening sequences. *J Bacteriol* **178**, 2272–2278.
- McDougald, D., Gong, L., Srinivasan, S., Hild, E., Thompson, L., Takayama, K., Rice, S. A. & Kjelleberg, S. (2002).** Defences against oxidative stress during starvation in bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**, 3–13.

- Meissner, B., Schleicher, E., Weber, S. & Essen, L.-O. (2007).** The Dodecin from *Thermus thermophilus*, a bifunctional cofactor storage protein. *J Biol Chem* **282**, 33142–33154.
- Melkani, G. C., Zardeneta, G. & Mendoza, J. A. (2004).** Oxidized GroEL can function as a chaperonin. *Front Biosci* **9**, 724.
- Mendes, M. V., Tunca, S., Anton, N., Recio, E., Sola-Landa, A., Aparicio, J. F. & Martin, J. F. (2007).** The two-component phoR-phoP system of *Streptomyces natalensis*: Inactivation or deletion of phoP reduces the negative phosphate regulation of pimarinic biosynthesis. *Metab Eng* **9**, 217–227.
- Mewies, M., McIntire, W. S. & Scrutton, N. S. (1998).** Covalent attachment of flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) to enzymes: the current state of affairs. *Protein Sci* **7**, 7–20.
- Milani, M., Pesce, A., Bolognesi, M., Bocedi, A. & Ascenzi, P. (2003).** Substrate channeling: Molecular bases. *Biochem Mol Biol Educ* **31**, 228–233.
- Miller, E. M. & Nickoloff, J. A. (1995).** *Escherichia coli* electrotransformation. *Methods Mol Biol* **47**, 105–113.
- Miura, R. (2001).** Versatility and specificity in flavoenzymes: control mechanisms of flavin reactivity. *Chem Rec* **1**, 183–194.
- Moloney, J. B. (1960).** Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origin and introductory investigations. *J Natl Cancer Inst* **24**, 933–951.
- Monaco, H. L. (1997).** Crystal structure of chicken riboflavin-binding protein. *EMBO J* **16**, 1475–1483.
- Montero Llopis, P., Sliusarenko, O., Heinritz, J. & Jacobs-Wagner, C. (2012).** In vivo biochemistry in bacterial cells using FRAP: Insight into the translation cycle. *Biophys J* **103**, 1848–1859.
- Nakajima, S., Satoh, Y., Yanashima, K., Matsui, T. & Dairi, T. (2015).** Ergothioneine protects *Streptomyces coelicolor* A3(2) from oxidative stresses. *J Biosci Bioeng* **120**, 294–298.
- Nardiz, N., Santamarta, I., Lorenzana, L. M., Martin, J. F. & Liras, P. (2011).** A rhodanese-like protein is highly overrepresented in the mutant *S. clavuligerus* oppA2::aph: effect on holomycin and other secondary metabolites production. *Microb Biotechnol* **4**, 216–225.
- Naseer, N., Shapiro, J. A. & Chander, M. (2014).** RNA-Seq analysis reveals a six-gene SoxR regulon in *Streptomyces coelicolor*. *PLoS One* **9**, e106181.
- Neu, J. M., MacMillan, S. V., Nodwell, J. R. & Wright, G. D. (2002).** StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptide antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol Microbiol* **44**, 417–430.
- Newton, G. L., Buchmeier, N. & Fahey, R. C. (2008).** Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**, 471–494.
- Nishimura, T. & Tanaka, N. (1963).** Biological studies on Bacimethrin, a pyrimidine antibiotic, and monazomycin. *J Antibiot (Tokyo)* **16**, 179–181.
- Nöll, G., Trawöger, S., Sanden-Flohe, M. von, Dick, B. & Grininger, M. (2009).** Blue-light-triggered photorelease of active chemicals captured by the flavoprotein dodecin. *Chembiochem* **10**, 834–837.

