

Die Phosphatase RosC
katalysiert den letzten unbekanntesten Schritt
der Roseoflavin-Biosynthese
in *Streptomyces davaonensis*

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)

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

DISSERTATION

von

Dipl.-LMChem. Carmen Schneider

1. Referent: Prof. Dr. Reinhard Fischer
 2. Referent: Prof. Dr. Matthias Mack
- Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2020

Inhaltsverzeichnis

Erklärung zu Fremd- und Eigenleistung	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Tabellenverzeichnis	XI
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung und Zielsetzung	3
2.1 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten.....	3
2.1.1 Das Genus <i>Streptomyces</i>	3
2.1.2 Biosynthesecluster von Naturstoffen in Streptomyceten.....	3
2.1.3 Das Bakterium <i>Streptomyces davaonensis</i>	4
2.2 Wirkungsweise und Biosynthese des Antibiotikums Roseoflavin	5
2.3 Eigenschaften und Biosynthese des Vitamins Riboflavin.....	8
2.4 Phosphatasen	11
2.5 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Material	15
3.1 Laborgeräte.....	15
3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	16
3.3 Nährmedien, Lösungen und Puffer.....	19
3.4 Bakterienstämme und Oligonukleotide	24
3.5 Programme und Datenbanken	29
4 Methoden	31
4.1 Mikrobiologische Methoden.....	31
4.1.1 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen	31
4.1.2 Zelldichtemessung von Bakterienkulturen	32
4.1.3 Transfer von DNA in <i>E. coli</i> und Streptomyceten.....	32
4.1.4 Überproduktion von Proteinen in <i>E. coli</i>	34
4.1.5 Selenomethionin-Markierung von Proteinen.....	35
4.2 Molekularbiologische Methoden	36
4.2.1 Isolation von chromosomaler DNA aus Streptomyceten.....	36
4.2.2 Isolation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> und Reinigung von DNA-Lösungen.....	37
4.2.3 Polymerase Kettenreaktion und Agarosegelelektrophorese	38
4.2.4 Hydrolyse, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten	43
4.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen und Sequenzierung.....	44
4.2.6 Konstruktion des Expressionsvektors pPSG_IBA3 <rosC _{opt} _N>.....	45

4.2.7	Mutagenese des Expressionsvektors pPSG_IBA3 <rosC _{opt} _N>	46
4.2.8	Deletion von BN159_8033 in <i>S. davaonensis</i>	48
4.2.9	Expression von BN159_8033 in <i>S. davaonensis</i>	53
4.3	Biochemische Methoden	53
4.3.1	Mechanischer Aufschluss von Bakterienzellen.....	53
4.3.2	Proteinbestimmung nach Bradford und SDS-PAGE	54
4.3.3	Entfernung des N-terminalen Strep-Tags durch Faktor Xa Hydrolyse	54
4.3.4	Fast Protein Liquid Chromatography	55
4.3.5	High Performance Liquid Chromatography.....	57
4.3.6	<i>In vitro</i> Enzymaktivitätstests	59
5	Ergebnisse	63
5.1	AFP-Phosphataseaktivität in zellfreien Extrakten von Streptomyceten.....	63
5.2	Deletion und Expression von BN159_8033 in <i>S. davaonensis</i>	68
5.2.1	Untersuchung des Wachstums und der Roseoflavin-Produktion	69
5.2.2	Bestimmung der <i>in vitro</i> AFP-Phosphataseaktivität	70
5.3	Sequenzvergleiche und Klassifizierung von RosC.....	72
5.4	Chromatographische Reinigung von RosC ^{StrepN} aus <i>E. coli</i>	76
5.5	Charakterisierung des neuen Enzyms RosC	80
5.5.1	Bestimmung der nativen Proteingröße	80
5.5.2	Bestimmung der <i>in vitro</i> AFP-Phosphataseaktivität	81
5.5.3	Entfernung des N-terminalen Strep-Tags von RosC ^{StrepN}	82
5.5.4	Identifizierung der Substrate.....	83
5.5.5	Bestimmung der kinetischen Parameter	86
5.5.6	Mutagenese der Phosphatbindetasche	88
6	Diskussion	91
6.1	RosC katalysiert den letzten unbekanntem Schritt der Roseoflavin-Biosynthese.....	91
6.2	Die Roseoflavin-Biosynthesegene sind nicht in einem Cluster arrangiert	92
6.3	RosC Reinigung aus <i>E. coli</i> und Bestimmung der RosC-Aktivität	95
6.4	RosC ist ein Mitglied der Histidin-Phosphatase Superfamilie.....	97
6.5	Die Phosphatase RosC im Roseoflavin-Stoffwechsel von <i>S. davaonensis</i>	99
6.6	Phosphatasen im Riboflavin-Stoffwechsel.....	101
7	Anhang	105
	Literaturverzeichnis	111

Erklärung zu Fremd- und Eigenleistung

Diese Arbeit wurde innerhalb des Forschungskollegs NANOKAT II (Hochschule Mannheim) in dem Zeitraum Dezember 2016 bis Juni 2020 am Institut für Technische Mikrobiologie der Hochschule Mannheim durchgeführt. Das kooperative Forschungskolleg NANOKAT II wurde durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Die aktive Laufzeit war von Mai 2015 bis Oktober 2018, mit einer Verlängerung bis 2019. An diesem Forschungskolleg waren, neben der Hochschule Mannheim, die Universität Marburg, das Karlsruher Institut für Technologie (KIT), die technische Universität Darmstadt und die Hochschule Darmstadt beteiligt.

RosC-Varianten wurden dem Projektpartner Dr. Ermler (Abteilung Molekulare Membranbiologie des Max-Planck-Instituts für Biophysik, Frankfurt) für Kristallisationsexperimente, zur Aufklärung der Struktur, zur Verfügung gestellt.

Die Analyse der 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphataseaktivität von RosC wurde innerhalb der wissenschaftlichen Abschlussarbeit, zur Erlangung des Titels „Bachelor of Science“, von Katharina Buck (Hochschule Mannheim) durchgeführt (siehe Verzeichnis der betreuten Arbeiten). Alle weiteren Arbeiten, die in dieser Arbeit vorgestellt werden, wurden eigenständig durchgeführt.

Teile der Arbeit wurden bereits zur Veröffentlichung eingereicht (siehe Verzeichnis der wissenschaftlichen Publikationen).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Strukturen von Riboflavin (RF) und Roseoflavin (RoF).....	5
Abbildung 2. Roseoflavin-Biosynthese in <i>S. davaonensis</i>	7
Abbildung 3. Biosynthese von Riboflavin (RF) und der Flavin-Cofaktoren Riboflavin-5'-Phosphat (RP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) in <i>S. davaonensis</i> (Kissling <i>et al.</i> , 2020; Fischer & Bacher, 2005).....	9
Abbildung 4. Ein 106 kb-Fragment aus <i>S. davaonensis</i> , auf dem sich alle Gene für die Roseoflavin-Biosynthese befinden (Jankowitsch & Schwarz <i>et al.</i> , 2012).....	13
Abbildung 5. Schema des gekoppelten <i>in vitro</i> AFP-Phosphatase-Enzymtests.	63
Abbildung 6. HPLC-DAD Chromatogramme des gekoppelten <i>in vitro</i> AFP-Phosphatase-Enzymtests der Stämme <i>S. coelicolor</i> M1152 (A), <i>S. davaonensis</i> (B), <i>S. cinnabarinus</i> (C) und <i>S. coelicolor</i> M1152 pESAC13-SD106kb (D) nach 0, 20 und 60 min Reaktionszeit. .	64
Abbildung 7. Ein <i>S. davaonensis</i> Fragment, das alle notwendigen Gene (einschließlich das Phosphatasegen) für die heterologe Roseoflavin-Produktion in <i>S. coelicolor</i> M1152 enthält (A) und HPLC-DAD Chromatogramme des gekoppelten <i>in vitro</i> AFP-Phosphatase-Enzymtests der Stämme <i>S. davaonensis</i> Δ clus_rosB (B) und <i>S. davaonensis</i> Δ clus_rosA (C) nach 0, 20 und 60 min Reaktionszeit.	66
Abbildung 8. Roseoflavin-Produktionsraten in <i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Deletions-, Komplementations- und Überexpressionsstämmen, im Vergleich zu <i>S. davaonensis</i> Wildtyp.	69
Abbildung 9. <i>In vitro</i> AFP-Phosphatase-Enzymtest mit zellfreien Extrakten von <i>S. davaonensis</i> Wildtyp (A), <i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Deletionsstämmen (B), <i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Komplementationsstämmen (C) und <i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Überexpressionsstamm (D).	71
Abbildung 10. Vergleich der Roseoflavin-Biosynthesegene <i>ribCF</i> , <i>rosB</i> , <i>rosA</i> und <i>rosC</i> (A) und der Roseoflavin-Biosynthesenzyme RibCF, RosB, RosA und RosC (B) in den beiden Roseoflavin-Produzenten <i>S. davaonensis</i> und <i>S. cinnabarinus</i>	73
Abbildung 11. Ergebnisse der RosC-Klassifizierung durch das InterPro Tool des Europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie (EMBL).	74
Abbildung 12. Sequenzvergleiche der Primärstrukturen repräsentativer Phosphatasen, die eine Ähnlichkeit zu RosC aus <i>S. davaonensis</i> aufweisen (basierend auf BLASTp-Analysen).	75
Abbildung 13. Elutionsprofile der RosC ^{StrepN} Reinigungsprotokolle Strep-AEX-SEC (A) und Strep-SEC Entsalzung (B).....	77
Abbildung 14. SDS-PAGE/ Coomassie R-250 G Färbung von <i>E. coli</i> Rohextrakten (10 μ g Gesamtprotein) und RosC ^{StrepN} Elutionsfraktionen (5 μ g Gesamtprotein) aus der Strep-AEX-SEC Reinigung.	79
Abbildung 15. Vergleich der Chromatogramme der Gelfiltration von RosC ^{StrepN} mit Referenzproteinen auf einer Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule (GE Healthcare) in 0,5 ml/min TBS-Puffer.	80

Abbildung 16. Zeitlicher Verlauf des RosC ^{StrepN} -katalysierten AFP-Abbaus und AF-Aufbaus.....	81
Abbildung 17. SDS-PAGE/ Coomassie R-250 G Färbung verschiedener Fraktionen aus der Affinitätschromatographie von RosC und RosC ^{StrepN} , nach Behandlung mit Faktor Xa Protein.....	82
Abbildung 18. Reaktionsverlauf der RosC ^{StrepN} -katalysierten Bildung der Reaktionsprodukte 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin (AF), Roseoflavin (RoF) und Riboflavin (RF) und chemische Strukturen der eingesetzten phosphorylierten Substrate.....	83
Abbildung 19. RosC ^{StrepN} katalysiert nicht die Dephosphorylierung des Riboflavin-Vorläufers GTP.....	84
Abbildung 20. RosC ^{StrepN} katalysiert nicht die Dephosphorylierung des Riboflavin-Intermediates 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> , 3 <i>H</i>)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP)..	85
Abbildung 21. Alle getesteten Verbindungen im <i>in vitro</i> Phosphatase-Enzymtest und ihre chemischen Strukturen.....	86
Abbildung 22. Bestimmung der kinetischen Parameter für die Dephosphorylierung von AFP (links) und RP (rechts).....	87
Abbildung 23. Die Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 sind essentiell für die RosC-Aktivität.	88
Abbildung 24. Die RosC ^{StrepN} -Variante RosC ^{StrepN} R33A bindet Riboflavin, im Gegensatz zu Wildtyp-RosC ^{StrepN}	89
Abbildung 25. Hypothetischer Mechanismus der Dephosphorylierungsreaktion in RosC in Anlehnung an Rigden (2008).....	98
Abbildung 26. Im Genom des Roseoflavin-Produzenten <i>S. cinnabarinus</i> befindet sich ein Homolog zu BN159_8033.	109

Abkürzungsverzeichnis

AEX	Anionenaustausch, <i>anion exchange</i>	Kan	Kanamycin
AF	8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin	KEGG	Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome
AFP	8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat	LB	<i>lysogeny broth</i>
Amp	Ampicillin	LU	6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin
Apra	Apramycin	MAF	8-Demethyl-8-Methylamino-Riboflavin
ARPP	5-Amino-6-ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> , 3 <i>H</i>)-pyrimidindion-5'-Phosphat	MS	Mannitol-Soja
BSA	Bovines Serumalbumin	MWCO	Molekulargewichtsausschluss, <i>molecular weight cutoff</i>
BTP	Bis-Tris-Propan	Ndx	Nalidixinsäure
Carb	Carbenicillin	OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm Wellenlänge
CDD	<i>conserved domain database</i>	OHC-RP	8-Demethyl-8-Formyl-Riboflavin-5'-Phosphat
Cml	Chloramphenicol	oriT	Transferursprung, <i>origin of transfer</i>
CV	Säulenvolumen, <i>column volume</i>	RF	Riboflavin
DAD	Diodenarray-Detektor	rib-Operon	Riboflavin-Biosyntheseoperon
DHBP	3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat	RoF	Roseoflavin
DTT	Dithiothreitol	RoFAD	Roseoflavin-Adenin-Dinukleotid
EMBL	Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie	RoRP	Roseoflavin-5'-Phosphat
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid	RosC^{StrepN}	RosC an einen N-terminalen Strep-Tag II fusioniert
FLD	Fluoreszenz-Detektor	RP	Riboflavin-5'-Phosphat
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>	SAM	S-Adenosylmethionin
FRT	Flippase Erkennungssequenzen, <i>flippase recognition targets</i>	SEC	Größenausschlusschromatographie, <i>size exclusion chromatography</i>
HAD	Haloacid-Dehalogenase	TCA	Trichloressigsäure, <i>trichloroacetic acid</i>
HOOC-RP	8-Demethyl-8-Carboxyl-Riboflavin-5'-Phosphat	TM	Trockenmasse
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie, <i>high performance liquid chromatography</i>	ÜNK	Übernachtkultur
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	WT	Wildtyp
		YS	Hefe-Stärke, <i>yeast starch</i>
		YT	Hefe-Trypton, <i>yeast tryptone</i>

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.	15
Tabelle 2. Verwendete Komplettsysteme und deren Hersteller.	16
Tabelle 3. Verwendete Enzyme und deren Hersteller.	17
Tabelle 4. Verwendete Marker, Probenpuffer und weitere Komponenten zur Durchführung molekularbiologischer und biochemischer Experimente und deren Hersteller.	17
Tabelle 5. Verwendete Chromatographiesäulen und deren Hersteller.	18
Tabelle 6. Verwendete Nährmedien und deren Zusammensetzung zur Kultivierung von Mikroorganismen.	19
Tabelle 7. Verwendete konzentrierte Lösungen zur Herstellung von Nährmedien.	20
Tabelle 8. Verwendete Antibiotika und deren Selektionskonzentrationen.	20
Tabelle 9. Verwendete Chromatographiepuffer und deren Zusammensetzung.	21
Tabelle 10. Weitere verwendete Lösungen und Puffer.	22
Tabelle 11. Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.	24
Tabelle 12. Verwendete Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften.	25
Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide, deren Sequenzen und Funktionen.	27
Tabelle 14. Verwendete Programme und Datenbanken.	29
Tabelle 15. Standard PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der DreamTaq DNA-Polymerase.	39
Tabelle 16. PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen mit der DreamTaq DNA-Polymerase.	39
Tabelle 17. Standard PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase.	40
Tabelle 18. PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase.	40
Tabelle 19. Ansatz für die Kolonie-PCR von <i>E. coli</i> -Zellen.	41
Tabelle 20. PCR-Programm zur Amplifizierung von Kolonie-PCR-Reaktionen von <i>E. coli</i> -Zellen.	41
Tabelle 21. Kolonie-PCR-Ansatz mit Streptomyceten-Mycel.	42
Tabelle 22. PCR-Programm für die Kolonie-PCR mit Streptomyceten-Mycel.	42
Tabelle 23. Standardansatz der enzymatischen Hydrolyse mit FastDigest-Enzymen.	44
Tabelle 24. Standard Reaktionsansatz der Stargate Direkt-Transfer-Klonierung.	46

Tabelle 25. Standard Reaktionsansatz für Mutagenese-Experimente in pPSG_IBA3 <rosC _{opt_N} > mit dem Quikchange Lightning Mutagenesis Kit.	47
Tabelle 26. PCR-Programm zur Amplifizierung des mutagenisierten Vektors pPSG_IBA3 <rosC _{opt_N} >.....	47
Tabelle 27. PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 (Gust <i>et al.</i> , 2003).....	49
Tabelle 28. PCR-Programm zur Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 (Gust <i>et al.</i> , 2003).....	50
Tabelle 29. Puffer für die Affinitätschromatographie.....	56
Tabelle 30. Gradientenprofil für die HPLC-Analyse von Flavingemischen.....	58
Tabelle 31. Analytierte Flavine, deren Retentionszeiten und Detektionsbedingungen. ...	59
Tabelle 32. Ansatz eines gekoppelten <i>in vitro</i> AFP-Phosphatase-Enzymtests mit zellfreien Extrakten aus Streptomyceten.....	60
Tabelle 33. Ansatz des <i>in vitro</i> Phosphataseaktivitätsenzymtests mit gereinigten Enzymlösungen oder zellfreien Extrakten verschiedener <i>S. davaonensis</i> Stämme.	60
Tabelle 34. Ansatz des 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-Pyrimidindion-5'-Phosphatase-Enzymtests nach Sarge <i>et al.</i> (2015).....	62
Tabelle 35. Hypothetische Genprodukte aus BLASTp-Analysen und Einträge in der Datenbank Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG) der Gene des <i>rosA</i> -Clusters (BN159_8026-8035) von <i>S. davaonensis</i>	67
Tabelle 36. „Hydrolase“ und „Phosphatase“ Stichwort-Suche im UniProt-Verzeichnis von <i>S. davaonensis</i>	92
Tabelle 37. Eigenschaften der Roseoflavin-Biosynthesegene und Biosynthesenzyme von <i>S. davaonensis</i>	100
Tabelle 38. Identifizierung drei putativer Phosphatasegene in <i>S. davaonensis</i> und ihre hypothetischen Genprodukte.....	102
Tabelle 39. Steigungen aus dem AFP-Phosphatase-Enzymtest im linearen Bereich der AF-Bildung zwischen 0 und 5 min Reaktionszeit in $\mu\text{mol min}^{-1} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) und daraus berechnete spezifische Aktivitäten in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein} \pm \text{SD}$ ($n = 3$), abhängig von der eingesetzten RosC ^{StrepN} -Konzentration.	109

1 Zusammenfassung

Roseoflavin (8-Demethyl-8-Dimethylamino-Riboflavin) ist eines der wenigen bekannten Vitaminanaloge mit antibiotischer Aktivität. Die Gram-positiven Bodenbakterien *Streptomyces davaonensis* und *Streptomyces cinnabarinus* produzieren Roseoflavin unter Laborbedingungen in der stationären Wachstumsphase. Die Biosynthese von Roseoflavin (RoF) ist weitestgehend aufgeklärt und drei Enzyme, die an der Umwandlung von Riboflavin (Vitamin B2) zu Roseoflavin beteiligt sind (RibCF, RosB und RosA), konnten identifiziert werden. Das Reaktionsprodukt von RosB ist 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat (AFP) und wird von RosA nicht als Substrat akzeptiert. Eine unbekannte AFP-Phosphatase katalysiert demnach die Dephosphorylierung von AFP zu 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin (AF). Ziel dieser Arbeit war es, die noch unbekannte Phosphatase der RoF-Biosynthese zu identifizieren.

Mithilfe eines gekoppelten Enzymtests konnte die Anwesenheit einer AFP-Phosphatase in zellfreien Extrakten der RoF-Produzenten *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* nachgewiesen werden. *Streptomyces coelicolor* M1152 ist kein RoF-Produzent und wies keine AFP-Phosphataseaktivität auf (Negativkontrolle). Der rekombinante Stamm *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb enthält ein Cosmid mit einem genomischen Fragment aus *S. davaonensis*, einschließlich der beiden bekannten Roseoflavin-Biosynthesegene *rosA* und *rosB*. Beide Gene liegen in voneinander getrennten Genclustern (*rosA*-Cluster und *rosB*-Cluster). Zellfreie Extrakte aus *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb zeigten AFP-Phosphataseaktivität, im Gegensatz zur Negativkontrolle *S. coelicolor* M1152. Dies deutete auf die Anwesenheit des gesuchten AFP-Phosphatasegen auf diesem subchromosomalen DNA-Fragment hin. Eine Deletion des *rosB*-Clusters (Gene BN159_7985 bis BN159_7990) hatte keine Auswirkungen auf die AFP-Phosphataseaktivität in *S. davaonensis*. Die Deletion des *rosA*-Clusters (Gene BN159_8026 bis BN159_8035) führte dagegen zum Verlust der AFP-Phosphataseaktivität. Das gesuchte AFP-Phosphatasegen befand sich demnach innerhalb des *rosA*-Clusters. Eine BLASTp-Analyse aller Genprodukte des *rosA*-Clusters lieferte ein Kandidaten-Gen (BN159_8033; annotiert als „Phosphoglyceratmutase“) direkt strangabwärts von *rosA*. *S. davaonensis* Stämme, in denen BN159_8033 deletiert wurde, zeigten im Durchschnitt 70 % geringere RoF-Produktionsraten, im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp, wobei AFP-Phosphataseaktivität in zellfreien Extrakten dieser Stämme nicht mehr nachweisbar war. Die Komplementation der BN159_8033-Deletionsstämme, in denen BN159_8033 an einer anderen Stelle des *S. davaonensis* Genoms integriert und exprimiert wurde, führte zu Stämmen mit Wildtyp-ähnlichen RoF-Produktionsraten. Die AFP-Phosphataseaktivität zellfreier Extrakte dieser Komplementationsstämme war vergleichbar zu *S. davaonensis* Wildtyp. Die AFP-Phosphataseaktivität von BN159_8033 im RoF-Stoffwechsel wurde mit diesen Ergebnissen experimentell bestätigt. Nach RosA und RosB ist

BN159_8033 das dritte Enzym der RoF-Biosynthese. Aus diesem Grund wurde das Enzym RosC und das dazugehörige Gen *rosC* genannt.

Sequenzvergleiche von *rosC* (BLASTn) ergaben, dass auch im zweiten bekannten RoF-Produzenten *S. cinnabarinus* ein ähnliches Gen (96 %) vorhanden ist. Die Organisation der RoF-Gene, einschließlich des neuentdeckten *rosC*, ist in den Genomen von *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* nahezu identisch. Ein Sequenzvergleich der Primärstruktur von RosC mit Phosphatasen aus der InterPro-Datenbank zeigte eine hohe Übereinstimmung mit Histidin-Phosphatasen auf. Im Rahmen dieser Arbeit konnten die Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 mithilfe der Datenbank CDD (*conserved domain database*) als Teil des katalytischen Zentrums von RosC identifiziert werden. Deren essentielle Rolle im Hinblick auf die Dephosphorylierung von AFP wurde mithilfe von Mutagenese-Experimenten bestätigt, wobei der Austausch der oben genannten Aminosäuren durch einen Alanin-Rest zu stark reduzierten RosC-Aktivitäten führte.

RosC ist das Enzym der RoF-Biosynthese in *S. davaonensis* mit der höchsten Umsatzrate ($V_{\max} = 1,25 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$). Neben dem natürlichen Substrat AFP katalysiert RosC auch die Dephosphorylierung der strukturell verwandten, phosphorylierten Flavine Roseoflavin-5'-Phosphat (RoRP) und Riboflavin-5'-Phosphat (RP). Die Dephosphorylierung des wichtigen Cofaktors RP verlief dabei langsamer ($V_{\max} = 0,28 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$) als die Dephosphorylierung von AFP. Für RP konnte ein annähernd 10-fach höherer K_M -Wert ($K_M = 310,5 \pm 61,5 \mu\text{M}$) im Vergleich zu AFP ($K_M = 34,5 \pm 5,6 \mu\text{M}$) ermittelt werden. Eine Dephosphorylierung der Riboflavin-Vorstufen GTP und 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat wurde nicht festgestellt. Bei RosC handelt es sich demnach um eine sehr spezifische Phosphatase, die zu einer effizienten RoF-Produktion in *S. davaonensis* beiträgt. Der Cofaktor RP wird dabei kaum umgesetzt, was die Ausbildung eines „nutzlosen Kreislaufes“ (*futile cycle*) verhindert.

Die RoF-Biosynthese in *S. davaonensis* ist nun vollständig aufgeklärt. Es werden vier Enzyme benötigt (RibCF, RosB, RosC und RosA), um ein Vitamin in ein Antibiotikum mit breitem Wirkspektrum umzuwandeln.