- Novak, R., Henriques, B., Charpentier, E., Normark, S. & Tuomanen, E. (1999).** Emergence of vancomycin tolerance in *Streptococcus pneumoniae*. *Nature* **399**, 590–593.
- Ogata, H., Goto, S., Sato, K., Fujibuchi, W., Bono, H. & Kanehisa, M. (1999).** KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Res* **27**, 29–34.
- Ohnuki, T., Imanaka, T. & Aiba, S. (1985).** Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *J Bacteriol* **164**, 85–94.
- Olsthoorn-Tieleman, L. N., Plooster, L. J. & Kraal, B. (2001).** The variant tuf3 gene of *Streptomyces coelicolor* A3(2) encodes a real elongation factor Tu, as shown in a novel *Streptomyces* in vitro translation system. *Eur J Biochem* **268**, 3807–3815.
- Ortiz de Orué Lucana, D. & Schrempf, H. (2000).** The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol Gen Genet* **264**, 341–353.
- Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S. & Miura, R. (1974).** Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J Antibiot (Tokyo)*. **27**, 86–87.
- Ott, E., Stolz, J. & Mack, M. (2009).** The RFN riboswitch of *Bacillus subtilis* is a target for the antibiotic roseoflavin produced by *Streptomyces davawensis*. *RNA Biol* **6**, 276–280.
- Patel, P., Song, L. & Challis, G. L. (2010).** Distinct extracytoplasmic siderophore binding proteins recognize ferrioxamines and ferricoelichelin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biochemistry* **49**, 8033–8042.
- Pawlik, K., Kotowska, M., Chater, K. F., Kuczek, K. & Takano, E. (2007).** A cryptic type I polyketide synthase (*cpk*) gene cluster in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Arch Microbiol* **187**, 87–99.
- Pedrolli, D. B., Kühm, C., Sévin, D. C., Vockenhuber, M. P., Sauer, U., Suess, B. & Mack, M. (2015b).** A dual control mechanism synchronizes riboflavin and sulphur metabolism in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**, 14054–14059.
- Pedrolli, D. B., Langer, S., Hobl, B., Schwarz, J., Hashimoto, M. & Mack, M. (2015a).** The ribB FMN riboswitch from *Escherichia coli* operates at the transcriptional and translational level and regulates riboflavin biosynthesis. *FEBS J* **282**, 3230–3242.
- Pedrolli, D. B., Matern, A., Wang, J., Ester, M., Siedler, K., Breaker, R. & 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**, 8662–8673.
- Pedrolli, D. B., Nakanishi, S., Barile, M., Mansurova, M., Carmona, E. C., Lux, A., Gartner, W. & 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**, 1853–1859.
- Pfeiffer, C., Bauer, T., Surek, B., Schömig, E. & Gründemann, D. (2011).** Cyanobacteria produce high levels of ergothioneine. *Food Chem* **129**, 1766–1769.
- Piddock, L. J. & Walters, R. N. (1992).** Bactericidal activities of five quinolones for *Escherichia coli* strains with mutations in genes encoding the SOS response or cell division. *Antimicrob Agents Chemother* **36**, 819–825.