2 Einleitung und Zielsetzung

2.1 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten

2.1.1 Das Genus *Streptomyces*

Das Genus *Streptomyces* gehört zu der Familie der *Streptomycetaceae* aus der Klasse der Actinobakterien (GC reiche Gram-positive Bakterien). Der Name *Streptomyces* wurde von Waksman und Henrici (1943) vorgeschlagen und bezeichnet aerobe, saprophytische Actinomyceten (Waksman & Henrici, 1943; Kieser *et al.*, 2000). Der Entwicklungszyklus der Streptomyceten beginnt mit der Keimung der Sporen. Unter günstigen Temperatur- und Feuchtigkeitsbedingungen wird ein Keimfaden entwickelt und die Ausbildung des Substratmycels initiiert. Im Anschluss an das dünne, filamentöse Substratmycel beginnt die Entwicklung des Luftmycels mit kettenförmigen Sporen. Die Ausbildung einer Schicht von Hyphen und die Differenzierung in Sporenketten ist einzigartig für Streptomyceten innerhalb der Gram-positiven Bakterien (Waksman & Henrici, 1943). Mitglieder des Genus *Streptomyces* besitzen meist ein lineares Genom, welches reich an den Nukleobasen Guanin und Cytosin ist (über 70 %) (Kieser *et al.*, 2000). Viele bekannte Streptomyceten-Arten besitzen Genome über 9 Megabasenpaaren (Kieser *et al.*, 2000; Bentley *et al.*, 2002). Die Genome sind damit etwa doppelt so groß wie beispielsweise das Genom von *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis* (Blattner *et al.*, 1997; Moszer, 1998). Streptomyceten sind überwiegend im Boden zu finden und dort unter anderem für den charakteristischen Geruch von Waldboden verantwortlich, der durch den Stoff Geosmin von *Streptomyces coelicolor* verursacht wird (Bentley *et al.*, 2002; Kieser *et al.*, 2000). Die Forschung über Streptomyceten und deren Naturstoffe wurde bereits im Jahr 1952 für die Entdeckung des Antibiotikums Streptomycin von Waksman mit einem Nobelpreis ausgezeichnet (Waksman *et al.*, 1946) und erneut im Jahr 2015 für die Entdeckung von Ivermectin, einer Verbindung zur Therapie von Wurminfektionen (Campbell *et al.*, 1983).

2.1.2 Biosynthesecluster von Naturstoffen in Streptomyceten

Streptomyceten wurden aufgrund ihrer vielfältigen Funktionen im Jahr 2016 von der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie zur Mikrobe des Jahres gewählt (Dingermann & Zündorf, 2016). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Produktion von Naturstoffen. Als erstes Antibiotikum aus Streptomyceten wurde Streptothricin im Jahr 1942 aus *Streptomyces lavendulae* isoliert (Waksman, 1943; Goo *et al.*, 1996; Kieser *et al.*, 2000). Erst nach der Entdeckung von Streptomycin aus *Streptomyces griseus* im Jahr 1943 wurde die Suche nach weiteren Antibiotika innerhalb des Genus *Streptomyces* vertieft (Waksman *et al.*, 1946; Lima Procópio *et al.*, 2012). Infolge einer ausgiebigen Suche nach antibiotischen Verbindungen sind viele Spezies der Gattung *Streptomyces* untersucht und als Antibiotika-

produzierende Arten charakterisiert. Die Entdeckung antimikrobieller Verbindungen aus Streptomyceten wuchs über zwei Jahrzehnte exponentiell an, mit einem Höhepunkt in den 1970er Jahren, und ging in den 1980er und 1990er Jahren schrittweise zurück (Lima Procópio *et al.*, 2012). Im Jahr 2001 wurden 80 % der bekannten Antibiotika aus der Gattung *Streptomyces* isoliert, unter anderem Cephalosporine aus *Streptomyces clavuligerus* (1945), Tetracyclin aus *Streptomyces aureofaciens* (1950) und Novobiocin aus *Streptomyces niveus* (1956) (Watve *et al.*, 2001). Neben antibakteriell-wirkenden Substanzen, produzieren Streptomyceten auch eine Reihe an Fungiziden, Insektiziden, Viruziden, Antitumormittel, Immunsuppressiva und blutdrucksenkende Arzneistoffe (Demain, 1999; Lima Procópio *et al.*, 2012).

Gene für die Biosynthese von Naturstoffen in Streptomyceten sind entweder in Genclustern (sog. Gencluster), zusammen mit den Resistenzgenen, angeordnet oder verteilt im Streptomyceten-Genom zu finden (Malpartida & Hopwood, 1986; Cundliffe, 1989; Kinashi & Shimaji-Murayama, 1991; Kieser *et al.*, 2000). Im Modellorganismus für Streptomyceten, *S. coelicolor* A3(2) liegen beispielsweise die Biosynthesegene für das Polyketid-Antibiotikum Actinorhodin zusammen mit Resistenzgenen und Genen für den Export in einem 26 kb Gencluster auf dem Chromosom (Rudd & Hopwood, 1979; Malpartida & Hopwood, 1986; Tahlan *et al.*, 2007). Die Gene für die beiden weiteren bekannten Antibiotika aus *S. coelicolor* A3(2), Undecylprodigiosin und Methylenomycin A, sind ebenfalls als Gencluster arrangiert. Das Undecylprodigiosin-Cluster ist auf dem Chromosom lokalisiert (Rudd & Hopwood, 1980; Malpartida & Hopwood, 1986), während sich das Methylenomycin A-Gencluster auf dem SCP1-Plasmid befindet (Kirby & Hopwood, 1977; Kinashi & Shimaji-Murayama, 1991). Die Biosynthesegene von Antibiotika liegen teilweise auch in großen Abschnitten über das Genom verteilt vor. Beispielsweise sind die Gene für das Makrolid-Antibiotikum Spiramycin aus *Streptomyces ambofaciens* auf einem 85 kb chromosomalen DNA-Fragment verstreut (Karray *et al.*, 2007). Im Roseoflavin-Produzenten *S. davaonensis* befinden sich die bislang bekannten Biosynthesegene *rosA* und *rosB* in einem 49 kb Abstand auf dem Chromosom (Jankowitsch *et al.*, 2011; Schwarz *et al.*, 2016).

2.1.3 Das Bakterium *Streptomyces davaonensis*

Das Roseoflavin (RoF)-produzierende Bakterium *S. davaonensis* DSM 101723^T oder JCM 4913^T (früher *S. davawensis*) wurde erstmals aus einer philippinischen Bodenprobe, im Rahmen eines Screening-Programmes für neue Antibiotika, isoliert (Otani *et al.*, 1974). Der Name „*S. davawensis*“ leitete sich von der Stadt Davao City ab, aus der die Bodenprobe stammte (Otani *et al.*, 1974; Landwehr *et al.*, 2018). Im Rahmen einer phylogenetischen Einordnung von „*S. davawensis*“ erfolgte die Korrektur des Namens in *S. davaonensis*. Auf Basis der 16S rRNA Untersuchungen wurden 23 Spezies des Genus *Streptomyces* ermittelt,

welche eine Ähnlichkeit von über 98,5 % zu *S. davaonensis* aufweisen. Eine dieser Spezies ist das nah verwandte, ebenfalls RoF-produzierende, Bakterium *Streptomyces cinnabarinus* (Landwehr *et al.*, 2018).

2.2 Wirkungsweise und Biosynthese des Antibiotikums Roseoflavin

S. davaonensis produziert RoF (8-Demethyl-8-Dimethylamino-Riboflavin), ein rotes Riboflavin (RF) Analogon mit antimikrobieller Wirkung gegen Gram-positive Bakterien (Otani *et al.*, 1974). RoF ist neben dem Vitamin B6-Antivitamin 4'-Methoxy-Pyridoxin (Wada *et al.*, 1985; Wada *et al.*, 1988) und dem Vitamin B1 Antivitamin Pyriithiamin (Woolley & White, 1943; Sudarsan *et al.*, 2005) eines der wenigen bekannten Antivitamine. RoF wird unter Laborbedingungen in der stationären Wachstumsphase von *S. davaonensis* und dem nah verwandten Bakterium *S. cinnabarinus* gebildet (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Nach aktueller Kenntnislage sind keine weiteren RoF-Produzenten bekannt. In der chemischen Struktur unterscheidet sich RoF von RF (Vitamin B2) durch die Seitenkette am C8 des Isoalloxazinring-Systems (Abbildung 1). Während RF eine Methylgruppe trägt, befindet sich bei RoF an dieser Stelle eine Dimethylaminogruppe. Die veränderte Seitenkette ist Basis der antimikrobiellen Wirkung von RoF (Otani *et al.*, 1974).

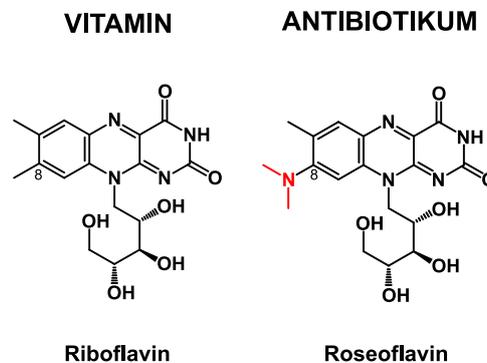


Abbildung 1. Strukturen von Riboflavin (RF) und Roseoflavin (RoF). Während RF eine Methylgruppe am C8 des Isoalloxazinring-Systems trägt, befindet sich bei RoF eine Dimethylaminogruppe (rot) an dieser Stelle.

Das Antibiotikum RoF wurde industriell zur Selektion von RF-Überproduzenten verwendet (Matsui *et al.*, 1982). Daraus resultierten unter anderem *B. subtilis* RF-Überproduzenten mit einem dereguliertem RF-Biosyntheseoperon (*rib*-Operon), durch Mutationen in den Genen für die bifunktionelle Flavokinase und FAD-Synthetase RibC (Coquard *et al.*, 1997) und im RP-RNA-Schalter (RP-Riboswitch, siehe unten) vor dem *rib*-Operon (Kil *et al.*, 1992).

RoF-sensitive Organismen, beispielsweise *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes* oder *S. coelicolor*, importieren RoF mithilfe endogener RF-Transporter (Mansjö & Johansson, 2011;

Grill *et al.*, 2007; Vogl *et al.*, 2007). RoF kann folglich nur gegen Mikroorganismen wirken, welche RF-Transporter besitzen. Das sind hauptsächlich Gram-positive Bakterien (Gutierrez-Preciado *et al.*, 2015). Im Cytoplasma RoF-sensitiver Organismen wird RoF zu den Cofaktoren Roseoflavin-5'-Phosphat (RoRP) und Roseoflavin-Adenin-Dinukleotid (RoFAD) durch promiskuitive Flavokinasen und FAD-Synthetasen umgewandelt (Grill *et al.*, 2008; Pedrolli *et al.*, 2011). Flavoproteine sind von den Cofaktoren Riboflavin-5'-Phosphat (RP) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) abhängig (Fraaije & Mattevi, 2000). RoRP und RoFAD sind in der Lage, an Flavoproteine zu binden. Aufgrund unterschiedlicher physikochemischer Eigenschaften kann die Bindung von RoRP oder RoFAD an Flavoproteine zu einer Inhibierung oder zu einem Verlust der Enzymaktivität führen (Shinkai *et al.*, 1986; Langer *et al.*, 2013).

Neben der Hemmung oder Inhibierung von Flavoproteinen besitzen RoF und seine Derivate einen weiteren antibiotischen Wirkmechanismus. RoRP ist fähig RP-Riboswitches zu binden (Ott *et al.*, 2009). Bei RP-Riboswitches handelt es sich um genetische Elemente, die die Expression der Gene kontrollieren, welche für RF-Biosynthese oder RF-Aufnahme verantwortlich sind. Hohe RP Konzentrationen führen zu einer reduzierten Genexpression der Riboswitch-kontrollierten Gene (Gelfand *et al.*, 1999; Mandal & Breaker, 2004). Die Anwesenheit von RoRP resultiert ebenfalls in einer verminderten Expression dieser Riboswitch-kontrollierten Gene, was zu einer RF-Auxotrophie führt (Ott *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009). Interessanterweise hat RoRP im RoF-Produzenten *S. davaonensis* einen gegenteiligen Effekt (Pedrolli *et al.*, 2012). Eine RoRP Bindung am *S. davaonensis* RP-Riboswitch stimuliert die Genexpression des RF-Biosyntheseclusters *ribE1MAB5H*. Dieser spezialisierte Riboswitch ist wahrscheinlich ein wichtiger Mechanismus im Hinblick auf die RoF-Resistenz von *S. davaonensis*. Ein Vergleich der Sequenzen der RP-Riboswitches zwischen *S. davaonensis* und mehreren RoF-sensitiven *Streptomyces* Spezies (unter anderem *S. coelicolor*) ergab, dass ein einziges Nukleotid (A61) für die RoF-Resistenz von *S. davaonensis* verantwortlich war (Pedrolli *et al.*, 2012).

Die RoF-Biosynthese ist durch die Phosphorylierung von RF zu RP, durch die bifunktionelle Flavokinase/ FAD-Synthetase RibC (EC 2.7.1.26), mit der RF-Biosynthese im Primärstoffwechsel verknüpft (Grill *et al.*, 2008; Schwarz *et al.*, 2016). In Abbildung 2 ist die RoF Biosynthese ausgehend von RF in *S. davaonensis* dargestellt. RP aus dem Primärmetabolismus wird zu 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat (AFP) metabolisiert. Ein einziges Enzym RosB (EC 2.6.1.114) katalysiert beide Oxidationsschritte zu 8-Demethyl-8-Carboxyl-Riboflavin-5'-Phosphat (HOOC-RP) über 8-Demethyl-8-Formyl-Riboflavin-5'-Phosphat (OHC-RP), sowie die Transaminierungsreaktion von HOOC-RP zu AFP in Anwesenheit von Sauerstoff, Thiamin und Glutamat (Schwarz *et al.*, 2016). Ein weiteres RoF-Biosyntheseenzym ist die S-Adenosylmethionin (SAM) abhängige *N*, *N*-Dimethyltransferase RosA (EC 2.1.1.343), welche die Bildung von RoF aus 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin (AF)

über das Reaktionsintermediat 8-Demethyl-8-Methylamino-Riboflavin (MAF) katalysiert (Jankowitsch *et al.*, 2011).

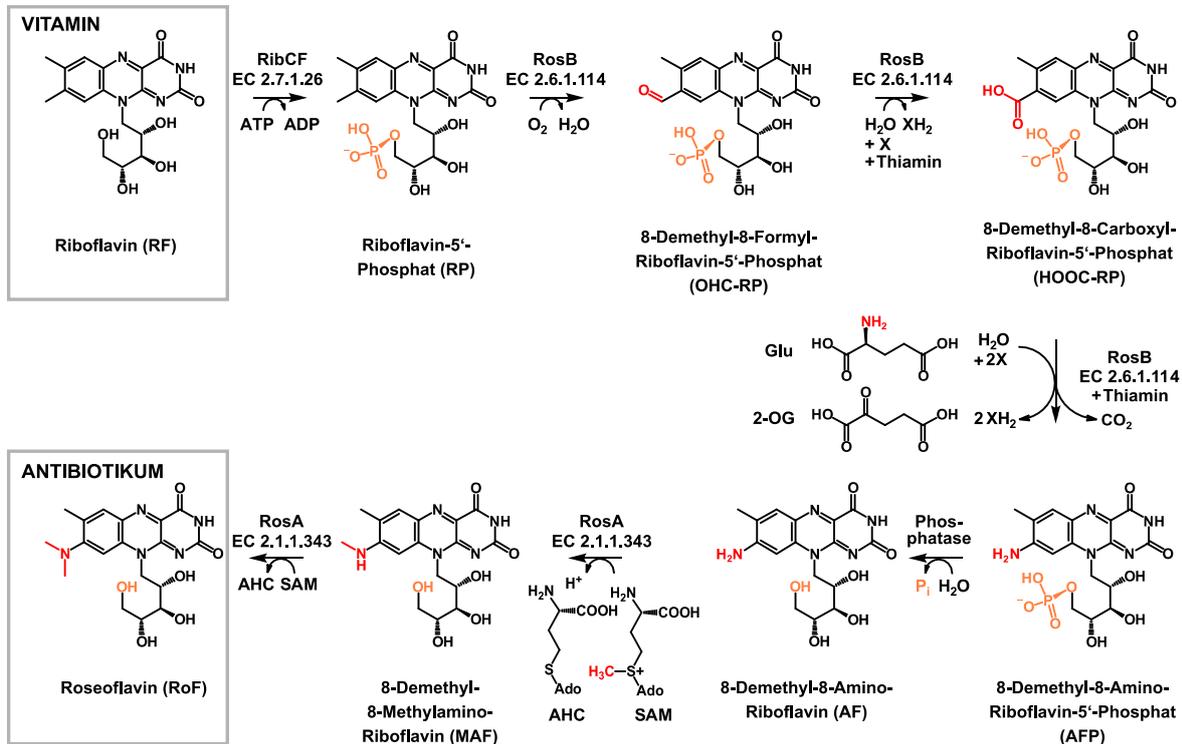


Abbildung 2. Roseoflavin-Biosynthese in *S. davaonensis*. Ausgehend von Riboflavin (RF) werden für die Synthese von Roseoflavin (RoF) vier Enzyme benötigt. Eine bifunktionelle Flavokinase/ FAD-Synthetase RibCF (EC 2.7.1.26) phosphoryliert RF zu Riboflavin-5'-Phosphat (RP). Das Enzym RosB (EC 2.6.1.114) katalysiert die Bildung von 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat (AFP) und 2-Oxoglutarat (2-OG) aus RP über 8-Demethyl-8-Formyl-Riboflavin-5'-Phosphat (OHC-RP) und 8-Demethyl-8-Carboxyl-Riboflavin-5'-Phosphat (HOOC-RP) in Anwesenheit von Sauerstoff, Thiamin und Glutamat. Eine bislang unbekannte Phosphatase spaltet die Phosphatgruppe von AFP und produziert 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin (AF). Das Enzym S-Adenosylmethionin (SAM)-abhängige Enzym RosA (EC 2.1.1.343) produziert abschließend RoF und S-Adenosylhomocystein (AHC) über 8-Demethyl-8-Methylamino-Riboflavin (MAF).

Das Reaktionsprodukt AFP von RosB wird nicht von dem RoF-produzierenden Enzym RosA akzeptiert (Jankowitsch *et al.*, 2011). Aus diesem Grund stellt die Dephosphorylierung von AFP von AF eine sehr wichtige Reaktion der RoF-Biosynthese dar. Bislang ist keine derartige Phosphatase in *S. davaonensis* oder dem RoF-Produzenten *S. cinnabarinus* bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die fehlende Phosphatase des RoF-Stoffwechsels von *S. davaonensis* zu identifizieren und zu charakterisieren.

2.3 Eigenschaften und Biosynthese des Vitamins Riboflavin

Das wasserlösliche, hellgelbe Pigment Riboflavin (7,8-Dimethyl-10-Ribityl-Isoalloxazin), auch bekannt als Lactoflavin, oder Vitamin B₂, wurde im Molkenüberstand präzipitierter Kuhmilch entdeckt (Blyth, 1879). Die Synthese von RF wurde fast zeitgleich von Kuhn und Rudy (1935) und Karrer *et al.* (1935) erfolgreich durchgeführt. Anstelle der Bezeichnungen Lactoflavin, Lactochrom und Ovoflavin, die auf den Isolationsursprung hinwiesen, wurde der Name zu Riboflavin geändert. Die Ribityl-Seitenkette ist nun die namensgebende Einheit (Kuhn & Rudy, 1935; Karrer *et al.*, 1935). Aktive Cofaktoren von RF sind RP und FAD. Ihre Bedeutung und ihre Verbindung zu Flavoproteinen wurden durch Präzipitation von gelben Flavoproteinlösungen entdeckt. Weder der gelbe Flavin-Überstand, noch das weiße Protein-Präzipitat besaßen Enzymaktivität. Da RF in diesen Versuchen die Enzymaktivität nicht wiederherstellen konnte, musste es sich bei der aktiven Form um eine modifizierte Form von RF handeln (Massey, 2000).

RP und FAD spielen als Cofaktoren im Metabolismus von Zellen, durch die Katalyse von Ein- oder Zweielektronenübertragungen, eine wesentliche Rolle. Sie katalysieren unter anderem die Oxidation von α -Hydroxysäuren und α -Aminosäuren, wie D-Aminoacid-Dehydrogenase, oder sind Bestandteile von sogenannten Multi-Redoxzentren, wie Succinat-Dehydrogenase oder NADH-Dehydrogenase (Massey, 2000; Mattevi *et al.*, 1996).

Pflanzen und Mikroorganismen sind in der Lage RF zu synthetisieren. Tiere und Menschen hingegen müssen RF über ihre Ernährung aufnehmen (Massey, 2000). Die empfohlene Zufuhr für Erwachsene beträgt 1,0 – 1,4 mg RF pro Tag. Quellen für RF sind unter anderem Milch, Ei und Vollkornprodukte (Strohm *et al.*, 2016; Powers, 2003).

Die biotechnologische Herstellung von RF ist im Übersichtsartikel von Schwechheimer *et al.* (2016) ausführlich zusammengefasst. RF wird hauptsächlich als Supplement in der Futtermittelindustrie (circa 70 % des heutigen Marktes) aber auch in der Lebensmittelindustrie oder als Nahrungsergänzungsmittel verwendet. Die Produktion von RF verlagerte sich von der chemischen Synthese, ausgehend von D-Glucose oder D-Ribose, zur fermentativen Gewinnung mithilfe unterschiedlicher industrieller Produktionsstämme. Während im Jahr 1990 lediglich 5 % der RF-Mengen mikrobiell produziert wurden (circa 1600 Tonnen pro Jahr), wird RF heutzutage (wahrscheinlich) ausschließlich durch Fermentation hergestellt (circa 9000 Tonnen pro Jahr) (Schwechheimer *et al.*, 2016). Die Mikroorganismen *B. subtilis* und *Ashbya gossypii* wurden hinsichtlich der Ausgangsprodukte der RF-Biosynthese GTP und Ribulose-5'-Phosphat optimiert (Schwechheimer *et al.*, 2016; Perkins *et al.*, 1999).

Die RF-Biosynthese ist in vielen Organismen ausführlich erforscht (Abbildung 3) und unterscheidet sich zwischen Eubakterien, Pflanzen und Pilzen nur geringfügig. Die aktuelle

Nomenklatur der Riboflavin-Enzyme in *S. davaonensis* wurde kürzlich von Kissling *et al.* (2020), in Anlehnung an Fischer und Bacher (2005), zusammengefasst.

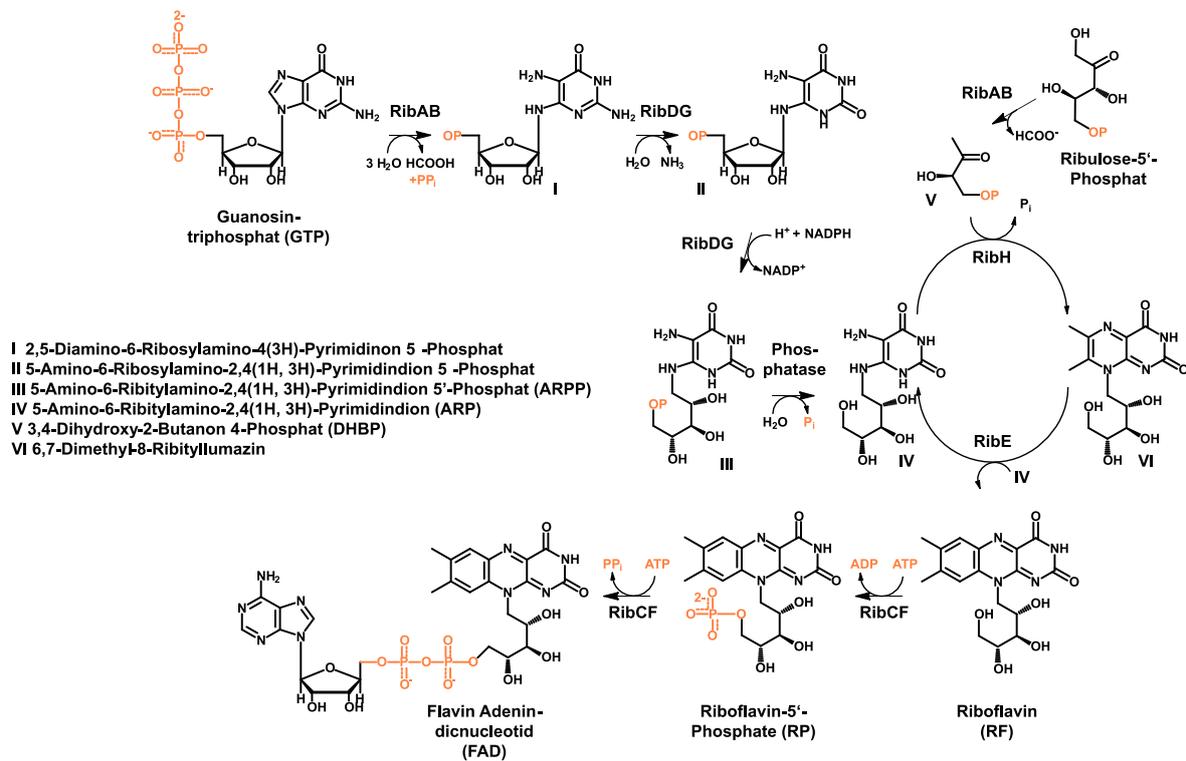


Abbildung 3. Biosynthese von Riboflavin (RF) und der Flavin-Cofaktoren Riboflavin-5'-Phosphat (RP) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) in *S. davaonensis* (Kissling *et al.*, 2020; Fischer & Bacher, 2005). Ausgehend von Guanosintriphosphat (GTP) sind 7 Enzyme für die Biosynthese von RF, RP und FAD notwendig. Als bifunktionelle GTP Cyclohydrolase II/ 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat Synthase katalysiert RibAB (EC 3.5.4.25/ EC 4.1.99.12) die Ringöffnung von GTP zu 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidinon-5'-Phosphat (I) und die Synthese von 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat (V) aus Ribulose-5'-Phosphat. Das bifunktionelle Enzym 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidinon-5'-Phosphat Deaminase (EC 3.5.4.26) und 5-Amino-6-Ribosylamino-2,4(1H,3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat Reduktase (EC 1.1.1.193; RibDG) katalysiert die beiden Schritte zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H, 3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP, III). Der Phosphatrest wird von einer bislang unbekanntem Phosphatase entfernt und 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H, 3H)-Pyrimidindion (IV) wird gebildet. Das Enzym Lumazin-Synthase (RibH, EC 2.5.1.78) katalysiert die Bildung von 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin aus den Substraten IV und V. Abschließend wird die Reaktion aus zwei Molekülen VI zu einem Molekül RF und einem Molekül IV durch das Enzym Riboflavin-Synthase (RibE, EC 2.5.1.9) katalysiert. Verbindung IV kann wieder in die RF-Biosynthese eingespeist werden. Das bifunktionelle Enzym RibCF Flavin-Kinase (EC 2.7.1.26) und FAD-Synthetase (EC 2.7.7.2) katalysiert die Synthese der Flavin-Cofaktoren RP und FAD.

Der erste Schritt der RF-Biosynthese ist die Öffnung des Imidazolringes von GTP durch eine bifunktionelle GTP Cyclohydrolase II/ 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat Synthase (RibAB, EC 3.5.4.25/ EC 4.1.99.12) (Richter *et al.*, 1993). Eine Deaminierung und anschließende Seitenkettenreduktion des RibAB-Produkts 2,5-Diamino-6-Ribosylamino-4(3H)-Pyrimidinon-5'-Phosphat (I) zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1H, 3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP, III) über 5-Amino-6-Ribosylamino-2,4(1H, 3H)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (II) wird durch das bifunktionelle Enzym RibDG (EC 3.5.4.26/ EC 1.1.1.193) katalysiert (Burrows & Brown, 1978). Dieses Enzym besitzt eine Deaminasedomäne am N-Terminus sowie eine Reduktasedomäne

am C-Terminus des Enzyms (Richter *et al.*, 1997). Die Ähnlichkeit zwischen Deaminase-Reduktase-Reaktionen von Pflanzen und Eubakterien ist größer verglichen mit der Reaktion in Pilzen (Fischer *et al.*, 2004). In Hefen wird zuerst eine Reduktions-Reaktion und anschließende eine Deaminierungsreaktion durchgeführt. Außerdem wurden in Pilzen monofunktionelle Reduktasen und Deaminasen entdeckt (Fischer *et al.*, 2004; Hollander & Brown, 1979).

Der Phosphatrest des Intermediates ARPP (III) wird im Anschluss an die Deaminase-Reduktase-Reaktion durch eine Phosphatase abgespalten, welche in vielen Organismen noch unbekannt ist. In *E. coli* und *B. subtilis* konnten einige Mitglieder der Haloacid-Dehalogenase (HAD) Familie identifiziert werden, welche die Dephosphorylierung von ARPP katalysieren (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015). Das zweite Substrat der RF-Biosynthese ist 3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat (DHBP, V), welches von RibAB aus Ribulose-5'-Phosphat produziert wird (Neuberger & Bacher, 1985; Volk & Bacher, 1990; Volk & Bacher, 1991). Das Produkt der Dephosphorylierungsreaktion ist 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion (ARP, IV) und wird durch eine Kondensationsreaktion mit DHBP zu 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (VI) metabolisiert, durch das Enzym Lumazin-Synthase (Neuberger & Bacher, 1986; Mörtl *et al.*, 1996). Das Enzym Riboflavin-Synthase (RibE, EC 2.5.1.9) katalysiert den finalen Schritt der RF-Synthese (Bacher *et al.*, 1983). In einer Dismutase-Reaktion reagieren zwei Moleküle 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (VI) zu jeweils einem Molekül RF und einem Molekül IV, welches wieder in die RF-Synthese eingespeist wird (Wacker *et al.*, 1964; Plaut, 1960; Neuberger & Bacher, 1986). Die Bildung der Cofaktoren RP und FAD erfolgt durch Riboflavin-Kinasen und FAD-Synthetasen (Katagiri *et al.*, 1959; Kearney & Englard, 1951; Bacher, 1991) In vielen Mikroorganismen, wie *S. davaonensis* oder *B. subtilis*, kommen bifunktionelle Flavin-Kinasen (EC 2.7.1.26) und FAD-Synthetasen (EC 2.7.7.2) vor (Grill *et al.*, 2008; Mack *et al.*, 1998). Einige RF-Biosynthesegene sind in Gengruppen (sog. Gen-Cluster) organisiert, beispielsweise das *ribE1MAB5H* Cluster vieler Streptomyceten oder das *rib*-Operon von *B. subtilis* (Grill *et al.*, 2007; Perkins *et al.*, 1999; Kil *et al.*, 1992). Die *rib*-Cluster sind typischerweise durch einen Promoter Prib (Kil *et al.*, 1992) sowie, abhängig vom Organismus, durch einen RP-Riboswitch reguliert (Pedrolli *et al.*, 2012; Gelfand *et al.*, 1999). Nach der Sequenzierung des Genoms von *S. davaonensis* wurden mehrere Kopien einzelner RF-Biosynthesegene identifiziert (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Die tatsächliche Expression der Gene und ihre Bedeutung für den RoF-Produzenten *S. davaonensis* ist Gegenstand weiterer Untersuchungen der AG Mack (Kissling *et al.*, 2020).

2.4 Phosphatasen

Die Phosphatgruppe ist die am häufigsten vorkommende funktionelle Gruppe im Metabolom von Bakterien (Nobeli *et al.*, 2003). Phosphatasen spielen deshalb eine zentrale Rolle in vielen Biosynthesewegen von Vitaminen und Antibiotika, beispielsweise RF, RoF oder Thiaminpyrophosphat (Hasnain *et al.*, 2016; Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015). Eine wichtige Rolle spielen die sogenannten Haloacid-Dehalogenase (HAD) Enzyme und Histidin-Phosphatasen.

Mitglieder der HAD-Familie besitzen unter anderem Phosphatase- aber auch β -Phosphoglucomutase-, Phosphonatase- und Dehalogenase-Aktivitäten mit hohen katalytischen Effizienzen und hoher Affinität (Koonin & Tatusov, 1994). HAD-Enzyme akzeptieren eine Vielzahl an phosphorylierten Metaboliten (Kuznetsova *et al.*, 2006) und besitzen drei konservierte Sekundärmotive mit konservierten Asparaginsäure- und Lysinresten, sowie einem weiteren Nukleophil (Asparaginsäure oder Serin). Bis auf diese konservierten Motive weisen Mitglieder dieser Familie nur geringe Ähnlichkeiten von 15 bis 30 % zueinander auf (Koonin & Tatusov, 1994; Kuznetsova *et al.*, 2006). Im RF-Biosyntheseweg von *E. coli*, *B. subtilis* und *Arabidopsis thaliana* wurden HAD-Enzyme identifiziert, welche die bislang unbekannte Dephosphorylierungsreaktion von 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP) katalysieren können (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015; Sa *et al.*, 2016). Wie für HAD-Enzyme bekannt, sind diese Enzyme teilweise in der Lage andere Verbindungen zu hydrolysieren, unter anderem den Cofaktor RP oder den RF-Vorläufer GTP. Für die Dephosphorylierung von RP wurden zum Teil höhere Reaktionsraten ermittelt, verglichen mit der Reaktion von ARPP (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015).

Eine weitere bedeutende Gruppe der Phosphatasen ist die Histidin-Phosphatase Familie. Berühmte Enzyme und ihre Bedeutungen für die Familie sind in der Übersichtsarbeit von Rigden (2008) ausführlich aufgeführt. Bei der Histidin-Phosphatase Familie handelt es sich um eine große Gruppe von Proteinen, deren Aktivität auf der Phosphorylierung und anschließender Dephosphorylierung eines Histidinrestes basiert. Der Transfer der Phosphatgruppe wird durch weitere Aminosäuren in der Phosphattasche, hauptsächlich hochkonservierte Histidin- und Argininreste, begünstigt. Zusätzlich dazu gehört zu der Phosphattasche ein Protonendonator, bestehend aus einem Asparaginsäure- oder Glutaminsäurerest, der enzymspezifisch variieren kann (Rigden, 2008). Eine automatische Annotation von Mitgliedern der Histidin-Phosphatase Familie ist schwierig, da nur geringfügige Ähnlichkeiten zu bereits charakterisierten Phosphatasen auftreten können. Ebenso können wenige Aussagen zu Aminosäureresten in der Substratbindetasche getroffen werden. Während Familienmitglieder der Histidin-Phosphatase-Familie hochkonservierte Bereiche in der Phosphattasche aufweisen, variieren Protonendonatoren und Substratbindestellen beträchtlich (Rigden, 2008).

2.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Biosynthese des Antibiotikums RoF, ausgehend von RF, ist bis auf einen Schritt aufgeklärt. Bislang ist kein Enzym bekannt, das die Dephosphorylierung des wichtigen RoF-Intermediates AFP zu AF in den RoF-Produzenten *S. davaonensis* oder *S. cinnabarinus* katalysieren kann.

Ziel dieser Doktorarbeit war es, die fehlende Phosphatase im RoF-Biosyntheseweg im RoF-Produzenten *S. davaonensis* zu identifizieren. Der Modelorganismus für Streptomycceten *S. coelicolor* wurde als Kontrolle genutzt, da er kein RoF und kein weiteres Flavin-Analogon produziert. Hierfür wurde ein spezieller, für die Genexpression heterologer Gencluster angepasster, *S. coelicolor* M1152 Stamm verwendet (Gomez-Escribano & Bibb, 2011). Vorangegangene Arbeiten zum RoF-Stoffwechsel zeigten, dass ein 106 kb genomisches Fragment von *S. davaonensis* (pESAC13-SD106kb, Abbildung 4) vermutlich alle Gene für die RoF-Biosynthese enthält (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Im Anschluss an die Identifikation und Lokalisation des ersten RoF-Biosynthesegens *rosA*, wurde das zweite RoF-Biosynthesegen *rosB* (BN159_7989) auf diesem Fragment identifiziert (Schwarz *et al.*, 2016). Wenn es eine spezifische Phosphatase für die Dephosphorylierung von AFP im RoF-Biosyntheseweg gibt, sollte das entsprechende Gen auch auf diesem Fragment liegen (Abbildung 4).

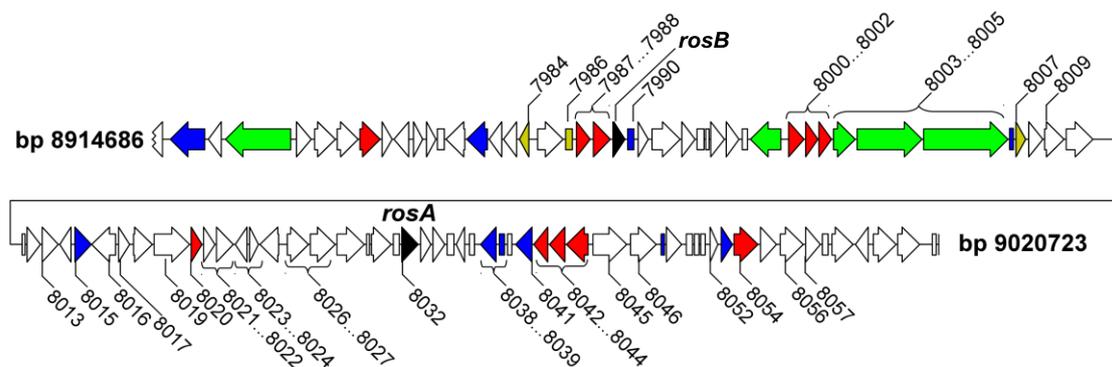


Abbildung 4. Ein 106 kb-Fragment aus *S. davaonensis*, auf dem sich alle Gene für die Roseoflavin-Biosynthese befinden (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Auf dem Fragment (von Nukleotid 8914686 bis Nukleotid 8020723) befinden sich, neben *rosB* und *rosA* (schwarz), mögliche Gene für den Transport (rot), Gene für nicht-ribosomale Peptid-Synthetasen (grün), regulatorische Gene (blau) und Riboflavin-Biosynthesegene (gelb). Für alle nicht-hervorgehobenen Gene konnte keine Voraussage getroffen werden.

Der entscheidende Weg zur Identifizierung der, für den RoF-Biosyntheseweg spezifischen, AFP-Phosphatase war der Aufbau eines geeigneten Enzymtests. Nach der sukzessiven Identifizierung des Phosphatasegens in *S. davaonensis* sollte sein Genprodukt biochemisch charakterisiert werden. Die Bestimmung kinetischer Parameter V_{max} und K_M erlaubten einen erstmaligen Vergleich aller Enzyme, die in der RoF-Biosynthese eine Rolle spielen.

3 Material

3.1 Laborgeräte

Verwendete Laborgeräte sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1. Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller.

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	VARIOKLAV 175 S Dampfsterilisator	HP Medizintechnik GmbH, Oberschleißheim
Dokumentation von Gelbildern	GelDoc XR	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Elektroporationsgerät	Gene Pulser II	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
FPLC-System	Äkta Purifier P-900 mit Fraktionierer Frac-920	GE Healthcare GmbH, Solingen
Gelelektrophoresekammer (horizontal)	Mini-Sub Cell GT oder Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Gelelektrophoresekammer (vertikal)	Mini-PROTEAN Tetra Vertical Electrophoresis Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
HPLC-System	1260 Infinity System mit 1260 Infinity Diode Array Detector (DAD) und 1260 Infinity Fluoreszenz-Detektor (FLD)	Agilent Technologies, Waldbronn
Inkubationsschüttler	Certomat IS	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG, Göttingen
Probenaufgabe	50 ml Superloop	GE Healthcare GmbH, Solingen
Spannungsquellen für Gelelektrophorese	Power Pac 200, Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Spektralphotometer	Ultrospec 3100 <i>pro</i>	Amersham Biosciences, Freiburg
Spektralphotometer	Nanovue Photometer	GE Healthcare GmbH, Solingen
Thermocycler	C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Tischzentrifuge	Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
Ultrazentrifuge	Avanti J-30 I	Beckmann Coulter, Krefeld

Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q Gradient	Millipore GmbH, Schwalbach
Zellaufschluss	FastPrep-24 5G Instrument	MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA
Zellaufschluss	French Press System	Constant Systems Limited, Northants, UK
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

3.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Roseoflavin wurde von Biomol GmbH (Hamburg) bezogen. 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin war ein Geschenk von P. Macheroux (Technische Universität Graz, Österreich). 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat wurde aus 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin, dem Enzym humane Flavokinase (EC 2.7.1.26) und ATP hergestellt (Pedrolli *et al.*, 2011). Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle weiteren Chemikalien und Reagenzien von folgenden Herstellern bezogen:

- AppliChem GmbH, Darmstadt
- Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
- IBA Lifesciences, Göttingen
- Merck KGaA, Darmstadt
- Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- VWR International GmbH, Darmstadt

Verwendete Komplettsysteme und deren Hersteller sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2. Verwendete Komplettsysteme und deren Hersteller.

Komplettsysteme (Kits)	Hersteller
Biomol Green Phosphate Detection Kit	Enzo Lifesciences, Lörrach
CopyControl Fosmid Library Production Kit	Epicentre, Madison, Wisconsin
Faktor Xa Cleavage Capture Kit	Merck KGaA, Darmstadt
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneJET Genomic DNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneJET Miniprep Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Quikchange Lightning Site-directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies, Waldbronn

Alle Restriktionsenzyme wurden als FastDigest Variante bezogen und sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3. Verwendete Enzyme und deren Hersteller.

Enzym	Hersteller
Alkalische Phosphatase FastAP	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
DreamTaq DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastDigest <i>Bam</i> HI	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastDigest <i>Eco</i> RI	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastDigest <i>Esp</i> 3I	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastDigest <i>Hind</i> III	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
FastDigest <i>Xba</i> I	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Phusion Hot Start DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
T4 Ligase	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Verwendete Marker, Probenpuffer und weitere Komponenten zur Durchführung molekularbiologischer und biochemischer Experimente sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4. Verwendete Marker, Probenpuffer und weitere Komponenten zur Durchführung molekularbiologischer und biochemischer Experimente und deren Hersteller.

Komponenten	Hersteller
6x Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
6x SDS Probenpuffer	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Any kD Mini-PROTEAN TGX Gel (10 Wells, 30 µl pro Well)	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
cOmplete EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Merck KGaA, Darmstadt
dNTP-Mix (10 mM)	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageBlue Protein Staining Solution	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
Vivaspin 6 (MWCO 3 kDa) und Vivaspin 20 (MWCO 10 kDa)	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden alle weiteren Verbrauchsmaterialien von folgenden Herstellern bezogen:

- Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
- Chromatographie Handel Müller, Fridolfing
- Sarstedt, Nümbrecht
- Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
- VWR International GmbH, Darmstadt

Verwendete Chromatographiesäulen und deren Hersteller sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5. Verwendete Chromatographiesäulen und deren Hersteller.

Prinzip	Material	Hersteller
Anionenaustausch	Fractogel 1 ml TMAE (M)	Merck KGaA, Darmstadt
Größenausschluss	Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare GmbH, Solingen
Größenausschluss	HiPrep 26/10 Desalting	GE Healthcare GmbH, Solingen
Reverse Phase	Säule: Kinetex 2.6 µm Biphenyl 100 Å LC Column 150 x 2,1 mm Vorsäule: SecurityGuard UHPLC Biphenyl für 2,1 mm ID Säulen	Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg
Streptavidin-Affinität	Strep-Tactin Superflow 1 ml und 5 ml high capacity	IBA Lifesciences, Göttingen

3.3 Nährmedien, Lösungen und Puffer

Alle Nährmedien wurden vor Benutzung bei 121 °C und 2 bar autoklaviert oder mittels Filtration, unter Verwendung eines 0,2 µm Celluloseacetat Membranfilters, sterilisiert. Zur Herstellung von Nährböden wurde den Nährmedien vor Autoklavieren 1,5 – 2,0 % Agar-Agar zugefügt. Verwendete Nährmedien und deren Zusammensetzung sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6. Verwendete Nährmedien und deren Zusammensetzung zur Kultivierung von Mikroorganismen. Alle Nährmedien wurden vor Verwendung autoklaviert oder steril zusammengefügt.

Name	Zusammensetzung	Anweisungen/ Kommentare
<i>lysogeny broth</i> (LB)	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,0 ± 0,2	Fertigmedium von Carl Roth (Karlsruhe), 25 g auf 1 l Medium in H ₂ O dest. ansetzen, pH kontrollieren, autoklavieren.
<i>yeast starch</i> (YS)	10 g/l lösliche Kartoffelstärke 2 g/l Hefeextrakt pH 7,2	Lösliche Kartoffelstärke in H ₂ O dest. aufkochen, Hefeextrakt zufügen, pH nach Abkühlen auf 7,2 einstellen, autoklavieren.
Mannitol-Soja (MS)	20 g/l Sojamehl 20 g/l D-Mannitol pH 7,2	Komponenten mit Leitungswasser auffüllen, pH auf 7,2 einstellen, autoklavieren.
<i>2x yeast tryptone</i> (YT)	16 g/l Trypton 10 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl pH 7,0	Komponenten mit H ₂ O dest. auffüllen, pH auf 7,0 einstellen, autoklavieren.
<i>Phosphate amino acid glucose</i> -Medium	1x M9 Salze 1 mM MgSO ₄ 0,2x Spurenelementlösung 0,5 % Glucose 200 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren (außer Cystein und Tyrosin) pH 7,2	Komponenten steril unter Rühren mit sterilem dest. H ₂ O auffüllen.
<i>Phosphate amino acid selenomethionine</i> -Medium	1x M9 Salze 1 mM MgSO ₄ 0,2x Spurenelementlösung	Komponenten steril unter Rühren mit sterilem dest. H ₂ O auffüllen.

	0,05 % Glucose 0,5 % Glycerin 0,2 % Lactose 200 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren (außer Cystein, Tyrosin und Methionin) 10 µg/ml Methionin 125 µg/ml Selenomethionin pH 7,2	
--	--	--

Konzentrierte Lösungen für die Vorbereitung von Nährmedien sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7. Verwendete konzentrierte Lösungen zur Herstellung von Nährmedien.

Name	Zusammensetzung	Anweisungen/ Kommentare
10x M9 Salze	0,564 M Na ₂ HPO ₄ 0,294 M KH ₂ PO ₄ 85,5 mM NH ₄ Cl 93,5 mM NaCl pH 7,2	Salze in H ₂ O dest. unter Rühren lösen, pH einstellen, autoklavieren.
1000x Spurenelementelösung	50 mM FeCl ₃ * 6 H ₂ O 20 mM CaCl ₂ 10 mM MnCl ₂ * 4 H ₂ O 10 mM ZnSO ₄ * 7 H ₂ O 2 mM CoCl ₂ * 6 H ₂ O 2 mM CuCl ₂ * 2 H ₂ O 2 mM NiCl ₂ * 6 H ₂ O 2 mM Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O 2 mM Na ₂ SeO ₃ * 5 H ₂ O 2 mM H ₃ BO ₃	Salze in H ₂ O dest. vorsichtig unter Rühren lösen, sterilfiltrieren.

Verwendete Antibiotika und Selektionskonzentrationen sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8. Verwendete Antibiotika und deren Selektionskonzentrationen.

Name	Zusammensetzung	Selektionskonzentration	Anweisungen/ Kommentare
Ampicillin (Amp)	100 mg/ml	100 µg/ml (<i>E. coli</i>)	In dest. H ₂ O lösen, sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20 °C lagern.
Apramycin (Apra)	50 mg/ml	50 µg/ml (<i>E. coli</i> und Streptomyceten)	

Carbenicillin (Carb)	100 mg/ml	100 µg/ml (<i>E. coli</i>)	
Kanamycin (Kan)	50 mg/ml	50 µg/ml (<i>E. coli</i>)	
Chloramphenicol (Cml)	25 mg/ml	25 µg/ml (<i>E. coli</i>)	In 96 % Ethanol lösen, aliquotiert bei -20 °C lagern.
Nalidixinsäure (Ndx)	20 mg/ml	20 µg/ml (<i>E. coli</i>)	In 0,15 M NaOH lösen, sterilfiltrieren, aliquotiert bei -20 °C lagern.

Verwendete Chromatographiepuffer und ihre Zusammensetzung sind in Tabelle 9 aufgelistet. Alle Chromatographiepuffer wurden vor Verwendung durch einen 0,45 µm Cellulosenitratfilter filtriert und anschließend im Ultraschallbad entgast.

Tabelle 9. Verwendete Chromatographiepuffer und deren Zusammensetzung.

Name	Zusammensetzung	Anweisungen/ Kommentare
AEX-Puffer A	50 mM Tris-HCl 25 mM NaCl pH 7,6	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.
AEX-Puffer B	50 mM Tris-HCl 1 M NaCl pH 6,6	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.
HPLC-Puffer A (10 x)	100 mM Ameisensäure 100 mM Ammoniumformiat	In dest. H ₂ O lösen.
HPLC-Puffer A (1 x)	10 mM Ameisensäure 10 mM Ammoniumformiat pH 3,7	In dest. H ₂ O aus 10x Puffer verdünnen, pH überprüfen.
Puffer E	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Desthiobiotin pH 8,0	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.
Puffer R	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA (2-[4 -hydroxy- benzeneazo]benzoic acid) pH 8,0	Aus 10x konzentrierter Lösung (IBA Lifesciences) mit dest. H ₂ O verdünnen.

Puffer W pH 8,0	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 8,0	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.
Puffer W pH 10,5	100 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA pH 10,5	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.
TBS-Puffer	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl pH 7,6	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen.

Alle weiteren verwendeten Lösungen und Puffer sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10. Weitere verwendete Lösungen und Puffer.

Name	Zusammensetzung	Kommentar/ Anweisungen
Bis-Tris-Propan (BTP)- Puffer (10x)	1 M BTP 0,1 M CaCl ₂ pH 7,6	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, sterilfiltrieren.
Lösung 1	25 mM Tris-HCl 50 mM Glucose 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase pH 8,0	Für Präparation von Plasmid DNA mittels alkalischer Lyse. Salze in dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren. RNase frisch zugeben.
Lösung 2	0,2 M NaOH 1 % SDS	Frisch in dest. H ₂ O ansetzen.
Lösung 3	3 M Na-Acetat 2 M Essigsäure pH 5,2	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren.
Lysepuffer	6,7 % Saccharose 50 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 50 mg/ml Lysozym pH 8,0	Zur Isolation hochmolekularer chromosomaler DNA aus Streptomyceten. Salze in dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren, Lysozym frisch zugeben.