- Pieper, U., Kapadia, G., Mevarech, M. & Herzberg, O. (1998).** Structural features of halophilicity derived from the crystal structure of dihydrofolate reductase from the Dead Sea halophilic archaeon, *Haloferax volcanii*. *Structure* **6**, 75–88.
- Pimentel-Schmitt, E. F. (22.01.2007).** *Carbon metabolism in actinomycetes. A molecular view to glucose-related phenomena.*
- Plumbridge, J. (1998).** Control of the expression of the manXYZ operon in *Escherichia coli*: Mlc is a negative regulator of the mannose PTS. *Mol Microbiol* **27**, 369–380.
- Polkade, A. V., Mantri, S. S., Patwekar, U. J. & Jangid, K. (2016).** Quorum sensing: an under-explored phenomenon in the phylum *Actinobacteria*. *Front Microbiol.* **7**, 131.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. & Séraphin, B. (2001).** The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**, 218–229.
- Rahaus, M., Desloges, N., Yang, M., Ruyechan, W. T. & Wolff, M. H. (2003).** Transcription factor USF, expressed during the entire phase of varicella-zoster virus infection, interacts physically with the major viral transactivator IE62 and plays a significant role in virus replication. *J Gen Virol* **84**, 2957–2967.
- Ramsay, G., Prabhu, R. & Freire E., E. (1986).** Direct measurement of the energetics of association between myelin basic protein and phosphatidylserine vesicles. *Biochemistry* **22**, 2265–2270.
- Rao, V. V., Ningshen, T. J., Chaitanya, R. K., Senthilkumaran, B. & Dutta-Gupta, A. (2016).** Cloning and characterization of a riboflavin-binding hexamerin from the larval fat body of a lepidopteran stored grain pest, *Corcyra cephalonica*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **194-195**, 58–64.
- Rava, P. S., Somma, L. & Steinman, H. M. (1999).** Identification of a regulator that controls stationary-phase expression of catalase-peroxidase in *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol* **181**, 6152–6159.
- Reddy, P. J., Ray, S., Sathe, G. J., Prasad, T. S. K., Rapole, S., Panda, D. & Srivastava, S. (2015).** Proteomics analyses of *Bacillus subtilis* after treatment with plumbagin, a plant-derived naphthoquinone. *Omics* **19**, 12–23.
- Remelli, W., Guerrieri, N., Klodmann, J., Papenbrock, J., Pagani, S. & Forlani, F. (2012).** Involvement of the *Azotobacter vinelandii* rhodanese-like protein RhdA in the glutathione regeneration pathway. *PLoS One* **7**, e45193.
- Rigaut, G., Shevchenko, A., Rutz, B., Wilm, M., Mann, M. & Séraphin, B. (1999).** A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nat Biotechnol* **17**, 1030–1032.
- Rudd, B. A. & Hopwood, D. A. (1979).** Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **114**, 35–43.
- Saini, V., Cumming, B. M., Guidry, L., Lamprecht, D. A., Adamson, J. H., Reddy, V. P., Chinta, K. C., Mazorodze, J. H. & Glasgow, J. N. & other authors (2016).** Ergothioneine maintains redox and bioenergetic homeostasis essential for drug susceptibility and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Rep* **14**, 572–585.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001).** *Molecular cloning. A laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanangelantoni, A. (1990).** Organization and nucleotide sequence of the genes for ribosomal protein S2 and elongation factor Ts in *Spirulina platensis*. *FEMS Microbiol Lett* **66**, 141–145.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 5463–5467.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A., Apel, A. K. & Martín, J. F. (2009).** Phosphate and carbon source regulation of two PhoP-dependent glycerophosphodiester phosphodiesterase genes of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiology* **155**, 1800–1811.
- Santos-Beneit, F., Rodríguez-García, A. & Martín, J. F. (2011).** Complex transcriptional control of the antibiotic regulator afsS in *Streptomyces*: PhoP and AfsR are overlapping, competitive activators. *J Bacteriol* **193**, 2242–2251.
- Schilstra, M. J., Slot, J. W., van der Meide, P. H., Posthuma, G., Cremers, A. F. M. & Bosch, L. (1984).** Immunocytochemical localization of the elongation factor Tu in *E. coli* cells. *FEBS Letters* **165**, 175–179.
- Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. & Eliceiri, K. W. (2015).** The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev* **82**, 518–529.
- Schrempf, H., Bujard, H., Hopwood, D. A. & Goebel, W. (1975).** Isolation of covalently closed circular deoxyribonucleic acid from *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Bacteriol* **121**, 416–421.
- Schwarz, J., Konjik, V., Jankowitsch, F., Sandhoff, R. & Mack, M. (2016).** Identification of the key enzyme of roseoflavin biosynthesis. *Angew Chem Int Ed Engl* **55**, 6103–6106.
- Shinobu, R. (1974).** *Streptomyces davawensis* nov. sp. *Memoirs Osaka Kyoiku Univ* **23**, 1–8.
- Singh, A. K., Shin, J.-H., Lee, K.-L., Imlay, J. A. & Roe, J.-H. (2013).** Comparative study of SoxR activation by redox-active compounds. *Mol Microbiol* **90**, 983–996.
- Sinsereekul, N., Wangkam, T., Thamchaipenet, A., Sriksirin, T., Eurwilaichitr, L. & Champreda, V. (2010).** Recombinant expression of BTA hydrolase in *Streptomyces rimosus* and catalytic analysis on polyesters by surface plasmon resonance. *Appl Microbiol Biotechnol* **86**, 1775–1784.
- Sinz, A. (2010).** Investigation of protein-protein interactions in living cells by chemical crosslinking and mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* **397**, 3433–3440.
- Smolle, M. & Lindsay, J. G. (2006).** Molecular architecture of the pyruvate dehydrogenase complex: bridging the gap. *Biochem Soc Trans* **34**, 815–818.
- Sosio, M., Giusino, F., Cappellano, C., Bossi, E., Puglia, A. M. & Donadio, S. (2000).** Artificial chromosomes for antibiotic-producing *actinomycetes*. *Nat Biotechnol* **18**, 343–345.
- Spitzer, J. & Poolman, B. (2013).** How crowded is the prokaryotic cytoplasm? *FEBS Lett* **587**, 2094–2098.
- Staudt, H., Oesterheld, D., Grininger, M. & Wachtveitl, J. (2012).** Ultrafast excited-state deactivation of flavins bound to dodecin. *J Biol Chem* **287**, 17637–17644.
- Sultana, A., Kallio, P., Jansson, A., Wang, J.-S., Niemi, J., Mäntsälä, P. & Schneider, G. (2004).** Structure of the polyketide cyclase SnoaL reveals a novel mechanism for enzymatic aldol condensation. *EMBO J* **23**, 1911–1921.