Lysepuffer für Gram-positive Bakterien	20 mM Tris-HCl 2 mM EDTA 1,2 % Triton X-100 50 mg/ml Lysozym pH 8,0	Für GeneJET Genomic DNA Purification Kit. In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, sterilfiltrieren, Lysozym frisch zugeben.
PBS (1x)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren.
RF1-Lösung	3,02 g RbCl 0,37 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O 37,5 ml Glycerin (100 %) 2,48 g MnCl * 4 H ₂ O 0,74 g Kaliumacetat	Auf 250 ml mit ddH ₂ O auffüllen, pH 5,8 mit Essigsäure einstellen.
RF2-Lösung	0,3 g RbCl 2,75 g CaCl ₂ * 2 H ₂ O 37,5 ml Glycerin (100 %) 0,53 g MOPS	Auf 250 ml mit ddH ₂ O auffüllen, pH 6,5 mit NaOH einstellen.
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-HCl 1 M Essigsäure 50 mM EDTA pH 8,5	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8,0	In dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, autoklavieren.
Tris DTT-Puffer (10x)	0,5 M Tris-HCl 0,3 M KCl 50 mM MgCl ₂ 10 mM DTT pH 8,0	Salze in dest. H ₂ O lösen, pH einstellen, sterilfiltrieren, DTT frisch zugeben.
Tris-Glycin-Puffer (10x)	0,25 M Tris-HCl 1,92 M Glycin 1 % (w/v) SDS	In dest. H ₂ O lösen.

3.4 Bakterienstämme und Oligonukleotide

Alle verwendeten Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften sind in Tabelle 11 aufgelistet.

Tabelle 11. Verwendete Bakterienstämme und ihre relevanten Eigenschaften.

Stamm	Relevante Eigenschaften	Quelle oder Referenz
<i>Streptomyces</i> Stämme		
<i>S. davaonensis</i>	Wildtyp Stamm, JCM 4913 ^T (Typstamm ^T)	Japan Collection of Microorganisms (JCM), Japan
<i>S. cinnabarinus</i>	Wildtyp Stamm, DSM 40467 ^T	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Deutschland
<i>S. coelicolor</i> M1152	$\Delta act \Delta red \Delta cpk \Delta cda rpoB[C1298T]$	(Gomez-Escribano & Bibb, 2011)
<i>S. coelicolor</i> M1152 pESAC13-SD106kb	<i>S. coelicolor</i> M1152 mit einem integrierten 106 kb <i>S. davaonensis</i> subchromosomalen Fragment, welches <i>rosA</i> und <i>rosB</i> enthält	(Jankowitsch & Schwarz <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. davaonensis</i> $\Delta clus_rosA$	<i>S. davaonensis</i> mit Gendelektionen in BN159_8026 bis BN159_8035; Austausch durch Apramycinkassette	(Schwarz <i>et al.</i> , 2016)
<i>S. davaonensis</i> $\Delta clus_rosB$	<i>S. davaonensis</i> mit Gendelektionen in BN159_7985 bis BN159_7990; Austausch durch Apramycinkassette	(Schwarz <i>et al.</i> , 2016)
<i>S. davaonensis</i> $\Delta BN159_8033$ 1 - 3	<i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Deletionsstämme	Diese Arbeit
<i>S. davaonensis</i> $\Delta BN159_8033$ pSET152_ermE <8033> 1 - 3	<i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Deletionsstämme mit dem Gen BN159_8033 in das Genom integriert, unter Kontrolle eines konstitutiven Erythromycin-Resistenz Promoters in pSET152	Diese Arbeit
<i>S. davaonensis</i> pSET152_ermE <8033>	<i>S. davaonensis</i> BN159_8033 Überexpressionsstamm, unter Kontrolle eines konstitutiven Erythromycin-Resistenz Promoters in pSET152	Diese Arbeit

<i>E. coli</i> Stämme		
DH5α	F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _k ⁻ , m _k ⁺) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ⁻</i>	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT</i> , <i>hsdSB</i> (r _B ⁻ , m _B ⁻), <i>dcm</i> , <i>gal</i> , λ(DE3)	Merck KGaA, Darmstadt
EPI 300	[F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) φ80 <i>dlacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK λ⁻ rpsL nupG trfA dhfr</i>	Epicentre Madison, Wisconsin, USA
BW25113	<i>lac</i> ^F <i>rrnB</i> _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514</i> Δ <i>araBAD</i> _{AH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{LD78}	(Datsenko & Wanner, 2000)
BT340	DH5α/ pCP20	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)
ET12567	<i>dam⁻, dcm⁻, hsdM⁻</i>	(MacNeil <i>et al.</i> , 1992)

Alle verwendeten Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12. Verwendete Plasmide und ihre relevanten Eigenschaften.

Plasmid	Relevante Eigenschaften	Quelle oder Referenz
pESAC13-SD106kb	<i>E. coli-Streptomyces</i> Artificial Chromosome Vektor mit einem 106 kb <i>S. davaonensis</i> genomischen Fragment um <i>rosA</i> und <i>rosB</i>	(Jankowitsch & Schwarz <i>et al.</i> , 2012)
pPSG_IBA3	Stargate Akzeptor Vektor für bakterielle Expression von Strep-Tag II Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	IBA Lifesciences, Göttingen
pPSG_IBA3< <i>rosC</i> _{opt} _N>	Gen BN159_8033 (<i>rosC</i>) von <i>S. davaonensis</i> codonoptimiert für <i>E. coli</i> und mit Nukleotiden für einen N-terminal Strep-Tag II gefolgt von einer Faktor Xa-Schnittstelle in pPSG-IBA3 Expressionsvektor	Diese Arbeit
pPSG_IBA3< <i>rosC</i> _{opt} _N> R33A	Austausch der Nukleotide für R33 (CGT) in Nukleotide für A33 (GCT) in pPSG_IBA3< <i>rosC</i> _{opt} _N>	Diese Arbeit
pPSG_IBA3< <i>rosC</i> _{opt} _N> H34A	Austausch der Nukleotide für H34 (CAC) in Nukleotide für A33 (GCC) in pPSG_IBA3< <i>rosC</i> _{opt} _N>	Diese Arbeit

pPSG_IBA3<rosC _{opt} _N> H82A	Austausch der Nukleotide für H82 (CAC) in Nukleotide für A82 (GCC) in pPSG_IBA3<rosCopt_N>	Diese Arbeit
pPSG_IBA3<rosC _{opt} _N> R83A	Austausch der Nukleotide für R83 (CGT) in Nukleotide für A83 (GCT) in pPSG_IBA3<rosCopt_N>	Diese Arbeit
pPSG_IBA3<rosC _{opt} _N> H165A	Austausch der Nukleotide für H165 (CAC) in Nukleotide für A165 (GCC) in pPSG_IBA3<rosCopt_N>	Diese Arbeit
pPSG_IBA3<rosC _{opt} _N> D166A	Austausch der Nukleotide für D166 (GAC) in Nukleotide für A33 (GCC) in pPSG_IBA3<rosCopt_N>	Diese Arbeit
pIJ773	P1-FRT-oriT-aac(3)IV-FRT-P2	(Gust <i>et al.</i> , 2003)
pKD46	λ -RED (<i>gam</i> , <i>bet</i> , <i>exo</i>), <i>bla</i> , <i>araC</i> , <i>rep101^{ts}</i>	(Datsenko & Wanner, 2000)
pCC1FOS	CopyControl pCC1FOS Fosmid Vector	Epicentre Madison, Wisconsin, USA
pCC1FOS_8033	pCC1FOS Vektor mit 40 kb <i>S. davaonensis</i> Fragment um BN159_8033	Diese Arbeit
pCC1FOS_8033 Δ 8033::Apra_oriT	Austausch von BN159_8033 durch eine Apramycinresistenzkassette in pCC1FOS_8033	Diese Arbeit
pCC1FOS_8033 Δ 8033	<i>In frame</i> Deletion von BN159_8033 in pCC1FOS_8033 Vektor	Diese Arbeit
pCC1FOS _{Apra} _8033 Δ 8033	pCC1FOS_8033 Δ 8033 Vektor mit Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 anstelle des Chroloamphenicolresistenzgens	Diese Arbeit
pUB307	Helferplasmid für Konjugationen in Streptomyceten	(Flett <i>et al.</i> , 1997)
pR9406	Helferplasmid für Konjugationen in Streptomyceten	(Flett <i>et al.</i> , 1997)
pSET152_ermE	Integrativer pSET152 Vektor, der einen konstitutiven Erythromycin-Resistenz-Promoter enthält	(Keravala & Calos, 2008)
pSET152_ermE <8033>	BN159_8033 von <i>S. davaonensis</i> unter Kontrolle eines konstitutiven Erythromycin-Resistenz-Promoter in pSET152	Diese Arbeit
pCP20	FLP-Rekombinationsplasmid: <i>flp</i> , <i>bla</i> , <i>cat</i> , <i>rep101^{ts}</i>	(Cherepanov & Wackernagel, 1995)

Verwendete Oligonukleotide sind in Tabelle 13 aufgelistet. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und mutagenisierte Bereiche sind unterstrichen.

Tabelle 13. Verwendete Oligonukleotide, deren Sequenzen und Funktionen. Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme und mutagenisierte Bereiche sind unterstrichen.

Oligonukleotid	Sequenz von 5'nach 3'	Funktion
rosCopt_StrepN_Esp3I_fw	AGCG <u>CGTCTC</u> CAATGTGGAGCC ACCCGCAGTTCG	Klonierung von N-terminal Strep-getaggttem <i>rosC</i> _{opt} (BN159_8033) in pPSG_IBA3 über <i>Esp3I</i>
rosCopt_StrepN_Esp3I_rev	AGCG <u>CGTCTC</u> CCTCCCTTAGATAA CGTCAGACGGAGCAGC	
PSG_seq_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenzierprimer für pPSG_IBA3
PSG_seq_rev	TAGTTATTGCTCAGCGGTGG	
c2816g_g2817c_fw	TCTGAAGTTTGGCTGATCG <u>CTCA</u> CGCTGACTCTTACAC	Mutagenese R33A in RosC ^{StrepN}
c2816g_g2817c_rev	GTGTAAGAGTCAGCGTGAG <u>CGA</u> TCAGCCAAACTTCAGA	
c2819g_a2820c_fw	CTGAAGTTTGGCTGATCCGT <u>GC</u> CGCTGACTCTTACAC	Mutagenese H34A in RosC ^{StrepN}
c2819g_a2820c_rev	GTGTAAGAGTCAGCG <u>G</u> CACGGA TCAGCCAAACTTCAG	
c2963g_a2964c_fw	GTTTGGGCTTCTGGTGCT <u>GCCC</u> GTGCTCAGC	Mutagenese H82A in RosC ^{StrepN}
c2963g_a2964c_rev	GCTGAGCACGG <u>G</u> CAGCACCAGA AGCCCAAAC	
c247g_g248c_fw	CGGTCTGCTGAGCAG <u>CGTGAGC</u> ACCAGAAG	Mutagenese R83A in RosC ^{StrepN}
c247g_g248c_rev	CTTCTGGTGCTCAC <u>G</u> CTGCTCA GCAGACCG	
c3212g_a3213c_fw	CGTGTTGCTGTTGTTGGT <u>GCCG</u> ACTCTGCTCTGGTT	Mutagenese H165A in RosC ^{StrepN}
c3212g_a3213c_rev	AACCAGAGCAGAGTCGG <u>CACCA</u> ACAACAGCAACACG	
a3216c_fw	GCTGTTGTTGGTCACG <u>C</u> CTCTG CTCTGGTTATC	Mutagenese D166A in RosC ^{StrepN}
a3216c_rev	GATAACCAGAGCAGAG <u>G</u> CGTGA CCAACAACAGC	
8033_Mitte_fw	CCCACAAGTTCCTCGCCTCACA	Identifikation des <i>rosC</i> Fosmides pCC1FOS_8033
8033_Mitte_rev	CTGGCGTGGGGACTTGATGTT	

8033_fw	CCGGTGAACCGCTGAAGCACGG ATACGGAGAACGTGGTGATTCC GGGGATCCGTCGACC	Amplifizierung eines 1382 bp Fragmentes von pIJ773 mit 39 bp Überhang um <i>rosC</i>
8033_rev	ATGCGCTGTTCTCGCTGCTCAT CGGCGCCTCGCCCTCATGTAGG CTGGAGCTGCTTC	
oriT_aac F	CAGGCGTTTAAGGGCACCAATA ACTGCCTTAAAAAATTAGAAGT TCCC GCCAGCCTCGC	Amplifizierung eines 1382 bp Fragmentes von pIJ773 mit 39 bp Überhang um das Chloramphenicol- resistenzgen im Fosmid pCC1FOS_8033 Δ8033
oriT_aac R	TGAGTTATCGAGATTTTCAGGAG CTAAGGAAGCTAAAATGGGAATA GGA ACTTATGAGC	
rosC_BamHI_fw	ATATATGGATCCGTGAGTGACG GACGCGAGAG	Klonierung von <i>rosC</i> in pSET152_ermE über <i>XbaI</i> und <i>BamHI</i>
rosC_XbaI_rev	ATATATTCTAGATCAGATCACGT CGGACGGG	
attB_fw	CGGGTGCCAGGGCGTGC	Bestätigung der Integration des Vektors pSET152 in das <i>Streptomyces</i> Genom
integrase_rev	CGCGTGATCTCCTTCGTCTCC	
M13_fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Bestätigung der Aufnahme des Plasmides pMA-RQ in <i>E. coli</i>
M13_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	
oriT (pSET)_seq_R	CCTGCTTCGGGGTCATTATAGC G	Bestätigung des Austausches des Chloramphenicolre- sistenzgens gegen ein Apramycinresistenzgen und oriT für Streptomyceten
oriTneo_seq_F	GAATCGGCCAACGCGAACCC	

3.5 Programme und Datenbanken

Verwendete Programme und Datenbanken sind in Tabelle 14 aufgelistet.

Tabelle 14. Verwendete Programme und Datenbanken.

Programm/ Datenbank	Anwendung	Referenz
BLASTn/ BLASTp	Vergleich von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (Altschul et al., 1990)
CLC Main Workbench 6.9.2	Plasmiddesign, Sequenzvergleiche	QIAGEN GmbH, Hilden
Isoelectric Point Calculator	Berechnung von Protein-Kenngrößen	http://isoelectric.org/index.html (Kozlowski, 2016).
Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome	Informationen über Gene und Proteine	https://www.genome.jp/kegg/
Quantity One 1S Analysis Software	Auswertung von Bildern der Agarosegelelektrophorese	Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen
QuikChange Primer Designprogramm	Entwurf von Primern zur Durchführung der Mutageneseexperimente	https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp Agilent Technologies, Waldbronn
UniProt	Bioinformatische Datenbank mit Informationen über die Proteinfunktion und -struktur	https://www.uniprot.org/ (The Uniprot Consortium, 2018)
Origin Pro2015G	Erstellung und Überlagerung von Graphen, Enzymkinetik	ADDITIVE Soft- und Hardware für Technik und Wissenschaft GmbH, Friedrichsdorf
InterPro	Klassifizierung und funktionelle Analyse von Proteinen	http://www.ebi.ac.uk/interpro/ (Finn et al., 2016; Mitchell et al., 2018)

4 Methoden

4.1 Mikrobiologische Methoden

4.1.1 Kultivierung und Konservierung von Mikroorganismen

In dieser Arbeit wurden die Mikroorganismen *Escherichia coli* und verschiedene *Streptomyces* Spezies kultiviert.

4.1.1.1 Kultivierung von Mikroorganismen

E. coli Kulturen wurden bei 30 – 37 °C in *lysogeny broth* (LB) bei 200 rpm oxisch in Erlenmeyerkolben mit Schikanen kultiviert. Zur Inokulation der Kulturen wurden Übernachtskulturen (ÜNK) oder Einzelkolonien von LB-Agarplatten verwendet.

Streptomyceten wurden in 100 ml hefe- und stärkehaltigem Medium (*yeast starch*, YS) in einem 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30 °C und 180 rpm 7 Tage lang kultiviert. Bei Kultivierung in YS-Medium wurde auf Antibiotikazugabe verzichtet. Zur Inokulation wurden 10^6 – 10^8 Sporen/ml Kultur verwendet. Für die Herstellung von Sporensuspensionen wurden Streptomyceten auf Agarplatten aus Mannitol und Soja (MS) kultiviert.

4.1.1.2 Konservierung von Mikroorganismen

Zur Konservierung von *E. coli*-Kulturen wurden 750 µl einer frischen LB-ÜNK mit 250 µl 60 % iger (v/v) Glycerinlösung gemischt und sofort bei -80 °C gelagert.

Streptomyceten wurden in Form von Sporensuspensionen konserviert. Diese sind wesentlich robuster im Hinblick auf wiederholtes Auftauen, im Vergleich zum Streptomyceten-Mycel. In 20 % Glycerin gelagert überleben Sporensuspensionen in der Regel einige Jahre (Kieser *et al.*, 2000). Um sporulierende Platten zu erhalten wurden 1 – 2 ml einer dicht bewachsenen Streptomyceten-Kultur auf MS-Agar ausplattiert und bei 30 °C inkubiert, bis ein dichter Sporenrasen zu sehen war. Zur Herstellung von Sporensuspensionen wurden 15 – 30 dicht sporulierte MS-Agarplatten verwendet. Pro Platte wurden 5 ml einer 0,1 % iger (v/v) Tween 20-Lösung verwendet und Sporen mit einem sterilen Zellschaber abgenommen. Nach 1 min starkem Vortexen zum Herauslösen der Sporen wurde das Gemisch in einem mit 1 – 2 ml Tween 20-Lösung angefeuchteten sterilen Wattefilter (30 ml Spritze mit 3 x 7 cm langen und sterilen Wattestreifen) filtriert und 15 min bei 8000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Sporenpellet in 0,5 – 1 ml 20 % iger (v/v) Glycerinlösung suspendiert. Die Suspension wurde in 50 µl Aliquote bei -80 °C gelagert. Der Sporentiter der Suspension wurde durch Ausplattieren serieller Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-9} auf MS-Agar bestimmt.

4.1.2 Zelldichtemessung von Bakterienkulturen

4.1.2.1 Bestimmung der optischen Dichte von *E. coli*-Kulturen

Die Zelldichte von *E. coli*-Kulturen wurden mit einem UV/Vis-Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 600 nm (= optische Dichte OD₆₀₀) gegen einen Blindwert gemessen (Trübungsmessung).

4.1.2.2 Bestimmung der Trockenmasse von Streptomycceten-Kulturen

Zur Bestimmung des Wachstums von Streptomycceten-Kulturen wurde eine Trockenmassebestimmung durchgeführt. In ein, über Nacht vorgetrocknetes, auf vier Nachkommastellen gewogenes, Glas-Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml einer Streptomycceten-Kultur überführt und bei 5000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, ohne Streptomycceten-Myccel zu verlieren. Restliche Stärke und andere Medienbestandteile wurden in einem Waschschrift mit sterilem ddH₂O entfernt. Das gewaschene Streptomycceten-Pellet wurde bei 100 °C über Nacht getrocknet. Nach dem Abkühlen wurden die Zentrifugenröhrchen mit Streptomycceten-Myccel auf vier Nachkommastellen ausgewogen. Die Trockenmasse (TM) entspricht der Differenz der Masse aus Zentrifugenröhrchen und Myccel und dem leeren Zentrifugenröhrchen.

4.1.3 Transfer von DNA in *E. coli* und Streptomycceten

4.1.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen

Für die Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen wurden zwei unterschiedliche Protokolle durchgeführt. Für DNA-Fragmente einer Größe ab 20 kb wurden *E. coli*-Zellen mittels Elektroporation transformiert. Standard-Transformationen chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen mit DNA-Fragmenten bis 20 kb wurden mittels Hitzeschock durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989).

Chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wurde nach der Rubidiumchlorid-Methode hergestellt (Green & Rogers, 2013). Verwendete Lösungen sind in Tabelle 10 In Kapitel 3.3 aufgelistet. Eine *E. coli*-Einzelkolonie wurde von LB-Agar gepickt und in 10 ml LB-Medium überführt. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 rpm für 16 h inkubiert. Diese Kultur diente zur Inokulation der Hauptkultur. 100 ml LB-Medium wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Nach einer Inkubation bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wurden die Zellen bei 5000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 10 ml RF1-Lösung suspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 4 ml RF2-Lösung suspendiert und weitere 15 min auf Eis gelagert. Aliquote von 50 µl wurden direkt für die Transformation eingesetzt oder bei -80 °C gelagert.

Elektrokompetente *E. coli*-Zellen wurden durch eine Behandlung mit eiskalter Glycerinlösung hergestellt (Sambrook *et al.*, 1989). Eine *E. coli*-ÜNK diente zur Inokulation von 50 ml LB-Medium auf eine OD₆₀₀ von 0,05. Nachdem die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,4 – 0,6 erreichte, wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet wurde zweimal in jeweils 15 ml eiskalter 10 % iger (v/v) Glycerinlösung gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet im letzten Tropfen Glycerinlösung suspendiert und direkt für die Transformation eingesetzt oder in 50 µl Aliquoten bei -80 °C gelagert.

4.1.3.2 Transformation von *E. coli*-Zellen

Für die Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurde ein Aliquot aus Kapitel 4.1.3.1 auf Eis mit ca. 100 ng Plasmid-DNA, Ligationsansatz oder PCR-Produkt gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 1 min wurde der Ansatz weitere 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden 500 µl LB-Medium zugefügt und bei 30 °C bzw. 37 °C für 1 h inkubiert. Der Transformationsansatz wurde zur Selektion auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum plattiert und über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert. Für die Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation wurde ein 50 µl Aliquot elektrokompetenter *E. coli*-Zellen auf Eis mit ca. 100 ng DNA gemischt. Die Elektroporation wurde in einer eiskalten Elektroporationsküvette bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV, bei einer erwarteten Zeitkonstante von 4,5 – 4,9 ms, durchgeführt. Zum Transformationsansatz wurde direkt im Anschluss 1 ml eiskaltes LB-Medium zugefügt und der Ansatz bei 200 rpm und 30 °C bzw. 37 °C für 1 h inkubiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion plattiert und über Nacht bei 30 °C bzw. 37 °C inkubiert.

4.1.3.3 Transfer von DNA in Streptomycceten mittels Konjugation

Ein Transfer von DNA in Streptomycceten wurde mittels Konjugation durchgeführt. Voraussetzungen für eine erfolgreiche Konjugation in Streptomycceten sind ein Transferursprung (*origin of transfer*, oriT) für Streptomycceten auf dem zu übertragenden DNA-Fragment. *S. davaonensis* und *S. coelicolor* besitzen ein methylierungssensitives Restriktionssystem (MacNeil, 1988). Dieses System wird durch Konjugation des DNA-Fragmentes über einen nicht-methylierenden *E. coli* ET12567 umgangen (MacNeil *et al.*, 1992). Elektrokompetente Zellen von ET12567 wurden nach Kapitel 4.1.3.1 hergestellt und mit 100 ng des zu übertragenden DNA-Fragmentes transformiert. Zur Übertragung von DNA in Streptomycceten wird zusätzlich ein Helferplasmid pUB307 (vermittelt eine Kanamycin (Kan) Resistenz) oder pR9406 (vermittelt eine Carbenicillin (Carb) Resistenz) benötigt, auf welchem die Transportgene kodiert sind.

Abhängig von den Antibiotikaresistenz-Genen, wurde für die Konjugation in Streptomyceten entweder eine biparentale oder eine triparentale Konjugation durchgeführt. Bei der biparentalen Konjugation enthält der nicht-methylierende *E. coli* ET12567 sowohl das zu übertragende DNA-Fragment als auch das Helferplasmid pUB307 bzw. pR9406. 5 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von *E. coli* ET12567 inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. 50 ml LB-Medium wurde mit dieser ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden bei 4000 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und zur Entfernung von Antibiotikaresten zweimal mit jeweils 10 ml LB-Medium gewaschen und anschließend in 500 µl LB-Medium suspendiert. Bei einer triparentalen Konjugation enthält ein *E. coli* ET12567 das zu übertragende DNA-Fragment und ein weiterer *E. coli* ET12567 das Helferplasmid pUB307 bzw. pR9406. Pro Stamm wurden 5 ml LB-Medium mit einer Kolonie von *E. coli* ET12567 inokuliert und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert. Jeweils 50 ml LB-Medium wurden mit den vorbereiteten ÜNK auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 kultiviert. Die Zellen wurden zur Entfernung von Antibiotikaresten mit LB-Medium gewaschen und die Zellpellets in jeweils 250 µl LB-Medium suspendiert. Die Suspensionen wurden vereinigt und zur Konjugation von Streptomyceten eingesetzt. Parallel zur Kultivierung von *E. coli* wurde pro Konjugationsansatz ein 50 µl Aliquot Streptomyceten-Sporen aus Kapitel 4.1.1.2 in 500 µl Medium aus 2x Hefe und Trypton (*yeast tryptone*, YT) suspendiert und 10 min bei 50 °C inkubiert. Die gekeimten Sporen wurden bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Die *E. coli* ET12567 Zellsuspension wurde mit 500 µl gekeimten Sporen gemischt und auf MS-Agar ohne Antibiotikum verteilt. Nach einer Inkubation von 16 h bei 30 °C wurden die Platten mit 0,5 mg Nalidixinsäure (Ndx) und 50 µg/ml Apramycin (Apra) zur Selektion überschichtet und weitere 3 – 4 Tage bei 30 °C inkubiert.

4.1.4 Überproduktion von Proteinen in *E. coli*

Das Expressionsplasmid pPSG_IBA3<rosC_{opt}_N> (Kapitel 4.2.6) enthält die starke bakteriophagen T7-Promotersequenz 5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3'. Zur Induktion der Genexpression wird eine T7-RNA-Polymerase-Quelle benötigt (Tabor & Richardson, 1985; Studier & Moffatt, 1986). *E. coli* BL21 (DE3) besitzt eine chromosomale Kopie der T7-Polymerase unter Kontrolle des lacUV5 Promoters. Dadurch ist das System durch Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induzierbar. Chemisch kompetente *E. coli* BL21 (DE3) Zellen wurden mit dem *rosC* Expressionsplasmid pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N> (Kapitel 4.2.6), wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben, transformiert.

Zur Expression von rekombinantem, N-terminal Strep-getagtem RosC (RosC^{StrepN}) wurde eine ÜNK in 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Amp) bei 30 °C und 200 rpm vorbereitet. Die Hauptkultur wurde in vier 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane mit jeweils 250 ml

LB-Medium mit 100 µg/ml Amp auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Genexpression wurde durch Zugabe von 0,1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 5 h aerober Inkubation wurde die Kultur in Zentrifugationsbechern bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in ddH₂O gewaschen und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert. Alternativ wurde eine Übernachtexpression durchgeführt. Die Hauptkultur wurde in vier 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane mit jeweils 250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Amp auf eine OD₆₀₀ von 0,05 inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm 14 h kultiviert. Die Kultur wurde in Zentrifugationsbechern bei 4000 rpm und 4 °C für 30 min zentrifugiert und der Überstand wurde dekantiert. Das Zellpellet wurde in ddH₂O gewaschen und bis zum Zellaufschluss bei -20 °C gelagert.

4.1.5 Selenomethionin-Markierung von Proteinen

Die Selenomethionin-Markierung von Proteinen wurde durch Verwendung eines Autoinduktionsmediums durchgeführt (Studier, 2005). Der Selenomethionin-Eintrag im Expressionswirt *E. coli* BL21 (DE3) ist vergleichbar mit dem methionin-auxotrophen *E. coli* B834 (DE3), wenn die endogene Methionin-Synthese vor der Induktion, durch Zugabe hoher Konzentrationen aller proteinogener Aminosäuren, unterdrückt wird. Gleichzeitig kann die Proteinausbeute in BL21 (DE3) höher sein als in B834 (DE3) (Studier, 2005).

Lösungen und Medien wurden für die Expression von *rosC* optimiert und die exakten Zusammensetzungen sind in Tabelle 6 in Kapitel 3.3 beschrieben. ÜNK von *E. coli* BL21 (DE3) pPSG-IBA Leerplasmid und BL21 (DE3) pPSG_IBA3 <*rosC*_{opt_N}> wurden in einem modifizierten nicht-induzierendem Medium *Phosphate amino acid glucose* (56,4 mM Na₂HPO₄; 29,4 mM KH₂PO₄; 8,55 mM NH₄Cl; 9,35 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,2 x Spurenelementlösung; 0,5 % Glucose; 200 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren außer Cytosin und Tyrosin; pH 7,2) bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Für die Selenomethionin-Markierung von RosC wurde das modifizierte Autoinduktionsmedium *Phosphate amino acid selenomethionine* (56,4 mM Na₂HPO₄; 29,4 mM KH₂PO₄; 8,55 mM NH₄Cl; 9,35 mM NaCl; 1 mM MgSO₄; 0,2 x Spurenelementelösung; 0,5 % Glycerin; 0,05 % Glucose; 0,2 % Lactose; 200 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren außer Cytosin, Methionin und Tyrosin; 10 µg/ml Methionin; 125 µg/ml Selenomethionin; 100 nm Vitamin B12) verwendet. Zur Plasmid Selektion wurden 100 µg/ml Amp eingesetzt. Zehn 1 l Erlenmeyerkolben mit Schikane mit jeweils 200 ml *Phosphate amino acid selenomethionine* Medium wurden auf eine OD₆₀₀ von 0,02 inokuliert und bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Der Wachstumsverlauf wurde 24 h lang durch OD₆₀₀-Messung überwacht. Anschließend wurden die Zellen bei 4000 rpm und 4 °C für 25 min zentrifugiert, mit ddH₂O gewaschen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Der Zellaufschluss und die darauffolgende Proteinreinigung wurden nach

Kapitel 4.3.1 und 4.3.4 durchgeführt. Um eine Oxidation der Selenomethionin-Reste zu vermeiden wurden allen verwendeten Puffern 2 mM Dithiothreitol (DTT) zugefügt.

4.2 Molekularbiologische Methoden

Die Konzentration und Qualität von DNA-Lösungen wurden stets im Nanovue Photometer (GE Healthcare GmbH) gemessen (siehe Kapitel 4.2.5). Bis zur weiteren Verwendung wurden alle DNA-Lösungen bei -20 °C gelagert.

4.2.1 Isolation von chromosomaler DNA aus Streptomycceten

Für die Isolation von chromosomaler DNA aus Streptomycceten wurden, je nach Verwendungszweck, zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Hochmolekulare DNA wurde nach einem modifizierten Protokoll der Kirby-Mix Methode isoliert (Kieser *et al.*, 2000). Chromosomale DNA, die als Matrize für eine PCR eingesetzt werden sollte, wurde mit dem GeneJET Genomic DNA Purification Kit isoliert.

4.2.1.1 Isolation hochmolekularer chromosomaler DNA aus Streptomycceten

Zur Herstellung einer Fosmid-Genbank (Kapitel 4.2.8.1) wurde hochmolekulare chromosomale DNA mit Fragmentgrößen über 40 kb aus *S. davaonensis* benötigt. Als Ausgangspunkt diente ein Zellpellet aus einer dicht bewachsenen 30 ml *S. davaonensis*-Kultur in YS-Medium (siehe Kultivierung von Streptomycceten in Kapitel 4.1.1). Das Pellet wurde in 5 ml Lysepuffer (6,7 % Saccharose; 50 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; 50 mg/ml Lysozym; pH 8,0) suspendiert und im Heizblock für 60 min bei 37 °C bei 300 rpm bis zum Eintritt der Zelllyse inkubiert. Nach der Zugabe von 1,2 ml 0,5 M EDTA-Lösung (pH 8,0) und 20 µl einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml) wurde der Ansatz für den Proteinabbau weitere 10 min bei 28 °C inkubiert. Im Anschluss wurde dem Ansatz 0,7 ml einer 10 % igen (w/v) SDS-Lösung zugefügt und für 1 – 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Reinigung der DNA-Lösung wurden 6 ml einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) zugefügt und das Extraktionsgemisch vorsichtig invertiert. Nach 5 min wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 6000 rpm und 4 °C für 15 min getrennt. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues 50 ml Falcon überführt. Zu der wässrigen Phase wurden 200 µl einer RNase A-Lösung (10 mg/ml) zugefügt und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Eine DNA-Präzipitation wurde durch Zugabe von NaCl auf eine finale Konzentration von 0,5 M und Zugabe eines Volumenanteils 100 % Isopropanol herbeigeführt. Der Ansatz wurde vorsichtig invertiert und die präzipitierte DNA bei 6000 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Zwei Waschschrirte mit 70 % Ethanol entfernten verbliebene Salze aus dem DNA Pellet und die DNA wurde in 500 µl ddH₂O aufgenommen. Zur Verbesserung der Reinheit wurde die DNA erneut mit NaCl und Isopropanol präzipitiert

und das DNA-Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) aufgenommen. Die Qualität der erhaltenen DNA wurde in einem 1 % Agarosegel abgeschätzt (siehe Agarosegelelektrophorese, Kapitel 4.2.3.3).

4.2.1.2 Isolation chromosomaler DNA mittels GeneJET Genomic DNA Purification Kit

Genomische DNA aus Streptomycceten, die als Matrize für eine PCR eingesetzt werden sollte, wurde mithilfe des Genomic DNA Purification Kit von Thermo Fisher Scientific isoliert. Als Ausgangspunkt diente ein Zellpellet aus einer dicht bewachsenen 10 ml *S. davaonensis*-Kultur in YS-Medium (siehe Kultivierung von Streptomycceten in Kapitel 4.1.1). Das Pellet wurde in 180 µl Lysepuffer für Gram-positive Bakterien suspendiert (20 mM Tris-HCl; 2 mM EDTA; 1,2 % Triton X-100; 50 mg/ml Lysozym; pH 8,0) und bei 37 °C für 30 min inkubiert. Alle anschließenden Schritte wurden nach Angaben des Herstellers für Gram-positive Bakterien durchgeführt. Die DNA wurde in 150 µl Elutionspuffer aufgenommen.

4.2.2 Isolation von Plasmiden aus *E. coli* und Reinigung von DNA-Lösungen

4.2.2.1 Isolation von Fosmiden und Plasmiden aus *E. coli*

Die Isolation von Plasmiden einer Größe bis 20 kb wurde mit dem Gene JET Plasmid Miniprep Kit von Thermo Fisher Scientific durchgeführt. Ein *E. coli*-Zellpellet aus 2 – 4 ml einer ÜNK in LB-Medium diente als Ausgangspunkt, abhängig von der Kopienzahl des Plasmides. Die Isolation des Plasmides erfolgte nach Angaben des Herstellers für Gram-negative Bakterien. Die Isolation von Fosmiden und Plasmiden einer Größe ab 20 kb wurde nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender DNA-Präzipitation durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Für eine Minipräparation diente ein *E. coli*-Zellpellet aus 5 ml LB-Medium. Eine Maxipräparation wurde aus einer 50 ml *E. coli* ÜNK in LB-Medium durchgeführt. Angaben zur Maxipräparation werden im Folgenden in eckigen Klammern vermerkt. *E. coli*-Zellen wurden durch Zentrifugation bei 13000 rpm [4000 rpm] und 4 °C für 10 min pelletiert und das erhaltene Pellet in 200 µl [5 ml] Lösung 1 (25 mM Tris-HCl; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase; pH 8,0) suspendiert. Nach einer Zugabe von 400 µl [7,5 ml] Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1 % SDS) wurden die Proben vorsichtig invertiert. Anschließend wurden 300 µl [10 ml] Lösung 3 (3 M Na-Acetat; 2 M Essigsäure; pH 5,2) zugefügt und vorsichtig invertiert. Zur Abtrennung präzipitierter Proteine wurden die Proben bei 13000 rpm [4000 rpm] und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eine Zugabe von 900 µl [25 ml] Isopropanol führte zur Präzipitation der DNA. Durch Zentrifugation bei 13000 rpm [4000 rpm] bei 4 °C für 10 min wurde das DNA-Pellet vom Überstand getrennt. Ein

Waschschrift mit 70 % Ethanol entfernte verbliebene Salzreste. Zur weiteren Reinigung wurde das DNA-Pellet in 500 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) Lösung aufgenommen und mit 200 µl einer Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) gemischt. Eine Zentrifugation bei 13000 rpm [4000 rpm] und 4 °C für 5 min trennten wässrige und organische Phasen. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der DNA wurden 1,5 ml 96 % Ethanol und 50 µl einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) zugefügt. Die präzipitierte DNA wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen.

4.2.2.2 Präzipitation von DNA

Zur Entsalzung von Ligationsansätzen und Reinigung von DNA-Fragmenten und Fosmiden einer Größe ab 20 kb wurden DNA-Lösungen mit einem Zehntel des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 3 Volumenanteilen 96 % igem Ethanol versetzt. Präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C für 15 min von Überstand getrennt. Ein Waschschrift mit 70 % iger (v/v) Ethanol entfernte verbliebene Salze. Das DNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in Volumina von 12 – 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen.

4.2.2.3 Reinigung von DNA mittels GeneJET PCR Purification Kit und Gel Extraction Kit

Zur Aufreinigung von (linearen) DNA-Fragmenten bis 20 kb Größe wurde das GeneJET PCR Purification Kit von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die zu reinigende Lösung wurde in einem 1:1 (v/v) Verhältnis mit Bindepuffer gemischt und nach Angaben des Herstellers prozessiert. Die Elution erfolgte in Volumina von 12 – 50 µl.

Ausgeschnittene Banden aus einer präparativen Agarosegelelektrophorese (4.2.3.3) wurden mit dem GeneJET Gel Extraction Kit von Thermo Fisher Scientific extrahiert. Das ausgeschnittene Agarosegelstück wurde in ein vorgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und im Verhältnis 1:1 (w/v) mit Bindepuffer versetzt. Die weitere Extraktion und Reinigung des DNA-Fragmentes erfolgten nach den Angaben des Herstellers.

4.2.3 Polymerase Kettenreaktion und Agarosegelelektrophorese

Die Polymerase Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde zur *in vitro* Vervielfältigung von DNA verwendet. Alle PCR-Reaktionen wurden mit einem C1000 Thermal Cycler PCR-System von Bio-Rad Laboratories GmbH durchgeführt. Neben wässrigen DNA-Lösungen dienten auch frische *E. coli*-Kolonien sowie unsporuliertes Streptomyces-Myzel als Matrize. Verwendete Primer sind in Tabelle 13 in Kapitel 3.4 aufgelistet.

4.2.3.1 PCR mit DNA-Lösungen als Matrize

Der PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der DreamTaq DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) und DNA-Lösungen als Matrize wurde unter anderem zur Überprüfung von Plasmiden und Klonierungen verwendet und ist in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15. Standard PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der DreamTaq DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen / µl pro 25 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Primer fw (5 µM)	1	0,2 µM
Primer rev (5 µM)	1	0,2 µM
DreamTaq Green-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP-Mix (10 mM)	1	0,4 mM
DMSO	1,25	5 %
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,05 U/µl
DNA-Matrize	0,5 – 3	50 ng
ddH ₂ O	<i>ad. 25</i>	

Der PCR-Ansatz wurde vereinigt und in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 16). Die Annealing-Temperatur der Primer ist abhängig von der Schmelztemperatur des Primers. In der Regel wird eine Annealing-Temperatur 5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primers gewählt.

Tabelle 16. PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen mit der DreamTaq DNA-Polymerase. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem C1000 Thermal Cycler PCR-System durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	45 s	25 – 30
Primer-Annealing	50 – 60	45 s	
Elongation	72	1 min pro kb	
Finale Elongation	72	5 – 10 min	1

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung von Genen wurden 5 µl der PCR-Reaktion für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 4.2.3.3).

Für Klonierungen von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde die Phusion Hot Start DNA-Polymerase (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Laut Angaben des Herstellers besitzt die

Phusion-Polymerase eine 50-fach geringere Fehlerrate, verglichen mit der DreamTaq-Polymerase. Bei der sog. hot start Modifikation handelt es sich um ein spezifisches Protein, das die DNA-Polymerase-Aktivität bei Raumtemperatur unterdrückt. Hohe Temperaturen in der initialen Denaturierungsphase setzen das Protein frei, wodurch die Polymerase aktiv wird. Der PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase ist in Tabelle 17 aufgelistet. Bei GC-reichen Matrizen, beispielsweise Streptomyces-DNA, wurde der 5x GC-Puffer verwendet.

Tabelle 17. Standard PCR-Ansatz zur Amplifizierung von Genen mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase.

Komponente	Volumen / µl pro 50 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Primer fw (5 µM)	2	0,2 µM
Primer rev (5 µM)	2	0,2 µM
5x GC-Puffer	10	1x
dNTP-Mix (10 mM)	2	0,4 mM
DMSO	2,5	5 %
Phusion Hot Start DNA-Polymerase (2 U/µl)	0,5	0,02 U/µl
DNA-Matrize	0,5 – 1,5	50 ng
ddH ₂ O	<i>ad. 50</i>	

Der PCR-Ansatz wurde vereinigt und in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 18).

Tabelle 18. PCR-Programm zur Amplifizierung von Genen mit der Phusion Hot Start DNA-Polymerase. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem C1000 Thermal Cycler PCR-System durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98	2 min	1
Denaturierung	98	30 s	25 – 30
Primer-Annealing	50 – 60	30 s	
Elongation	72	15 – 30 s pro kb	
Finale Elongation	72	5 min	1

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung von Genen wurden 5 µl der PCR-Reaktion für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 4.2.3.3).

4.2.3.2 Kolonie-PCR in *E. coli* und Streptomyceten

Zur schnellen Überprüfung von Klonierungen in *E. coli* oder von genetischen Modifikationen im Streptomyceten-Genom wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Als Matrize wurden *E. coli*- bzw. Streptomyceten-Zellen anstatt gereinigten DNA-Lösungen verwendet.

Nach einer erfolgreichen Transformation von Ligationsansätzen in *E. coli* (siehe Kapitel 4.1.3.2) wurden Einzelkolonien mit einer sterilen Pipettenspitze direkt von der Platte in 25 µl sterilem Wasser suspendiert und direkt in der PCR-Reaktion verwendet. Der PCR-Ansatz einer Kolonie-PCR für *E. coli*-Zellen ist in Tabelle 19 aufgelistet.

Tabelle 19. Ansatz für die Kolonie-PCR von *E. coli*-Zellen.

Komponente	Volumen / µl pro 25 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Primer fw (5 µM)	1	0,2 µM
Primer rev (5 µM)	1	0,2 µM
DreamTaq Green-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP-Mix (10 mM)	1	0,4 mM
DMSO	1,25	5 %
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,05 U/µl
<i>E. coli</i> Zellsuspension	18	

Der PCR-Ansatz wurde vereinigt und in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 20). Die initiale Denaturierungszeit bei 95 °C wurde für die Kolonie-PCR auf 5 min verlängert, um ein Freisetzen der DNA aus *E. coli*-Zellen zu verbessern.

Tabelle 20. PCR-Programm zur Amplifizierung von Kolonie-PCR-Reaktionen von *E. coli*-Zellen. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem C1000 Thermal Cycler PCR-System durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	45 s	25 – 30
Primer-Annealing	50 – 60	45 s	
Elongation	72	1 min pro kb	
Finale Elongation	72	5 – 10 min	1

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung von Genen wurden 5 µl der PCR-Reaktion für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 4.2.3.3).

Die Kolonie-PCR für *S. davaonensis* wurde innerhalb dieser Arbeit optimiert. Unsporuliertes Mycel wurde mit einem sterilen Zahnstocher solange in 50 µl DMSO suspendiert, bis ein Aufschluss des Mycels zu erkennen war. Nach einer Inkubation der Lösung bei -20 °C über Nacht wurde die DMSO-Mycel-Suspension 10 min lang bei 98 °C im Heizblock inkubiert. Für die PCR-Reaktion wurden 5 % des Reaktionsansatzes eingesetzt. Der PCR-Ansatz einer Kolonie-PCR für Streptomyceten ist in Tabelle 21 aufgelistet.

Tabelle 21. Kolonie-PCR-Ansatz mit Streptomyceten-Mycel.

Komponente	Volumen / µl pro 25 µl Ansatz	Finale Konzentration
Primer fw (5 µM)	1	0,2 µM
Primer rev (5 µM)	1	0,2 µM
DreamTaq Green-Puffer (10x)	2,5	1x
dNTP-Mix (10 mM)	1	0,4 mM
DMSO-Mycel-Suspension	1,25	5 %
DreamTaq DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,05 U/µl
ddH ₂ O	ad. 25 µl	

Der PCR-Ansatz wurde vereinigt und in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 22). Die initiale Denaturierungszeit bei 95 °C wurde für die Kolonie-PCR auf 5 min verlängert, um ein Freisetzen der DNA aus Streptomyceten-Mycel zu verbessern.

Tabelle 22. PCR-Programm für die Kolonie-PCR mit Streptomyceten-Mycel. Alle PCR-Reaktionen wurden in einem C1000 Thermal Cycler durchgeführt.

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	5 min	1
Denaturierung	95	45 s	25 – 30
Primer-Annealing	50 – 60	45 s	
Elongation	72	1 min pro kb	
Finale Elongation	72	5 – 10 min	1

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung von Genen wurden 5 µl der PCR-Reaktion für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 4.2.3.3).

4.2.3.3 Analytische und präparative Agarosegelelektrophorese

Mithilfe der Agarosegelelektrophorese ist es möglich, DNA-Fragmente der Größe nach aufzutrennen und mit Nukleinsäuren bekannter Größe zu vergleichen. Soweit nicht anders erwähnt, wurde für die Gelelektrophorese ein 1 % iges (w/v) Agarosegel in 1x TAE-Puffer (40 mM Tris-HCl; 20 mM Essigsäure; 1 mM EDTA; pH 8,5) verwendet. Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in horizontalen Elektrophoresekammern (Biorad Laboratories GmbH), abhängig von der Fragmentgröße, bei 80 – 100 V für 25 – 60 min. Sofern die verwendeten Puffer bei PCR oder Restriktionsverdau (Kapitel 4.2.3 und 4.2.4) keinen sogenannten Green-Puffer enthielten, wurde den Proben zuvor 6x Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) zugesetzt. Zur Abschätzung der Fragmentgrößen wurde der Größenstandard GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die Agarosegele zur Färbung der DNA 15 – 30 min in einer Ethidiumbromidlösung (0,01 µg/ml) in einer Diffusions-Entfärb-Apparatur inkubiert. Nach weiteren 30 min Entfärbung in VE-Wasser wurden DNA-Banden im UV-Licht visualisiert und mittels GelDoc XR Gel-Dokumentationssystem (Bio-Rad Laboratories GmbH) fotografiert. Zur Auswertung wurde die Quantity One 1S Analysis Software (Bio-Rad Laboratories GmbH) verwendet.

Zur Herstellung präparativer Agarosegele wurden spezielle Kämmen, mit einem Fassungsvermögen von 100 µl, verwendet. Nach der Auftrennung und Färbung der DNA-Fragmente wurde die benötigte DNA-Bande mithilfe eines Skalpell im präparativen Modus des GelDoc XR Gel-Dokumentationssystems ausgeschnitten und in ein vorgewogenes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Gelextraktion und Reinigung des DNA-Fragmentes erfolgte mit dem GeneJET Gel Extraction Kit (Kapitel 4.2.2.3).

4.2.4 Hydrolyse, Dephosphorylierung und Ligation von DNA-Fragmenten

4.2.4.1 Enzymatische Hydrolyse und Dephosphorylierung von DNA

Soweit nicht anders erwähnt, wurden für die enzymatische Hydrolyse von DNA-Fragmenten sogenannte FastDigest-Enzyme der Firma Thermo Fisher Scientific verwendet. Nach Angaben des Herstellers schneidet 1 µl des FastDigest-Enzyms 1 µg Lambda-DNA, Plasmid-DNA und genomische DNA sowie 0,2 µg eines PCR-Produktes innerhalb von 5 min. Eine Dephosphorylierung von Plasmid-DNA wurde durchgeführt, wenn eine Religation in den folgenden Reaktionen vermieden werden sollte. Das Enzym Alkalische Phosphatase FastAP (Thermo Fisher Scientific) wurde nach Angaben des Herstellers zum Reaktionsansatz zugefügt. Der Standardansatz einer enzymatischen Hydrolyse, mit FastDigest-Enzymen, ist in Tabelle 23 dargestellt.

Tabelle 23. Standardansatz der enzymatischen Hydrolyse mit FastDigest-Enzymen.

Komponente	Volumen / µl pro 20 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
DNA	2 – 5 (Plasmide) 10 (PCR-Produkt)	Bis zu 1 µg (Plasmid) Bis zu 0,2 µg (PCR-Produkt)
10x FastDigest Puffer	2	1x
FastDigest-Enzym 1	1	
FastDigest-Enzym 2	1	
ddH ₂ O	<i>ad. 20</i>	

Alle Reaktionen wurden in 1x FastDigest oder 1x FastDigest Green-Puffer bei 37 °C für 10 – 15 min durchgeführt. Der Ansatz der enzymatischen Hydrolyse wurde enzyspezifisch, thermisch inaktiviert oder direkt mit dem PCR Purification Kit (Kapitel 4.2.2.3) gereinigt.

4.2.4.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide

Für die Ligation von DNA-Fragmenten in Plasmide wurde die T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific) nach Angaben des Herstellers verwendet. In einem Standardansatz wurde eine Ligation in einem finalen Volumen von 10 µl mit einem molaren 1:3 Verhältnis von Plasmid zu Insert durchgeführt. In der Regel wurden Plasmidmengen von 50 – 100 ng eingesetzt. Eine Ligation wurde entweder bei Raumtemperatur für mindestens 60 min oder bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Für Transformationen in *E. coli* wurde im Anschluss der gesamte Ligationsansatz verwendet.

4.2.5 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen und Sequenzierung

4.2.5.1 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

DNA-Konzentrationen und DNA-Qualitäten wurden mit dem Nanovue Photometer (GE Healthcare GmbH) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zusätzlich wurde die Absorption der Lösung bei 230 nm für RNA und weitere organische Kontaminationen und bei 280 nm für Kontaminationen durch Proteine bestimmt. Aus den Verhältnissen der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bzw. 260 nm zu 230 nm kann die Reinheit der DNA-Lösung überprüft werden.

4.2.5.2 Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Fragmenten

Sequenzierungen von Plasmiden und gereinigten PCR-Fragmenten wurden durch die Firma LGC Genomics (Berlin) durchgeführt. Plasmidlösungen wurden mit ddH₂O auf eine Konzentration von 100 ng/µl verdünnt. Abhängig von der Größe wurden PCR-Fragmente auf

10 – 40 ng/µl (nach Angaben der Firma) verdünnt. Zu 10 µl der DNA-Lösungen wurden 4 µl der zugehörigen Primerlösung (5 µM) zugefügt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Sequenziermethode (Sanger *et al.*, 1977). Eine Auswertung der Sequenzierergebnisse wurde mit der Software CLC Main Workbench 6.9.2 durchgeführt.