- Sutherland, B. W., Toews, J. & Kast, J. (2008).** Utility of formaldehyde cross-linking and mass spectrometry in the study of protein-protein interactions. *J Mass Spectrom* **43**, 699–715.
- Tadeo, X., López-Méndez, B., Trigueros, T., Laín, A., Castaño, D. & Millet, O. (2009).** Structural basis for the aminoacid composition of proteins from halophilic archaea. *PLoS Biol* **7**, e1000257.
- Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979).** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**, 4350–4354.
- Troost, T. R., Danilenko, V. N. & Lomovskaya, N. D. (1979).** Fertility properties and regulation of antimicrobial substance production by plasmid SCP2 of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **140**, 359–368.
- UniProt Consortium (2007).** The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* **35**, D193–7.
- Ushijima, H., Okamura, H., Nishina, Y. & Shiga, K. (1989).** Effects of pH and ionic strength on the binding of egg white riboflavin binding protein with flavins. *J Biochem* **105**, 467–472.
- Uversky, V. N. (2011).** Intrinsically disordered proteins may escape unwanted interactions via functional misfolding. *Biochim Biophys Acta* **1814**, 693–712.
- van der Meide, P. H., Vijgenboom, E., Talens, A. & Bosch, L. (1983).** The role of EF-Tu in the expression of tufA and tufB genes. *Eur J Biochem* **130**, 397–407.
- Vara, J., Lewandowska-Skarbek, M., Wang, Y. G., Donadio, S. & Hutchinson, C. R. (1989).** Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in *Saccharopolyspora erythraea* (*Streptomyces erythreus*). *J Bacteriol* **171**, 5872–5881.
- Veres, G., Gibbs, R., Scherer, S. & Caskey, C. (1987).** The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* **237**, 415–417.
- Vitreschak, A. G., Rodionov, D. A., Mironov, A. A. & Gelfand, M. S. (2002).** Regulation of riboflavin biosynthesis and transport genes in bacteria by transcriptional and translational attenuation. *Nucleic Acids Res* **30**, 3141–3151.
- Vogl, C., Grill, S., Schilling, O., Stulke, J., Mack, M. & Stolz, J. (2007).** Characterization of riboflavin (vitamin B2) transport proteins from *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol* **189**, 7367–7375.
- Wang, J., Nemeria, N. S., Chandrasekhar, K., Kumaran, S., Arjunan, P., Reynolds, S., Calero, G., Brukh, R. & Kakalis, L. & other authors (2014).** Structure and function of the catalytic domain of the dihydrolipoyl acetyltransferase component in *Escherichia coli* pyruvate dehydrogenase complex. *J Biol Chem* **289**, 15215–15230.
- Wang, M., Roberts DL., D. L., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B. S. & Kim, J. J. (1997).** Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8411–8416.
- Weiser, J. & Ruusala, T. (1986).** Cross-reactivity studies on the interaction between elongation factors Tu and Ts from *Streptomyces aureofaciens* and *Escherichia coli* in the GDP exchange reaction. *FEBS Lett* **202**, 7–11.