4.2.6 Konstruktion des Expressionsvektors pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N>

Der Organismus *S. davaonensis* ist GC-reich (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Zur Prävention von Expressionsproblemen in *E. coli*, aufgrund unterschiedlicher Codonverwendung, wurde vor der Konstruktion des Plasmides eine Codonoptimierung durchgeführt. Die Nukleotidsequenz wurde mittels Java Codon Adaptation Tool für den Stamm *E. coli* K12 optimiert (Grote *et al.*, 2005). Am 5'-Ende des optimierten Gens wurden zusätzlich Nukleotide, die für einen Strep-Tag II (WSHPQFEK) mit nachfolgender Faktor Xa-Schnittstelle (IEGR) codieren, hinzugefügt. Das Konstrukt wurde von Thermo Fisher Scientific bezogen (Optimierte *rosC*-Sequenz siehe Kapitel 7). Zur Erleichterung der Transformation wurde die Sequenz als Gen bestellt, welches bereits in den Vektor pMA-RQ (vermittelt eine Ampicillin-Resistenz) kloniert wurde. Das gefriergetrocknete Plasmid wurde 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert und mit ddH₂O auf eine Konzentration von 250 ng/ µl verdünnt. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurden 50 ng des Plasmides zur Transformation von *E. coli* DH5α verwendet (siehe 4.1.3.2). Die Aufnahme des Plasmides in *E. coli* DH5α wurde mittels Kolonie-PCR (Kapitel 4.2.3.2) mit den Primern M13_fw (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3') und M13_rev (5'-GGA AAC AGC TAT GAC CAT G-3') bestätigt. Die Sequenz wurde vor Verwendung des Plasmides als PCR-Matrize durch Sequenzierung (Kapitel 4.2.5.2) bestätigt. Für die Expression in *E. coli* wurde der Expressionsvektor pPSG_IBA3 (IBA Lifesciences) verwendet. Dabei handelt es sich um einen Stargate Akzeptor Vektor zur bakteriellen Expression von Genen. Die Expressionskassette steht unter transkriptioneller Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promoters (Angaben des Herstellers). Direkt im Anschluss an die Expressionskassette ist in pPSG_IBA3 ein Strep-Tag II codiert, der an den C-Terminus des Proteins fusioniert werden kann. Die Klonierung erfolgte über die Stargate Direkt-Transfer-Klonierung von IBA Lifesciences basierend auf dem Typ IIs Restriktionsenzym *Esp3I*. Primer wurden nach Angaben des Herstellers entworfen. Die Amplifizierung des Zielgenes erfolgte mit der Phusion DNA-Polymerase und den Primern *rosCopt_StrepN_Esp3I_fw* (5'-AGC GCG TCT CCA ATG TGG AGC CAC CCG CAG TTC G -3') und *rosCopt_StrepN_Esp3I_rev* (5'-AGC GCG TCT CCT CCC TTA GAT AAC GTC AGA CGG AGC AGC-3') nach Kapitel 4.2.3.1. Die Aufreinigung des PCR-Produktes wurde mit dem Gene JET PCR Purification Kit nach Kapitel 4.2.2.3 durchgeführt. Die Isolation von pPSG_IBA3 erfolgte mit dem Gene JET Plasmid Miniprep Kit nach Kapitel 4.2.2.1. Im Unterschied zur Standard-Klonierung erfolgen die

enzymatische Hydrolyse der DNA-Fragmente und die Ligation bei der Stargate Direkt-Transfer-Klonierung in einem Schritt (Tabelle 24).

Tabelle 24. Standard Reaktionsansatz der Stargate Direkt-Transfer-Klonierung.

Komponente	Volumen / µl pro 25 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Akzeptorvektor pPSG_IBA3	7,5	5 ng
10x FastDigest-Puffer	2,5	1x
PCR-Produkt (2 nm)	12,5	1 nm
DTT/ ATP-Mix (25 mM DTT; 12,5 mM ATP)	1	0,5 mM DTT, 0,25 mM ATP
T4 DNA-Ligase (1 U/µl)	1	0,02 U
FastDigest <i>Esp3I</i> (10 U/µl)	0,5	0,5 U

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig gemischt und bei 30 °C für 1 h inkubiert. Ein Aliquot chemisch kompetenter *E. coli* DH5α wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit 10 µl des Reaktionsansatzes gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei 37 °C wurden der Ansatz weitere 2 – 5 min auf Eis inkubiert und direkt auf LB-Agar mit 100 µg/ml Amp und 50 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid plattiert. Nach einer Inkubation bei 37 °C über Nacht wurden drei weiße Kolonien gepickt. Das Konstrukt wurde im Anschluss mittels Kolonie-PCR (Kapitel 4.2.3.2) mit den Primern PSG_seq_fwd (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') und PSG_seq_rev (5'-TAG TTA TTG CTC AGC GGT GG-3') und enzymatischer Hydrolyse (Kapitel 4.2.4) mit den Enzymen *HindIII* und *XbaI* überprüft.

4.2.7 Mutagenese des Expressionsvektors pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N>

Für Mutagenese-Experimente in dem *rosC* Expressionsvektor pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N> wurde das Quikchange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers verwendet. Alle Primer wurden mithilfe des QuikChange Primer Designprogrammes (<https://www.agilent.com/store/primerDesignProgram.jsp>) entworfen und sind in Tabelle 13 in Kapitel 3.4 aufgelistet. Tabelle 25 zeigt einen Standardreaktionsansatz für die Mutagenese-Reaktion in pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N> mit dem Quikchange Lightning Mutagenesis Kit. Der PCR-Ansatz aus Tabelle 25 wurde vereinigt und in zwei Aliquote geteilt. Zu einem Aliquot wurden 0,5 µl des QuikChange Lightning Enzyms zugefügt. Das Aliquot ohne Enzym diente als Negativkontrolle.

Tabelle 25. Standard Reaktionsansatz für Mutagenese-Experimente in pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N> mit dem Quikchange Lightning Mutagenesis Kit.

Komponente	Volumen / µl pro 50 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Plasmid-DNA (200 ng/µl)	0,5	2 ng/µl dsDNA
10x Quikchange Reaktionspuffer	5	1x
Forward Primer (10 µM)	0,8	0,16 µM
Reverse Primer (10 µM)	0,8	0,16 µM
dNTP-Mix (10 mM)	1	0,2 mM
QuikSolution	1,5	
ddH ₂ O	<i>ad. 50</i>	

Beide Ansätze wurden in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 26). Nach der PCR-Reaktion aus Tabelle 26 wurde eine enzymatische Hydrolyse methylierter DNA mit 1 µl *DpnI* für 5 min bei 37 °C durchgeführt und dieser Ansatz direkt für die Transformation eingesetzt.

Tabelle 26. PCR-Programm zur Amplifizierung des mutagenisierten Vektors pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N>.

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	95	2 min	1
Denaturierung	95	20 s	18
Primer-Annealing	60	10 s	
Elongation	68	30 s pro kb	
Finale Elongation	68	5 min	1

Für die Transformation wurden XL10 Gold ultrakompetente Zellen mit 2 µl β-Mercaptoethanol versetzt und 2 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit jeweils 2 µl des verdauten Reaktionsansatzes nach Kapitel 4.1.3.2 transformiert. Anschließend an die Transformation wurden ÜNK von 2 – 3 Kolonien pro Konstrukt nach Kapitel 4.1.1.2 hergestellt und nach Kapitel 4.2.2.1 mit dem Gene JET Plasmid Miniprep Kit isoliert. Um die erfolgreiche Mutagenese zu überprüfen, wurde eine Sequenzierung nach Kapitel 4.2.5.2 mit den Primern PSG_seq_fwd und PSG_seq_rev durchgeführt.

4.2.8 Deletion von BN159_8033 in *S. davaonensis*

4.2.8.1 Erstellen einer *S. davaonensis* CopyControl Fosmid Genbank

Für die Deletion von Genen in *S. davaonensis* wurde eine Fosmid Genbank mit dem CopyControl Fosmid Library Production Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin), nach Angaben des Herstellers hergestellt. Hochmolekulare, chromosomale DNA von *S. davaonensis* wurde nach Kapitel 4.2.1.1 isoliert. Die Qualität der DNA wurde in einem 1 % igen Agarosegel abgeschätzt. Die Anzahl der benötigten Klone, um eine Abdeckung des *S. davaonensis* Genoms mit ausreichender Wahrscheinlichkeit zu erhalten, wurde mithilfe von Formel 1 berechnet.

$$N = \frac{\ln(1 - P)}{\ln(1 - f)} \quad (1)$$

Die Nummer N der benötigten Klone berechnet sich aus der gewünschten Wahrscheinlichkeit P (als Bruch dargestellt) und dem Verhältnis des Genomanteils in einem Klon zum Gesamtgenom f aus Formel 2.

$$f = \frac{\text{Genomanteil Fosmid}}{\text{Größe } S. \text{davaonensis Genom}} \quad (2)$$

CopyControl Klone wurden von den Transfektionsplatten gepickt und in 96-Well Mikrotiterplatten bei 37 °C in LB-Medium kultiviert. Nach Zugabe von Glycerin, bis zu einer finalen Konzentration von 15 % (v/v), wurde die Genbank bei -80 °C gelagert.

Für die Identifikation des gewünschten Fosmid wurde die gesamte Genbank auf LB-Agar mit 25 µg/ml Chloramphenicol (Cml) mithilfe eines 48-Well Stempels überführt und bei 37 °C über Nacht inkubiert. Pro LB-Agarplatte wurden die gesamten Kolonien mithilfe von 1 ml LB-Medium gespült und die Zellsuspension in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Aus dieser Mischung wurde eine Fosmid-Minipräparation nach Kapitel 4.2.2.1 durchgeführt. Ein Genbank-Pool, welches das gesuchte Fosmid trägt, wurde in einer PCR nach Kapitel 4.2.3.1 bestätigt. Nachdem der Genbank-Pool identifiziert wurde, wurde das gesuchte Fosmid in einer Kolonie-PCR aller 48 Kolonien nach 4.2.3.2 identifiziert.

4.2.8.2 Amplifizierung der Resistenzkassette

Für Gendeletionen in *S. davaonensis* wurde die Technik zur Deletion von Genen in *S. coelicolor* A3(2) angewendet. Das Prinzip basiert auf der homologen Rekombination in *E. coli* mithilfe von Rekombinationsproteinen aus der Lambda Phage (Gust *et al.*, 2003;

Datsenko & Wanner, 2000). Das Lambda Red System verfügt über eine hohe Rekombinationsrate bei der Transformation mit linearer DNA (Murphy, 1998).

Vor Gendeletionen in *S. davaonensis* wurde die Deletion auf einem *S. davaonensis* Fosmid pCC1FOS in *E. coli* durchgeführt. Das Fosmid pCC1FOS_8033 trägt das zu deletierende Gen BN159_8033, welches strangauf- und strangabwärts von circa 20 kb Regionen aus *S. davaonensis* flankiert ist. Eine Apramycinresistenzkassette wurde mithilfe von Primern 8033_fw (5'-CCG GTG AAC CGC TGA AGC ACG GAT ACG GAG AAC GTG GTG ATT CCG GGG ATC CGT CGA CC-3') und 8033_rev (5'-ATG CGC TGT TCC TCG CTG CTC ATC GGC GCC TCG CCC TCA TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3'), welche 39 bp lange Homologien zu den flankierenden Regionen des Gens besitzen, amplifiziert. Um eine hohe Anzahl an resistenten Transformanten ohne Gendeletion zu vermeiden, wurde die Kassette vor der PCR in einem präparativen Agarosegel gereinigt (Kapitel 4.2.3.3). Die Resistenzkassette wurde aus dem Plasmid pIJ773 durch enzymatische Hydrolyse von *EcoRI* und *HindIII* ausgeschnitten (Kapitel 4.2.4). Der Ansatz wurde in einem 1 % (w/v) Agarosegel bei 80 V für 1 h in 1x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Kassette der Größe von 1382 bp wurde aus dem Gel geschnitten und mittels GeneJET Gel Extraction Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 ist in Tabelle 27 aufgelistet.

Tabelle 27. PCR-Ansatz zur Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 (Gust *et al.*, 2003).

Komponente	Volumen / µl pro 50 µl Ansatz	Finale Menge oder Konzentration
Primer fw (100 µM)	0,5	1 µM
Primer rev (100 µM)	0,5	1 µM
5x Phusion HF-Puffer	10	1x
dNTP-Mix (10 mM)	4	0,8 mM
DMSO	2,5	5 %
Phusion Hot Start II DNA-Polymerase (2 U/µL)	0,5	0,02 U / µl
pIJ773 <i>EcoRI HindIII</i> verdaut, gereinigt	3	100 ng
ddH ₂ O	<i>ad.</i> 50 µl	

Der PCR-Reaktionsansatz zur Amplifizierung der Resistenzkassette wurde vereinigt und in folgendem Programm amplifiziert (Tabelle 28).

Tabelle 28. PCR-Programm zur Amplifizierung der Apramycinresistenzkassette aus pIJ773 (Gust *et al.*, 2003).

Reaktionsschritt	Temperatur / °C	Zeit	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	94	2 min	1
Denaturierung	94	45 s	10
Primer-Annealing	50	45 s	
Elongation	72	90 s	
Denaturierung	94	45 s	15
Primer-Annealing	55	45 s	
Elongation	72	90 s	
Finale Elongation	72	5 min	1

Zur Überprüfung der erfolgreichen Amplifizierung der Resistenzkassette wurden 5 µl der PCR-Reaktion für eine Agarosegelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 4.2.3.3). Die restlichen 45 µl wurden mittels GeneJET PCR Purification Kit gereinigt (Kapitel 4.2.2.3) und in 12 µl ddH₂O eluiert.

4.2.8.3 Gendeletion auf dem *S. davaonensis* Fosmid

Der *E. coli* Stamm BW25113 trägt das Rekombinationsplasmid pKD46. *E. coli* BW25113/pKD46 wurde nach Kapitel 4.1.3.2 mit pCC1FOS_8033 transformiert und auf LB-Medium mit 50 µg/ml Carb (pKD46) und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033) selektiert. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carb (pKD46) und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033) überführt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das Plasmid pKD46 trägt einen Temperatursensitiven Replikationsursprung (Datsenko & Wanner, 2000). Zur Erhaltung des Plasmides wurden Kulturen deshalb stets bei 30 °C inkubiert. Eine 50 ml LB-Kultur mit 50 µg/ml Carb (pKD46) und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033) wurde mit 5 % der ÜNK von BW25113/pKD46/pCC1FOS_8033 inokuliert. Zur Induktion der Lambda Red Gene (*gam*, *bet* und *exo*) wurde 1 M L-Arabinoselösung bis zu einer finalen Konzentration von 10 mM zugefügt. Die Kultur wurde bei 30 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 inkubiert und elektrokompetente Zellen nach Kapitel 4.1.3.1 vorbereitet. 50 µl der Zellsuspension wurde mit 100 ng der gereinigten Apramycinresistenzkassette (aus Kapitel 4.2.8.2) transformiert. Transformanten wurden auf LB-Agar mit 50 µg/ml Apra und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033 Δ8033::Apra_oriT) bei 37 °C selektiert. Der erfolgreiche Austausch des Gens durch die Apramycinresistenzkassette wurde mittels Kolonie-PCR nachgewiesen (siehe Kapitel 4.2.3.2).

4.2.8.4 Ausschnitt der Resistenzkassette durch Rekombination

Die Entfernung der Resistenzkassette erlaubt es, weitere Gendeletionen auf demselben Fosmid durchzuführen. Die Apramycinresistenzkassette ist von *flippase* (FLP) *recognition targets* (FRT) flankiert. Die Expression der FLP-Rekombinase in *E. coli* entfernt das Apramycinresistenzgen und hinterlässt eine 81 bp Scar-Sequenz (Gust *et al.*, 2003). Das mutagenisierte Fosmid pCC1FOS_8033 Δ 8033::Apra_oriT aus Kapitel 4.2.8.3 wurde nach Kapitel 4.2.2.1 aus *E. coli* BW25113 isoliert. *E. coli* BT340 besitzt das FLP-Rekombinationsplasmid pCP20. Elektrokompente Zellen von *E. coli* BT340 wurden nach Kapitel 4.1.3.1 hergestellt und nach Kapitel 4.1.3.2 mit 100 ng des mutagenisierten Fosmides transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar mit 50 μ g/ml Carb (pCP20), 50 μ g/ml Apra und 25 μ g/ml Cml (pCC1FOS_8033 Δ 8033::Apra_oriT) für 48 h bei 30 °C inkubiert. Einzelkolonien von BT340/ pCP20/ pCC1FOS_8033 Δ 8033::Apra_oriT wurden auf LB-Agar ohne Antibiotika gestrichen und bei 42 °C über Nacht inkubiert. Die FLP-Synthese und der Verlust des Plasmides wurden bei 42 °C induziert (Cherepanov & Wackernagel, 1995). Zur Identifikation Apramycin-sensitiver Kolonien wurden 20 – 30 Kolonien zuerst auf eine LB-Agarplatte mit 50 μ g/ml Apra und 25 μ g/ml Cml und im Anschluss auf eine LB-Agarplatte mit 25 μ g/ml Cml gestrichen. Bei Apramycin-sensitiven Kolonien wurde die Resistenzkassette erfolgreich entfernt. Der Verlust der Resistenzkassette (pCC1FOS_8033 Δ 8033) wurde zusätzlich durch Kolonie-PCR (Kapitel 4.2.3.2) und anschließend Sequenzieren (Kapitel 4.2.5.2) bestätigt.

4.2.8.5 Austausch des Chloramphenicolresistenzgens durch eine Apramycinresistenzkassette in pCC1FOS

Das Fosmid pCC1FOS_8033 Δ 8033 trägt keinen oriT für Streptomyeten, der für die Übertragung der DNA auf den Empfänger notwendig ist. Aus diesem Grund musste, vor der Übertragung des Fosmides auf *S. davaonensis*, ein oriT in pCC1FOS_8033 Δ 8033 integriert werden. Das Chloramphenicolresistenzgen wurde dafür durch die Apramycinresistenzkassette aus plJ773 ausgetauscht (siehe Kapitel 4.2.8.3). Neben einem Apramycinresistenzgen trägt diese Kassette ebenfalls einen oriT für Streptomyeten (Gust *et al.*, 2003). Lange Primer oriT_aac_F (5'-CAG GCG TTT AAG GGC ACC AAT AAC TGC CTT AAA AAA ATT AGA AGT TCC CGC CAG CCT CGC-3') und oriT_aac_R (5'-TGA GTT ATC GAG ATT TTC AGG AGC TAA GGA AGC TAA AAT GGG AAT AGG AAC TTA TGA GC-3') mit 39 bp Homologien um das Chloramphenicolresistenzgen wurden, wie in Kapitel 4.2.8.2 beschrieben, entworfen. Die mit *EcoRI* und *HindIII* geschnittene und gereinigte Resistenzkassette wurde als Matrize für die PCR verwendet und mit dem PCR Purification Kit gereinigt. *E. coli* BW25113/ pKD46 wurde, wie in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben, mit dem mutagenisierten Fosmid pCC1FOS_8033 Δ 8033 transformiert und auf LB-Agar mit 50 μ g/ml

Carb (pKD46) und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033 Δ8033) selektiert. Eine Kolonie wurde in 5 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Carb (pKD46) und 25 µg/ml Cml (pCC1FOS_8033 Δ8033) überführt und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Diese Kultur diente als Vorkultur für den Austausch des Chloramphenicolresistenzgens gegen die Apramycinresistenzkassette, wie in Kapitel 4.2.8.3 beschrieben. Transformanten wurden auf LB-Agarplatten mit 50 µg/ml Apra (pCC1FOS_{Apra}_8033 Δ8033) selektiert und durch eine Kolonie-PCR mit den Primern oriTneo_seq_F (5'-GAA TCG GCC AAC GCG AAC CC -3') und CaS45 oriT (pSET)_seq_R (5'-CCT GCT TCG GGG TCA TTA TAG CG -3') (Kapitel 4.2.3.2) und anschließend Sequenzieren (Kapitel 4.2.5.2) bestätigt.

4.2.8.6 Konjugation und Selektion auf Single- und Double-Crossover in *S. davaonensis*

Für eine Konjugation in *S. davaonensis* wurde das Fosmid pCC1FOS_{Apra}_8033 Δ8033 über *E. coli* ET12567 in *S. davaonensis* konjugiert (Kapitel 4.1.3.3). Bei sog. Single-Crossover ist das gesamte Fosmid durch homologe Rekombination in das Streptomyceten-Genom integriert. Exkonjuganten wurden über mehrere Generationen auf MS-Agar mit 20 µg/ml Ndx und 50 µg/ml Apra gestrichen. Der erfolgreiche Single-Crossover wurde mit einer Kolonie-PCR für Streptomyceten (Kapitel 4.2.3.2) mit den Primern 8033_Mitte_fw (5'-CCC ACA AGT TCC TCG CCT CAC A-3') und 8033_Mitte_rev (5'-CTG GCG TGG GGA CTT GAT GTT-3') bestätigt. Es ist zu beachten, dass bei erfolgreichem Single-Crossover sowohl die Wildtypbande als auch die Bande des deletierten Gens, inklusive 81 bp Scar-Sequenz, auf dem Agarosegel zu sehen ist, da das gesamte Fosmid ins Genom rekombiniert ist. Ein Double-Crossover wurde herbeigeführt, indem der Selektionsdruck auf den Single-Crossover ausgesetzt wurde. Sporen des Single-Crossovers wurden in seriellen Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻⁸ auf MS-Agar plattiert. Sobald auf den gewachsenen Einzelkolonien Sporen zu sehen waren, wurden alle Platten auf einen Double-Crossover getestet. Mithilfe eines Stempels mit sterilem Samttuch wurden Sporen abgenommen und zuerst auf MS-Agar mit Antibiotikum und anschließend auf MS-Agar ohne Antibiotikum überführt. Nach einer Inkubation der Platten für 3 – 5 Tage bei 30 °C konnten sensitive Kolonien detektiert werden. Der erfolgreiche Double-Crossover wurde mit einer Kolonie-PCR für Streptomyceten (Kapitel 4.2.3.2) mit den Primern 8033_Mitte_fw und 8033_Mitte_rev bestätigt. Bei erfolgreichem Double-Crossover ist ausschließlich die Bande des deletierten Gens auf dem Agarosegel zu sehen. Das PCR-Produkt positiver Double-Crossover wurde mit dem GeneJET PCR Purification Kit gereinigt, in 25 µl Elutionspuffer eluiert und für Sequenzierungen eingesetzt (Kapitel 4.2.5.2). Nur bei erfolgreichem Double-Crossover konnten saubere Sequenzierdaten erhalten werden. Im Anschluss an die Sequenzierung wurde eine Sporensuspension nach Kapitel 4.1.1.2 vorbereitet.

4.2.9 Expression von BN159_8033 in *S. davaonensis*

Zur Konstruktion von Komplementations- und Überexpressionsstämmen in *S. davaonensis* wurde das Gen BN159_8033 aus *S. davaonensis* in den integrativen Expressionsvektor pSET152_ermE über die Schnittstellen *Xba*I und *Bam*HI kloniert. Das Plasmid besitzt einen konstitutiven Erythromycin-Resistenz Promoter permE am 5'-Ende der Multiple Cloning Site. Die Konjugation von pSET152_ermE <8033> wurde über den nicht-methylierenden *E. coli* ET12567 mit Sporen von *S. davaonensis* Wildtyp (Überexpression) und dem BN159_8033 Deletionsstamm *S. davaonensis* Δ BN159_8033 (Komplementation) durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.3.3). Exkonjuganten wurden über mehrere Generationen auf MS-Agar mit 20 μ g/ml Ndx und 50 μ g/ml Apra gestrichen. Die erfolgreiche Integration des Plasmides ins *S. davaonensis* Genom wurden mit einer Kolonie-PCR für Streptomyceten (Kapitel 4.2.3.2) bestätigt. Zur Kontrolle der Integration über die Φ C31 Integrationsseite wurden die Primer attB_fw (5'-CGG GTG CCA GGG CGT GC -3') und integrase_rev (5'-CGC GTG ATC TCC TTC GTC TCC-3') verwendet.

4.3 Biochemische Methoden

4.3.1 Mechanischer Aufschluss von Bakterienzellen

4.3.1.1 French Press System

Ein gefrorenes *E. coli*-Zellpellet (aus Kapitel 4.1.4) wurde auf Eis aufgetaut und in 30 ml Puffer W (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; pH 8,0) suspendiert, der eine cOplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablette (Merck KGaA, Darmstadt) enthält. Die Suspension wurde in drei Zyklen durch eine French Press bei 10 °C und 2000 bar aufgeschlossen. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch zwei Zentrifugationsschritte (8000 rpm bei 4 °C für 15 min, gefolgt von 30000 rpm bei 4 °C für 30 min) entfernt und das geklärte Lysat für die Proteinreinigung in Kapitel 4.3.4.1 verwendet.

Gefrorenes Streptomyceten-Mycel wurde in 20 ml 1x PBS-Puffer (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) suspendiert und in vier Zyklen durch eine French Press, bei 10 °C und aufsteigendem Druck von 1500 bis 2000 bar, aufgeschlossen. Zelltrümmer und intakte Zellen wurden durch Zentrifugation (8000 rpm bei 4 °C für 30 min) entfernt. Der erhaltene Zellextrakt wurde stets auf Eis gelagert, um einen Aktivitätsverlust zu verhindern. Das Lysat wurde für Enzymaktivitätstests in Kapitel 4.3.5 verwendet.

4.3.1.2 FastPrep System

Für *E. coli* und *Streptomyces* Suspensionen mit einem kleineren Volumen als 2 ml wurde der Zellaufschluss in dem FastPrep System (MP Biomedicals) durchgeführt. Gefrorenes Zellpellet

wurde in ca. 1 ml Puffer W oder 1x PBS-Puffer suspendiert und in FastPrep Gefäße mit 200 µl Glasperlen (Durchmesser 300 – 400 µm) überführt. Der Zellaufschluss erfolgte in 4 Zyklen von 60 s bei einer Umdrehungsgeschwindigkeit von 6 m/s. Die FastPrep Gefäße wurden nach 2 Zyklen für 5 min auf Eis gelagert, um ein Überhitzen der Probe zu vermeiden. Glasperlen und Zelltrümmer wurden bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Lysat wurde für die SDS-PAGE nach Kapitel 4.3.2 oder zur Flavin-Detektion nach Kapitel 4.3.5.2 verwendet.

4.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford und SDS-PAGE

Die Konzentration von Proteinproben wurde mit der Bradford Methode (1976) bestimmt und mit einer Standardkurve aus Bovinem Serumalbumin (BSA) von 0 – 20 µg/ml verglichen (Bradford, 1976). 800 µl verdünnte Proteinprobe wurden mit 200 µl Protein-Assay-Konzentrat (Bio-Rad Laboratories GmbH) in einer Halbmikroküvette gemischt, 5 min inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Für die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) wurden Proteinproben mit ddH₂O und 6x SDS Probenpuffer (Thermo Fisher Scientific) verdünnt und 15 min bei 98 °C denaturiert. Die Proben wurden anschließend auf ein Any kD Mini-PROTEAN TGX Gel (Bio-Rad Laboratories GmbH) geladen. Zur Größenabschätzung wurde der Marker PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Typischerweise wurden von *E. coli*-Rohextrakten 10 µg Protein und von gereinigten Proteinlösungen 5 µg pro Well aufgetragen. Die Proteinproben wurden in 1x Tris-Glycin-Puffer (25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS; pH 8,3) bei 100 V für 10 min im Sammelgel fokussiert und anschließend bei 200 V für 20 min aufgetrennt. Das Gel wurde mit VE-Wasser gewaschen, mindestens 1 h mit der PageBlue Protein Staining Solution (Thermo Fisher Scientific) gefärbt und in mehreren Schritten mit VE-Wasser entfärbt.

4.3.3 Entfernung des N-terminalen Strep-Tags durch Faktor Xa Hydrolyse

Im Expressionsplasmid pPSG_IBA3<rosC_{opt}_N> wurden am 5'-Ende der Sequenz des optimierten *rosC* Gens zusätzlich Nukleotide für einen Strep-Tag II mit nachfolgender Faktor Xa-Schnittstelle hinzugefügt (Sequenz siehe Kapitel 7). Durch die integrierte Faktor Xa-Schnittstelle kann der Strep-Tag II nach erfolgreicher Reinigung aus *E. coli* mit dem Faktor Xa Cleavage Capture Kit (Merck, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers entfernt werden. Die Behandlung von RosC^{StrepN} mit Faktor Xa Protein wurde in einem finalen Volumen von 500 µl 1x Faktor Xa Cleavage/ Capture Puffer (100 mM NaCl; 5 mM CaCl₂; 50 mM Tris; pH 8,0) durchgeführt, der 1 mg rekombinantes RosC^{StrepN} und 25 µg Faktor Xa Protein enthielt. Als Kontrolle diente das Xa Cleavage-Kontrollprotein des Herstellers. Die Hydrolyse des

Kontrollproteins wurde in einem finalen Volumen von 20 µl in 1x Faktor Xa Cleavage/ Capture Puffer durchgeführt, der 4 µg Kontrollprotein und 0,1 µg Faktor Xa-Protein enthielt. Die Reaktionsgemische wurden für 16 h bei 25 °C inkubiert. Faktor Xa wurde von RosC durch den Gebrauch von Xarrest Agarose getrennt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde RosC durch Zentrifugation durch einen Spin-Filter von Faktor Xa getrennt. Das Faktor Xa Protein wurde, gebunden an Xarrest Agarose, im Filter zurückgehalten. Der Durchfluss enthielt eine Mischung aus RosC^{StrepN} und RosC. Unverdautes RosC^{StrepN} wurde (falls vorhanden) von RosC mithilfe eines 1 ml Gravity Flow Strep-Tactin Säulchens (IBA Lifesciences, Göttingen) getrennt. Das Säulchen wurde in 5 Säulenvolumen (*column volume*, CV) Puffer W (siehe Kapitel 4.3.4.1) equilibriert und mit der Enzymlösung aus der Faktor Xa-Hydrolyse beladen. Fraktionen à 1 ml wurden aufgesammelt. RosC ohne Strep-Tag II konnte nicht mit dem Säulenmaterial wechselwirken und war deshalb im Durchfluss des Säulchens zu finden. Nachdem restliches RosC mit 5 CV Puffer W vom Säulchen gewaschen wurde, wurden RosC^{StrepN}-Reste mit 5 CV Puffer E eluiert. Alle Fraktionen wurden zur SDS-PAGE-Analyse (Kapitel 4.3.2) vorbereitet. Die RosC-Lösung wurde mit Glycerin bis zu einer finalen Konzentration von 20 % (v/v) versetzt und bei -20 °C bis zur Verwendung in *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests (siehe Kapitel 4.3.6.2) gelagert.

4.3.4 Fast Protein Liquid Chromatography

Alle Schritte der FPLC (*fast protein liquid chromatography*) wurden mit dem ÄKTApurifier System (GE Healthcare GmbH) durchgeführt und alle Daten wurden mit der Software Unicorn 5.1. ausgewertet. Der *E. coli*-Rohextrakt wurde nach Kapitel 4.3.1.1 gewonnen. Alle verwendeten Puffer wurden vor der Verwendung filtriert und entgast.

4.3.4.1 Chromatographische Reinigung von RosC^{StrepN}

Das folgende Reinigungsprotokoll wurde zur vollständigen Reinigung von RosC mit einem fusionierten Strep-Tag II am N-Terminus (RosC^{StrepN}) aus *E. coli* BL21 (DE3) optimiert. Die Affinitätschromatographie dient dazu, Proteine mit Strep-Tag II aus dem *E. coli*-Rohextrakt aufzufangen. Mögliche Verunreinigungen wurden im Anschluss nach dem Prinzip der Anionenaustauschchromatographie (*anion exchange*, AEX) abgetrennt. Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) diente, als Polierschritt, zur Sicherstellung einer reinen Proteinlösung.

Eine 5 ml Strep-Tactin Superflow high capacity Säule (IBA Lifesciences) wurde bei einer Flussrate von 1 ml/min mit 5 CV Puffer W equilibriert und anschließend mit dem *E. coli* Rohextrakt aus (Kapitel 4.3.1.1) über eine 50 ml Superloop (GE Healthcare GmbH) beladen. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29. Puffer für die Affinitätschromatographie. Alle Puffer wurden vor Verwendung filtriert und entgast.

Puffer W pH 8,0	Puffer W pH 10,5	Puffer E pH 8,0	Puffer R pH 8,0
100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 10 mM Desthiobiotin	100 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM HABA

Das an der Säule gebundene RosC^{StrepN} wurde mit mindestens 10 CV Puffer W gewaschen, bis zu einem konstanten UV-Signal. Die Elution des Proteins wurde mit einem linearen Gradienten von 3,33 % Puffer B/min gestartet und das eluierte Protein mit einem Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentrator mit einem Molekulargewichtsausschluss (*molecular weight cutoff*, MWCO) von 10 kDa bei 10 °C und 8000 rpm konzentriert.

Die Anionenaustauschchromatographie wurde mit einer Fractogel 1 ml TMAE (M) Säule (Merck KGaA) bei einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Nach der Equilibrierung der Säule mit 5 CV Puffer A (50 mM Tris-HCl; 25 mM NaCl; pH 7,6) wurde die konzentrierte Proteinlösung über eine 2 ml Probenschleife auf die Säule geladen und das gebundene Protein mit 5 bis 10 CV Puffer A gewaschen. Die Elution wurde mit einem linearen Gradienten 3,33 % Puffer B/min (50 mM Tris-HCl; 1 M NaCl; pH 6,6) induziert. Weitere Unreinheiten wurden mit 100 % Puffer B von der Säule eluiert. Das Eluat wurde mit einer Vivaspin 6 Säule mit MWCO von 3 kDa bei 10 °C und 8000 rpm konzentriert.

Die Größenausschlusschromatographie wurde mit einer Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule (GE Healthcare GmbH) bei einer Flussrate von 0,5 ml/min TBS-Puffer (10 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; pH 7,6) durchgeführt. Die konzentrierte Proteinlösung wurde über eine 500 µl Probenschleife auf die Säule aufgetragen und bei konstantem Fluss von 0,5 ml/min eluiert.

Enzymlösungen, welche für die biochemische Charakterisierung von RosC^{StrepN} verwendet wurden, wurden im Anschluss an die Affinitätschromatographie, mithilfe einer SEC Entsalzungssäule, von störenden Pufferbestandteilen getrennt und in TBS-Puffer (siehe oben) überführt. Eluierte Proteinfraktionen aus der Affinitätschromatographie wurden dafür direkt über eine 10 ml Probenschleife auf eine HiPrep 26/10 Desalting Säule (GE Healthcare GmbH) geladen und bei einer Flussrate von 2 ml/min in TBS-Puffer eluiert.

Das RosC^{StrepN}-Eluat wurde mit einer Vivaspin 6 Säule mit MWCO von 3 kDa bei 10 °C und 8000 rpm konzentriert. Nach Zugabe von Glycerin bis zu einer finalen Konzentration von 25 % (v/v) wurde die Proteinlösung bei -20 °C gelagert. Die Reinheit aller Fraktionen der RosC-Reinigung wurde mit einer SDS-PAGE analysiert (Kapitel 4.3.2).

4.3.4.2 Bestimmung der nativen Proteingröße mittels Größenausschlusschromatographie

Für die Bestimmung der nativen Größe von RosC^{StrepN} wurde eine SEC durchgeführt. Alle SEC-Versuche wurden mit einer Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule bei einer konstanten Flussrate von 0,5 ml/min in TBS-Puffer durchgeführt (siehe Kapitel 4.3.4.1). Das Retentionsvolumen ist abhängig von der Proteingröße und kann mit Elutionsvolumina von Standardproteinen verglichen werden. Es wurden zwei Lösungen in TBS-Puffer hergestellt. Lösung 1 enthielt jeweils 2,5 mg/ml Ribonuclease A (13,7 kDa) und Ovalbumin (42,7 kDa). Lösung 2 enthielt 1,25 mg/ml Chymotrypsinogen (25,6 kDa) und 3,75 mg/ml Bovines Serumalbumin (66,5 kDa). Pro Lauf wurde die Säule mit jeweils 500 µl Standardproteinlösung beladen. Nach 25 ml Elutionsvolumen wurde der Lauf beendet und die Säule mit einer neuen Proteinlösung beladen. Im Anschluss an die Referenzlösungen wurde die Säule mit RosC^{StrepN} mit einer Konzentration von 2,67 mg/ml beladen. Die Proteingröße von RosC^{StrepN} lässt sich durch Vergleich des RosC^{StrepN}-Elutionsvolumens mit den Elutionsvolumina der Standardproteine abschätzen.

4.3.5 High Performance Liquid Chromatography

Flavingemische aus Enzymtests oder Kulturüberständen von Streptomyceten wurden mit der Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) in einem Agilent 1260 Infinity System mit gekoppeltem 1260 Diodenarray-Detektor (DAD) und 1260 Fluoreszenz Detektor (FLD) analysiert.

4.3.5.1 Vorbereitung von HPLC-Proben

Stärkehaltige Proben wurden vor der HPLC-Analyse mittels α -Amylase für 10 min bei Raumtemperatur behandelt. Im Anschluss wurden alle Proben mit 5 % (w/v) Trichloressigsäure (*trichloroacetic acid*, TCA) versetzt. Nach einer Inkubation von 10 min bei 4 °C wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine 0,22 µm Membran aus regenerierter Cellulose in ein braunes HPLC Gefäß filtriert und direkt für die HPLC-Analyse eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

4.3.5.2 HPLC-Analyse von Flavingemischen

Eine auf 50 °C temperierte Umkehrphasen-Biphenyl-HPLC-Säule (2,6 µm Partikelgröße, 150 mm x 2,1 mm; Phenomenex, Aschaffenburg) wurde in 85 % Puffer A (10 mM Ameisensäure; 10 mM Ammoniumformiat; pH 3,7) und 15 % Puffer B (Methanol, LC-MS Reinheit) bei einer Flussrate von 0,1 ml/min equilibriert. Die Trennung von Flavingemischen erfolgte bei einer Flussrate von 0,2 ml/min.

Das verwendete Gradientenprofil ist in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30. Gradientenprofil für die HPLC-Analyse von Flavingemischen.

Gradientenschritt	Zeit / min	Puffer A / %	Puffer B / %
Gradient	0	85	15
	3	77	23
	3,1	73	27
	5	70	30
	6,5	68	32
	13,5	68	32
	20	5	95
Waschen	20,1	0	100
	24,1	0	100
	24,5	100	0
	29,5	100	0
Equilibrierung	30	85	15

Alle RF-Derivate (RF, RP und FAD) wurden mittels eines DAD-Detektors bei einer Wellenlänge von 445 nm, Intermediate der RoF-Synthese (AF und AFP) bei 480 nm und Roseoflavin-Derivate (RoF und RoRP) bei 503 nm analysiert. Zusätzlich wurden oben genannte Flavine, bis auf Roseoflavin-Derivate, mittels Fluoreszenz-Detektor (Exzitation bei 450 nm und Emission bei 525 nm; Tabelle 31) analysiert. Als Referenzen dienten Flavin-Standardlösungen. Zur Quantifizierung von Flavinen wurden Kalibrierkurven im Konzentrationsbereich 0,5 – 50 µM bei 10 µl Injektionsvolumen erstellt.

4.3.5.3 HPLC-Analyse von 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin

Die HPLC-DAD/FLD Methode zur Analyse von Flavingemischen aus 4.3.5 wurde für die Analyse von 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (LU) aus dem 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphatase-Enzymtest angepasst. Die Bildung von LU wurde mittels FLD bei einer Exzitation von 410 nm und Emission von 490 nm detektiert (Tabelle 31). Als Referenz diente eine LU-Standardlösung. Zur Quantifizierung wurde eine Kalibrierung im Konzentrationsbereich 0,5 – 20 µM mit 2 µl Injektionsvolumen durchgeführt. LU eluiert bei einer Retentionszeit von 4,6 min.

Tabelle 31 fasst alle analysierten Flavine, deren Retentionszeiten und Detektionsbedingungen zusammen.

Tabelle 31. Analysierte Flavine, deren Retentionszeiten und Detektionsbedingungen.

Flavin	Retentionszeit / min	Wellenlänge(n) DAD/FLD Detektor
LU	4,6	FLD (Ex 410 Em 490nm)
AF	8,3	DAD (480 nm) FLD (Ex 450 nm Em 525 nm)
AFP	10,2	DAD (480 nm) FLD (Ex 450 nm Em 525 nm)
FAD	12,6	DAD (445 nm) FLD (Ex 450 nm Em 525 nm)
RP	15,3	DAD (445 nm) FLD (Ex 450 nm Em 525 nm)
RF	21,3	DAD (445 nm) FLD (Ex 450 nm Em 525 nm)
RoRP	21,2	DAD (503 nm)
RoF	23,1	DAD (503 nm)

4.3.6 *In vitro* Enzymaktivitätstests

4.3.6.1 Gekoppelter *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest

AFP-Phosphataseaktivität verschiedener zellfreier Extrakte von Streptomycceten wurde in einem neu-entwickelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest analysiert. *S. davaonensis* besitzt das RoF-produzierende Enzym RosA. Das Reaktionsprodukt aus der Phosphatasereaktion AF könnte durch RosA direkt in RoF umgesetzt werden. Somit wäre ein Vergleich zwischen *S. davaonensis* und *S. coelicolor*, der kein vergleichbares Enzym besitzt, nicht eindeutig. Aus diesem Grund wurde das Substrat AFP in 1x Bis-Tris-Propan (BTP)-Puffer (100 µM BTP; 20 µM CaCl₂; pH 7,6), mit 0,4 mM SAM, 2,1 µM RosA und zellfreien Extrakten von Streptomycceten inkubiert. Nur bei erfolgreicher Hydrolyse der Phosphatgruppe von AFP durch Enzyme im Zellextrakt kann die Metabolisierung des entstandenen AF zu RoF durch das hinzugefügte Enzym RosA katalysiert werden. Die Metabolisierung von AFP zu RoF kann mittels HPLC-DAD bei einer Wellenlänge von 503 nm an einer Veränderung in der Retentionszeit und des Absorptionsspektrums beobachtet werden (Siehe Tabelle 31). Besitzt der zellfreie Extrakt keine AFP-Phosphataseaktivität wird eine konstante AFP-Konzentration und keine Veränderung des Absorptionsspektrums detektiert. Zellfreie Extrakte aus Streptomycceten wurden nach Kapitel 4.3.1.1 hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde

mittels Bradford Methode nach Kapitel 4.3.2 durchgeführt. In Tabelle 32 sind alle benötigten Komponenten für den gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest aufgelistet.

Tabelle 32. Ansatz eines gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests mit zellfreien Extrakten aus Streptomyceten.

Komponente	Konzentration
Bis-Tris-Propan	100 μ M
CaCl ₂	20 μ M
SAM	0,4 mM
AFP	30 μ M
Zellfreier Extrakt	0,3 μ g/ μ l
RosA _{His6} , gereinigt	2,1 μ M

Alle Komponenten, bis auf den zellfreien Extrakt, wurden in einem braunen Reaktionsgefäß vereinigt und 5 min auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Die Zugabe des zellfreien Extraktes startete die Reaktion. Nach 0, 20 und 60 min wurden Proben für die HPLC-Analyse entnommen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA abgestoppt und weiter zur HPLC-Analyse nach Kapitel 4.3.5.1 vorbereitet.

4.3.6.2 *In vitro* Phosphatase-Enzymtest

Ein *in vitro* Phosphatase-Enzymtest von gereinigtem RosC (oder RosC^{StrepN}) und von zellfreien Extrakten verschiedener *S. davaonensis*-Stämme wurde in 1x BTP-Puffer mit variierenden Substraten (AFP, GTP, RoRP und RP) durchgeführt. Da alle untersuchten Stämme ein intaktes *rosA* Gen enthielten, wurde auf die Zugabe von RosA in diesem Enzymtest verzichtet (Abbildung 5). In Tabelle 33 ist der Ansatz eines *in vitro* Phosphatase-Enzymtests gelistet.

Tabelle 33. Ansatz des *in vitro* Phosphataseaktivitätsenzymtests mit gereinigten Enzymlösungen oder zellfreien Extrakten verschiedener *S. davaonensis* Stämme.

Komponente	Konzentration
Bis-Tris-Propan	100 μ M
CaCl ₂	20 μ M
Substrat	5 – 1000 μ M
Zellfreier Extrakt oder gereinigte Enzymlösung	0,3 μ g/ μ l 0,6 – 2,4 μ M

Alle Komponenten, bis auf die gereinigte Enzymlösung oder den zellfreien Extrakt, wurden in einem braunen Reaktionsgefäß vereinigt und 5 min auf eine Temperatur von 37 °C erwärmt. Die Zugabe der Enzymlösung oder des zellfreien Extraktes startete die Reaktion. Der

Reaktionsverlauf wurde überwacht, durch Probennahme an unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Reaktion wurde, abhängig von der Detektionsmethode, entweder durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA oder 1 ml Biomol Green Reagenz abgestoppt (siehe Kapitel 4.3.6.5). Die Reaktionsprodukte AF, RoF und RF wurden mittels HPLC-DAD/FLD nach Kapitel 4.3.5.2 detektiert. Freies Phosphat durch die Hydrolyse von GTP und RP wurde mittels kolorimetrischer Phosphatquantifizierung nach Kapitel 4.3.6.5 gemessen.

4.3.6.3 Bestimmung des Reaktionsverlaufes und der kinetischen Konstanten der Dephosphorylierungsreaktion

Für die Bestimmung des Reaktionsverlaufes und der kinetischen Konstanten der AFP-Dephosphorylierungsreaktion und der RP-Hydrolase-Aktivität wurde der *in vitro* Phosphatase-Enzymtest mit variierenden AFP- und RP-Konzentrationen und 0,6 μM gereinigtem RosC^{StrepN} durchgeführt (siehe Tabelle 33). Im linearen Bereich der AF- bzw. RF-Bildung ist die Änderung der Substratkonzentration $\Delta[S]$ bzw. der Produktkonzentration $\Delta[P]$ proportional zur Zeitänderung Δt . Bei der Berechnung der initialen Reaktionsrate V_i wird zusätzlich die eingesetzte Enzymkonzentration $[E]$ berücksichtigt (Formel 3):

$$v_i = \frac{\Delta[S]}{\Delta t * [E]} = \frac{\Delta[P]}{\Delta t * [E]} \quad (3)$$

Die initialen Reaktionsraten V_i wurden nach Formel 3 berechnet und gegen die eingesetzte AFP- bzw. RP-Konzentration aufgetragen. Anschließend wurde eine nichtlineare Regression, angepasst an die Michaelis-Menten Kinetik (Michaelis & Menten, 1913; Michaelis *et al.*, 2011), mit der Software OriginPro (Version 9), auf Basis des Levenberg-Marquardt-Algorithmus, durchgeführt (Marquardt, 1963; Levenberg, 1944). Die kinetischen Konstanten K_M und V_{\max} wurden anhand der Formel für die Michaelis-Menten Kinetik (Formel 4) bestimmt:

$$v_i = \frac{v_{\max} * [S]}{K_M + [S]} \quad (4)$$

Die Konstante V_{\max} gibt die maximale Reaktionsrate der Dephosphorylierungsreaktion in $\mu\text{mol} * \text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1}$ Protein an. Die Michaelis-Menten Konstante K_M entspricht derjenigen Substratkonzentration in μM , bei der die initiale Reaktionsrate V_i halbmaximal ist. Anhand beider Konstanten kann die Affinität eines Enzym-Substrat-Komplexes beurteilt werden. Außerdem ist es möglich, Enzyme anhand dieser Parameter untereinander zu vergleichen.

4.3.6.4 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphatase-Enzymtest

Der 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphatase-Enzymtest wurde nach der Methode von Sarge *et al.* (2015) mit der Positivkontrolle YcsE aus *B. subtilis* durchgeführt (Sarge *et al.*, 2015). In einem finalen Volumen von 50 µl Tris-DTT-Puffer (50 mM Tris-HCl; 30 mM KCl; 5 mM mgCl₂; 1 mM DTT; pH 8,0) wurden alle Komponenten aus Tabelle 34 in einem braunen Reaktionsgefäß vereinigt und bei 23 °C für 10 min inkubiert.

Tabelle 34. Ansatz des 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*,3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphatase-Enzymtests nach Sarge *et al.* (2015).

Komponente	Konzentration
Tris	50 mM
DTT	1 mM
KCl	30 mM
MgCl ₂	5 mM
3,4-Dihydroxy-2-Butanon 4-Phosphat	200 µM
Rekombinante Lumazin-Synthase aus <i>B. subtilis</i>	5 µM
Potentielle Hydrolase	0,5 µM
5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)- Pyrimidindion-5'-Phosphat	100 µM

Nach der Zugabe von EDTA auf eine finale Konzentration von 20 mM wurde der Ansatz weitere 20 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA beendet und die Proben für die HPLC-Analyse vorbereitet. Das Reaktionsprodukt 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin wurde mittels HPLC-FLD detektiert (siehe Kapitel 4.3.5.3).

4.3.6.5 Kolorimetrische Phosphatdetektion

Die Bildung von freiem Phosphat aus Phosphatase-Enzymtests wurde mithilfe des Biomol Green Phosphat-Detektions-Kits (Enzo Lifesciences) nach Angaben des Herstellers quantifiziert. Als Referenz diente eine PO₄-Standardkurve im Konzentrationsbereich von 0,5 bis 8 nM. Zum Beenden der Reaktion wurden 100 µl Aliquote aus Enzymtests (Kapitel 4.3.6.2) direkt mit 1 ml des Biomol Green Reagenzes versetzt. Nach einer Inkubation von 25 min wurde die Entwicklung der grünen Farbe im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 620 nm gemessen.

5 Ergebnisse

5.1 AFP-Phosphataseaktivität in zellfreien Extrakten von Streptomycceten

Für die Identifikation einer AFP-spezifischen Phosphatase wurden zellfreie Extrakte (*cell-free extract*, CFE) verschiedener Streptomycceten in einem neuen, gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest analysiert. Eine spezifische AFP-Phosphataseaktivität wurde untersucht, indem die RoF-Produzenten *S. davaonensis* JCM 4913 und *S. cinnabarinus* DSM 40467 mit *S. coelicolor* M1152 (kein RoF-Produzent) verglichen wurden. Zusätzlich wurde der rekombinante Stamm *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb, mit einem integrierten 106 kb subchromosomalen Fragment aus *S. davaonensis*, auf die Anwesenheit einer spezifischen AFP-Phosphatase getestet.