- Wheeldon, I., Minter, S. D., Banta, S., Barton, S. C., Atanassov, P. & Sigman, M. (2016).** Substrate channelling as an approach to cascade reactions. *Nat Chem* **8**, 299–309.
- Wienken, C. J., Baaske, P., Rothbauer, U., Braun, D. & Duhr, S. (2010).** Protein-binding assays in biological liquids using microscale thermophoresis. *Nat Commun* **1**, 100.
- Williamson, M. P. & Sutcliffe, M. J. (2010).** Protein-protein interactions. *Biochem Soc Trans* **38**, 875–878.
- Woldringh, C. L. (2002).** The role of co-transcriptional translation and protein translocation (transertion) in bacterial chromosome segregation. *Mol Microbiol* **45**, 17–29.
- Woodmansee, A. N. & Imlay, J. A. (2002).** Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *J Biol Chem* **277**, 34055–34066.
- Wright, L. F. & Hopwood, D. A. (1976).** Identification of the antibiotic determined by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Gen Microbiol* **95**, 96–106.
- Yamanaka, K., Oikawa, H., Ogawa, H. O., Hosono, K., Shinmachi, F., Takano, H., Sakuda, S., Beppu, T. & Ueda, K. (2005).** Desferrioxamine E produced by *Streptomyces griseus* stimulates growth and development of *Streptomyces tanashiensis*. *Microbiology* **151**, 2899–2905.
- Yanai, K. & Murakami, T. (2004).** The kanamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kanamyceticus*. *J Antibiot (Tokyo)*. **57**, 351–354.
- Yoo, J. S., Oh, G. S., Ryoo, S. & Roe, J. H. (2016).** Induction of a stable sigma factor SigR by translation-inhibiting antibiotics confers resistance to antibiotics. *Sci Rep* **6**, 28628.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. & Storz, G. (1999).** OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**, 4639–4643.
- Zou, P., Borovok, I., Ortiz de Oru  Lucana, D., Muller, D. & Schrempf, H. (1999).** The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology* **145 ( Pt 3)**, 549–559.
- Zuker, M. (2003).** Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**, 3406–3415.

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke im Besonderen Herrn Prof. Dr. Reinhard Fischer für die Ermöglichung meiner Promotion und die Betreuung der Doktorarbeit. Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. Matthias Mack für die Überlassung des Themas, die Betreuung an der Hochschule und die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Prof. Dr. Martin Grininger und seiner Arbeitsgruppe am Buchmann-Institut für Molekulare Lebenswissenschaften, Frankfurt am Main, für die Strukturanalyse von Dodecin und die hilfreichen Fachgespräche.

Ich danke außerdem Prof. Dr. Uwe Sauer und Dr. Daniel Charles Sévin an der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich für die Messungen und Analysen der Metabolome.

Prof. Dr. Jörn Kalinowski und Dr. Tobias Busche am Centrum für Biotechnologie, Universität Bielefeld, danke ich für die RNA-Sequenzierungen der Transkriptome.

Ein herzlicher Dank gilt auch allen aktuellen und ehemaligen Doktoranden und Mitarbeitern der Institute für Technische Mikrobiologie und Biochemie der Hochschule Mannheim für die fachliche Beratung und eine schöne Zeit während meiner Promotion.

Dem BMBF danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des NANOKAT-Promotionskollegs.

Ganz besonders möchte ich mich aber bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich vor und während meiner Promotionszeit immer unterstützt und mir stets Mut zugesprochen haben.