Streptomycceten wurden in YS-Medium kultiviert und durch eine French Press aufgeschlossen. In einem gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest wurden 25 μ M AFP mit 0,3 μ g Gesamtprotein pro μ l CFE, 0,4 mM SAM und 2,1 μ M gereinigten RosA-His₆ bei 37 °C inkubiert (siehe Kapitel 4.3.6.1). Das Reaktionsschema des *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest ist in Abbildung 5 dargestellt.

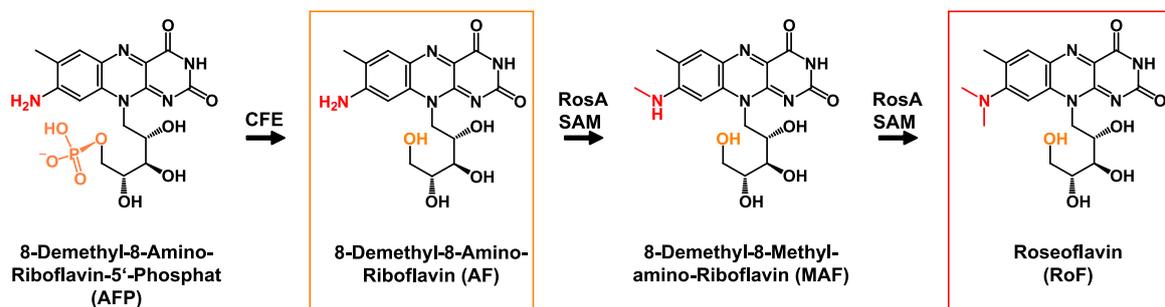


Abbildung 5. Schema des gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests. AFP wurde mit zellfreien Extrakten (*cell-free extract*, CFE) von Streptomycceten, S-Adosylmethionin (SAM) und RosA inkubiert. Das Produkt der gesuchten Phosphatase ist AF (durch eine orange Box hervorgehoben), welches von RosA zu RoF (durch eine rote Box hervorgehoben) metabolisiert wird.

Für die Analyse der Reaktionsgemische wurden Proben direkt nach Mischen des Reaktionsansatzes (0 min), nach 20 min und 60 min entnommen und mit der HPLC-DAD bei $\lambda = 503$ nm (Absorptionsmaximum von RoF) analysiert. Das Enzym RosA akzeptiert als Substrat nur die unphosphorylierte Variante von AFP (Jankowitsch *et al.*, 2011). Aus diesem Grund hängt die RoF-Bildung in diesem Enzymtest von einer Phosphatase im CFE von Streptomycceten ab, welche AFP zu AF konvertieren kann. Abbildung 6 zeigt die HPLC-DAD Chromatogramme des gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests der Stämme *S. coelicolor* M1152, *S. davaonensis*, *S. cinnabarinus* und *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb.

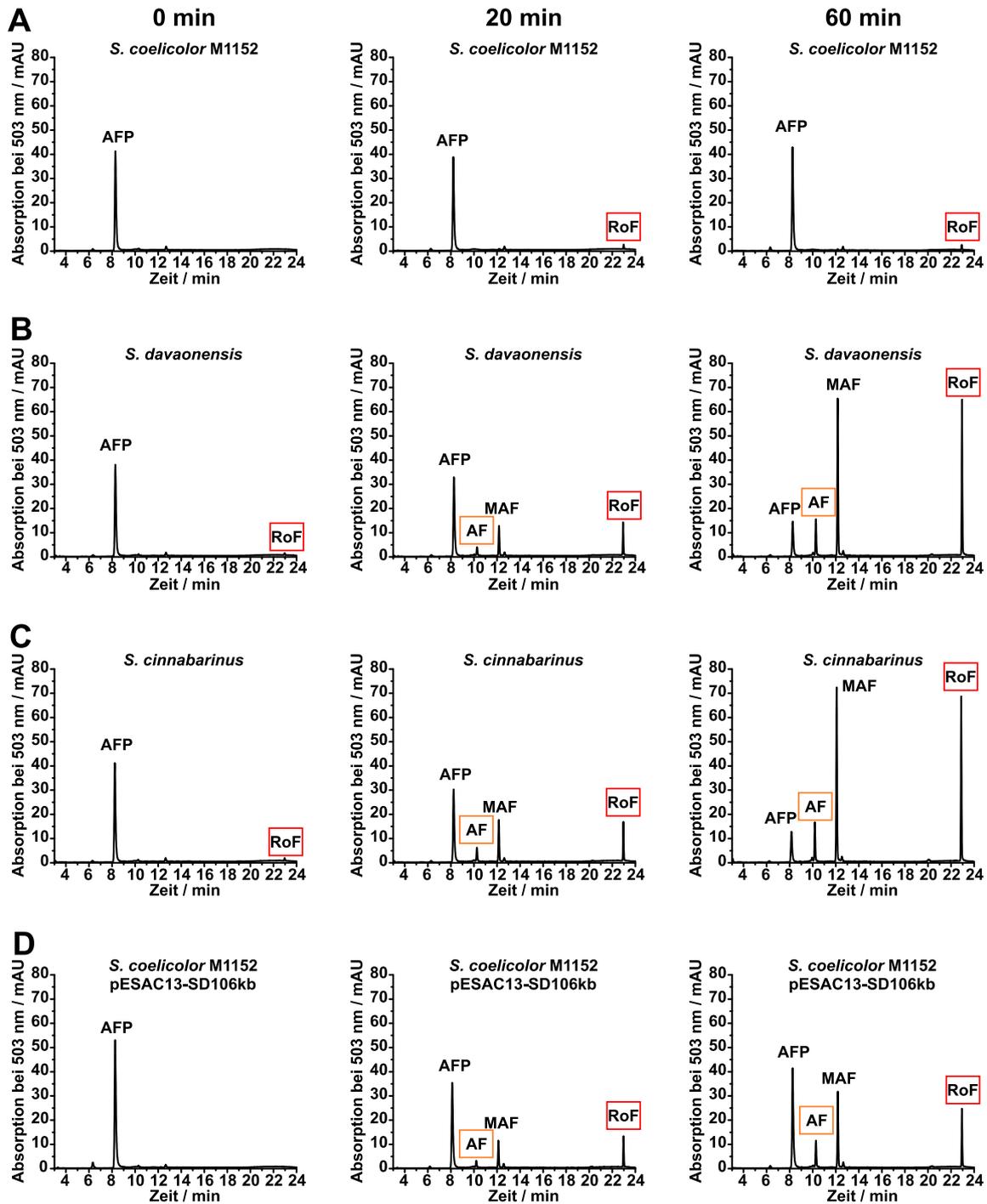


Abbildung 6. HPLC-DAD Chromatogramme des gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests der Stämme *S. coelicolor* M1152 (A), *S. davaonensis* (B), *S. cinnabarinus* (C) und *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb (D) nach 0, 20 und 60 min Reaktionszeit. Als AFP-Phosphataseaktivität wird die Bildung von Roseoflavin (RoF; rot hervorgehoben) über die Reaktionsintermediate 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin (AF) und 8-Demethyl-8-Methylamino-Riboflavin (MAF) bezeichnet. Das Reaktionsprodukt der Phosphatasereaktion AF, ausgehend von 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat (AFP), ist orange hervorgehoben. Peaks bei $t = 6,2$ min und $t = 12,5$ min kommen in allen Proben vor; die Metabolite sind nicht bekannt. Im Vergleich zu *S. coelicolor* M1152 (A) konnte eine *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität in dem rekombinanten Stamm *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb (D) detektiert werden, ähnlich zu *S. davaonensis* (B) und *S. cinnabarinus* (C).

Als AFP-Phosphataseaktivität wird die Bildung von RoF über die Reaktionsintermediate AF und MAF bezeichnet. Zellfreie Extrakte von *S. coelicolor* M1152 wiesen keine Phosphataseaktivität auf. Das Substrat AFP ($t = 8,3$ min) wurde im *in vitro* Phosphatase-Enzymtest über 60 min nicht dephosphoryliert. In *S. coelicolor* M1152 gibt es folglich keine Phosphatase, die AFP unspezifisch oder spezifisch innerhalb von 60 min Reaktionszeit effizient umsetzen kann. Ein minimaler RoF-Peak ($t = 23,1$ min) nach 60 min Reaktionszeit kann das Resultat von Spuren von AF im Substrat sein, welches von RosA zu RoF metabolisiert werden konnte, oder von unspezifischen Phosphatasen im CFE von *S. coelicolor* M1152 (Abbildung 6 A). Die beiden RoF-Produzenten *S. davaonensis* Wildtyp (Abbildung 6 B) und *S. cinnabarinus* Wildtyp (Abbildung 6 C) zeigten eine AFP-Phosphataseaktivität in den zellfreien Extrakten. Die Dephosphorylierung des Substrates AFP und Bildung des Produktes RoF über die Intermediate AF ($t = 10,2$ min) und MAF ($t = 12,2$ min) wurden detektiert. Die beiden Organismen besitzen also eine bislang unbekannte, spezifische AFP-Phosphatase, im Gegensatz zu der Negativkontrolle *S. coelicolor* M1152. Ein kleiner RoF-Peak bei 0 min Reaktionszeit in *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* ist auf intrazelluläres RoF zurückzuführen, das während der stationären Wachstumsphase produziert wird. Bei einem rekombinanten *S. coelicolor* M1152 Stamm pESAC13-SD106kb konnte eine AFP-Phosphataseaktivität nachgewiesen werden (Abbildung 6 D). Im Gegensatz zum Kontrollorganismus *S. coelicolor* M1152, ähnelt das Reaktionsmuster von *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb dem Muster von *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus*. AFP konnte von einer Phosphatase, dessen Gen vermutlich auf pESAC13-SD106kb lokalisiert ist, zu AF dephosphoryliert werden. Das Reaktionsprodukt der Phosphatasereaktion konnte im Anschluss durch das zugesetzte Enzym RosA über MAF zu RoF metabolisiert werden. Unterschiede im Reaktionsmuster des rekombinanten *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb, im Vergleich zu den RoF-Produzenten, kann an den *S. davaonensis* Promotoren liegen, welche auf pESAC13-SD106kb liegen und in *S. coelicolor* M1152 vermutlich nicht vollständig aktiv sind. Die gesuchte AFP-Phosphatase von *S. davaonensis* befindet sich folglich auf pESAC13-SD106kb und ist spezifisch für die RoF-Produzenten *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* (Abbildung 6).

Der rekombinante Stamm *S. coelicolor* M1152 pESAC13-SD106kb exprimiert ein 106 kb Fragment aus *S. davaonensis*, das alle notwendigen Gene (einschließlich dem AFP-Phosphatasegen) für die heterologe RoF-Produktion in *S. coelicolor* M1152 enthält (Abbildung 7). Die beiden bekannten RoF-Gene *rosA* und *rosB* sind in Gencluster angeordnet, die sich in einem 48 kb Abstand zueinander befinden. Aufgrund der räumlichen Nähe zu den beiden bekannten RoF-Genen, wurden die Regionen um beide Gene *rosA* und *rosB* auf das Vorhandensein eines Phosphatasegens untersucht. Zwei *S. davaonensis* Stämme mit einer Deletion im *rosA*-Cluster (*S. davaonensis* Δ clus_rosA) oder im *rosB*-Cluster (*S. davaonensis*

Apramycinresistenzkassette anstelle des jeweiligen Gen-Clusters. Wie in Abbildung 6 wird die Bildung von RoF über die Reaktionsintermediate AF und MAF als AFP-Phosphataseaktivität bezeichnet. Die AFP-Phosphataseaktivität eines *S. davaonensis* Stammes mit einer Deletion im *rosB*-Cluster ($\Delta\text{clus_rosB}$; BN159_7985-7990; Abbildung 7 A) wurde nicht beeinflusst (Abbildung 7 B). Das Reaktionsmuster gleicht dem Muster von *S. davaonensis* Wildtyp (Abbildung 6 B). Die Dephosphorylierung des Substrates AFP ($t = 8,3$ min) und Bildung des Produktes RoF ($t = 23,1$ min) über die Intermediate AF ($t = 10,2$ min) und MAF ($t = 12,2$ min) konnten detektiert werden. Das gesuchte Phosphatasegen befindet sich folglich nicht innerhalb des *rosB*-Clusters. Die Deletion des *rosA*-Clusters ($\Delta\text{clus_rosA}$; BN159_8026-8035; Abbildung 7 A) in *S. davaonensis* führte hingegen zu einem Stamm mit einer erheblich reduzierten *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität (Abbildung 7 C). Es wurden nur Spuren von RoF, aber kein Abbau des AFP-Peaks, über 60 min Reaktionszeit beobachtet, vergleichbar zum Kontrollorganismus *S. coelicolor* M1152 (Abbildung 6 A). Das Auftreten eines minimalen RoF-Peaks weist auf die Anwesenheit einer möglicherweise weiteren (un-)spezifischen Phosphatase im zellfreien Extrakt von *S. davaonensis* hin. Wahrscheinlich befindet sich die AFP-Phosphatase innerhalb des *rosA*-Clusters in *S. davaonensis*. Genprodukte des *rosA*-Clusters wurden mithilfe des *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Altschul *et al.*, 1990) und der Datenbank Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG) analysiert (Tabelle 35).

Tabelle 35. Hypothetische Genprodukte aus BLASTp-Analysen und Einträge in der Datenbank Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG) der Gene des *rosA*-Clusters (BN159_8026-8035) von *S. davaonensis*.

Gen	Hypothetisches Genprodukt	KEGG-Datenbank
BN159_8026	Radikalisches SAM-Protein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662730.1)	Hypothetisches Protein
BN159_8027	B12-Bindedomäne-enthaltendes SAM-Protein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662731.1)	Anaerobe Magnesium-Protoporphyrin IX Monomethylesterase (EC:1.2.1.98.3)
BN159_8028	AMP-Bindeprotein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662732.1)	Fettsäure-Synthase (EC:6.2.1.-)
BN159_8029	78,9 % Ähnlichkeit zu Acyl-Carrier Protein aus <i>Streptomyces</i> Spezies TR1341 (WP_162133422.1)	Acyl-Carrier-Protein
BN159_8030	3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein] Synthase 2-ähnliches Protein aus <i>S. davaonensis</i> (CCK32408.1)	3-Oxoacyl-[Acyl-Carrier-Protein] Synthase II (EC:2.3.1.179)
BN159_8031	Paal Familie Thioesterase aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662735.1)	Hypothetisches Protein

BN159_8032	<i>N,N</i> -8-amino-8-demethyl-D-Riboflavin Dimethyltransferase <i>RosA</i> aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662736.1)	8-Amino-8-Demethylriboflavin N,N-Dimethyltransferase (EC:2.1.1.343)
BN159_8033	Histidin-Phosphatase-Familie Protein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662737.1)	2,3-Bisphosphoglycerat- abhängige Phosphoglycerat- mutase (EC:5.4.2.11)
BN159_8034	Phytanoyl-CoA-Dioxygenase- Familie Protein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662738.1)	Ectoin Hydroxylase (EC:1.14.11.55)
BN159_8035	SRPBCC Domäne-enhaltenes- Protein aus <i>S. davaonensis</i> (WP_015662739.1)	Hypothetisches Protein

Das *rosA*-Cluster beinhaltet 10 Gene mit unterschiedlichen hypothetischen Genprodukten (Tabelle 35). Anhand der Bezeichnung in der KEGG-Datenbank und einer automatischen Annotation im *S. davaonensis* Genom, konnte ein Phosphatase-Kandidatengen, BN159_8033, identifiziert werden. Sein Genprodukt zeigt in der BLASTp-Analyse große Ähnlichkeiten zu der Histidin-Phosphatase-Familie und ist in der KEGG-Datenbank als 2,3-Bisphosphoglycerat-abhängige Phosphoglyceratmutase (EC:5.4.2.11) annotiert. Weitere Gene innerhalb des *rosA*-Clusters besitzen keine Ähnlichkeit zu Phosphatasen (Tabelle 35).

5.2 Deletion und Expression von BN159_8033 in *S. davaonensis*

Die Funktion des Genproduktes von BN159_8033 in *S. davaonensis* wurde durch Deletion des Genes in *S. davaonensis* (*S. davaonensis* Δ BN159_8033) untersucht. Das Gen BN159_8033 wurde aus dem *S. davaonensis* Genom mithilfe der PCR-Targeting-Methode deletiert (Gust *et al.*, 2003). Eine *S. davaonensis* Fosmid-Genbank aus 1920 Fosmid-Klonen in insgesamt 20 Mikrotiterplatten (96-Well) wurde mit dem CopyControl Fosmid Library Production Kit (Epicentre, Madison, Wisconsin) aus hochmolekularer chromosomaler *S. davaonensis* DNA hergestellt. Anschließend wurde ein Fosmid, welches einen 40 kb Bereich um BN159_8033 trägt, schrittweise innerhalb der Fosmid-Genbank durch Kolonie-PCR identifiziert (siehe Kapitel 4.2.8). Das Fosmid, welches das Gen BN159_8033 beinhaltet, konnte in dem *E. coli* EPI 300 Klon 4D7 lokalisiert werden (Platte 4, Klon D7) und wurde dementsprechend pCC1FOS_8033 genannt. Insgesamt wurden drei unabhängige Deletionsstämme von BN159_8033 in *S. davaonensis* (*S. davaonensis* Δ BN159_8033, Klone D1 – D3) untersucht. Für die Konstruktion von Komplementations- und Überexpressionsstämmen wurde das Gen BN159_8033 aus *S. davaonensis* über den integrativen Expressionsvektor pSET152_ermE in das *S. davaonensis* Genom integriert (siehe Kapitel 4.2.9). Insgesamt wurden drei

unabhängige *S. davaonensis* Komplementationsstämme (*S. davaonensis* Δ BN159_8033 pSET152_ermE <8033>, Klone K1 – K3) und ein *S. davaonensis* Überexpressionsstamm (*S. davaonensis* pSET152_ermE <8033>) untersucht.

5.2.1 Untersuchung des Wachstums und der Roseoflavin-Produktion

Die Stämme *S. davaonensis* Δ BN159_8033 (Klone D1 – D3), *S. davaonensis* Δ BN159_8033 pSET152_ermE <8033> (Klone K1 – K3) und *S. davaonensis* pSET152_ermE <8033> (Ü) wurden parallel mit *S. davaonensis* Wildtyp (WT) in YS-Medium kultiviert. Zur Beurteilung der *in vivo* Einflüsse von Deletion, Komplementation und Überexpression von BN159_8033 wurde das Wachstum der Stämme durch Bestimmung der Trockenmasse aus 5 ml Kulturvolumen überprüft (Kapitel 4.1.2.2) und RoF-Levels mittels HPLC-DAD-Analyse bei $\lambda = 503$ nm quantifiziert (Kapitel 4.3.5.2). Ermittelte RoF-Konzentrationen wurden auf die Trockenmasse (TM) normalisiert und die errechneten RoF-Produktionsraten sind in Abbildung 8 dargestellt.

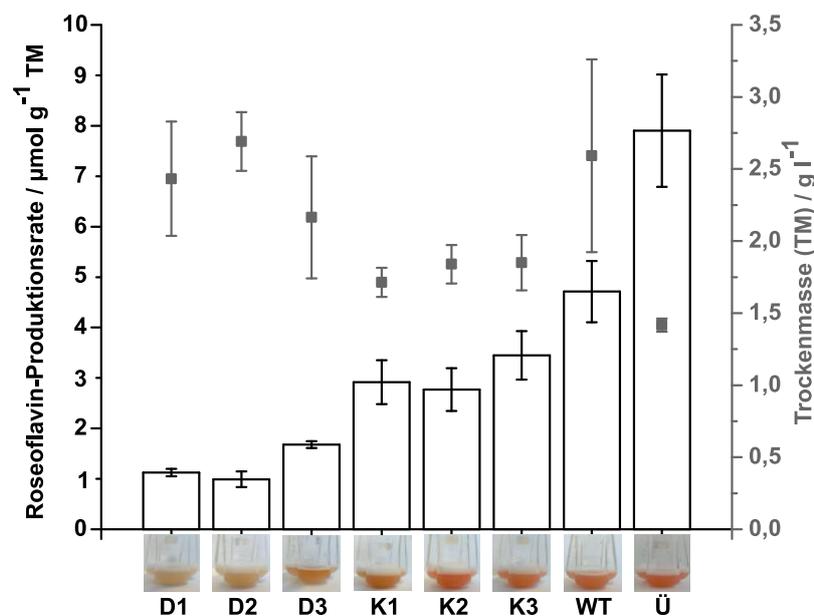


Abbildung 8. Roseoflavin-Produktionsraten in *S. davaonensis* BN159_8033 Deletions-, Komplementations- und Überexpressionsstämmen, im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp. Bilder unten: Erlenmeyerkolben der *S. davaonensis* BN159_8033 Deletionsstämme D1 – D3, *S. davaonensis* Komplementationsstämme K1 – K3, *S. davaonensis* Wildtyp (WT) und *S. davaonensis* BN159_8033 Überexpressionsstamm (Ü) nach 7 Tage Inkubation in YS-Medium. Grafik: Die Balken repräsentieren Roseoflavin-Produktionsraten in $\mu\text{mol g}^{-1} \text{TM} \pm \text{SD}$ ($n = 3$). Die Punkte (■) repräsentieren ermittelte Trockenmassen (TM) in $\text{g l}^{-1} \pm \text{SD}$ ($n = 6$).

Eine Deletion von BN159_8033 in *S. davaonensis* führte zu Stämmen D1 – D3, die durchschnittlich circa 70 % geringere RoF-Produktionsraten ($0,99 - 1,68 \mu\text{mol RoF pro g TM}$) aufwiesen, im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp ($4,71 \mu\text{mol pro g TM}$). Die Deletion von BN159_8033 beeinträchtigte nicht das Wachstum der Stämme. BN159_8033 Komplementationsstämme K1 – K3 zeigten eine erhöhte RoF-Produktionsrate

(2,77 – 3,45 $\mu\text{mol RoF pro g TM}$) im Vergleich zu den Deletionsstämmen. Die Produktionsrate der Komplementationsstämme K1 – K3 war jedoch nicht auf dem Niveau der Produktionsrate von *S. davaonensis* Wildtyp. Diese Unterschiede können durch unterschiedlich ausgeprägte Genexpressionslevels zwischen dem nativen Promoter am 5'-Ende von BN159_8033 von *S. davaonensis* und dem konstitutiven permE-Promoter aus pSET152 erklärbar sein. Eine Überexpression des Gens BN159_8033 in *S. davaonensis* führt zu gesteigerten RoF-Produktionsraten (7,90 $\mu\text{mol RoF pro g TM}$). Eine intensivere Rotfärbung des Überstandes im Vergleich zu *S. davaonensis* WT konnte nicht festgestellt werden. Die insgesamt gemessene RoF-Konzentration des Überexpressionsstammes (11,19 $\mu\text{M RoF}$) ist im Vergleich zum WT (11,95 $\mu\text{M RoF}$) nicht erhöht. Die gesteigerte RoF-Produktionsrate des Überexpressionsstammes ist deshalb das Resultat eines verringerten Wachstums des Stammes bei konstanter RoF-Konzentration.

Stämme mit einer Integration des pSET152_ermE Vektors zeigten in diesem Experiment stetig ein geringeres Wachstum (Komplementation 1,71 – 1,85 g TM pro l; Überexpression 1,42 g TM pro l) im Vergleich zum Wildtyp-Stamm (2,59 g TM pro l) oder zu den Deletionsstämmen (2,16 – 2,69 g TM pro l). Durch die Verwendung eines konstitutiven Promoters permE wurde das Gen BN159_8033 wahrscheinlich bereits in der exponentiellen Wachstumsphase exprimiert. Möglicherweise beeinträchtigt die Phosphatase-Produktion in der exponentiellen Phase das Wachstum der rekombinanten *S. davaonensis* Stämme. Die *in vivo* RoF-Produktionsraten der *S. davaonensis* Deletions-, Komplementations- und Überexpressionsstämme weisen auf eine Funktion des Genproduktes von BN159_8033 im RoF-Stoffwechsel hin.

5.2.2 Bestimmung der *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität

S. davaonensis Stämme (Wildtyp, Deletion, Komplementation und Überexpression von BN159_8033) wurden in einem *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest untersucht. Streptomyceten wurden in YS-Medium kultiviert und mit einer French Press aufgeschlossen. Für *in vitro* Phosphatase Enzymtests wurden 25 μM AFP mit 0,3 μg Gesamtprotein pro μl CFE bei 37 °C inkubiert (Kapitel 4.3.6.2). Anders, als in dem gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest (Kapitel 5.1), wurde in diesem Experiment AF, das Reaktionsprodukt der Phosphatase, direkt mithilfe der HPLC-DAD bei $\lambda = 480 \text{ nm}$ (Absorptionsspektrum von AF) gemessen. Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse des *in vitro* AFP-Phosphataseaktivitätstests mit zellfreien Extrakten unterschiedlicher *S. davaonensis* Stämme (Wildtyp-Stamm, Deletionsstämme, Komplementationsstämme und Überexpressionsstamm).

Eine AFP-Phosphataseaktivität in den zellfreien Extrakten äußert sich in dem Abbau des Substrates AFP und dem Aufbau des Produktes AF. Ist keine AFP-Phosphataseaktivität in den

zellfreien Extrakten vorhanden, bleibt die Konzentration des Substrates AFP konstant (Abbildung 9).

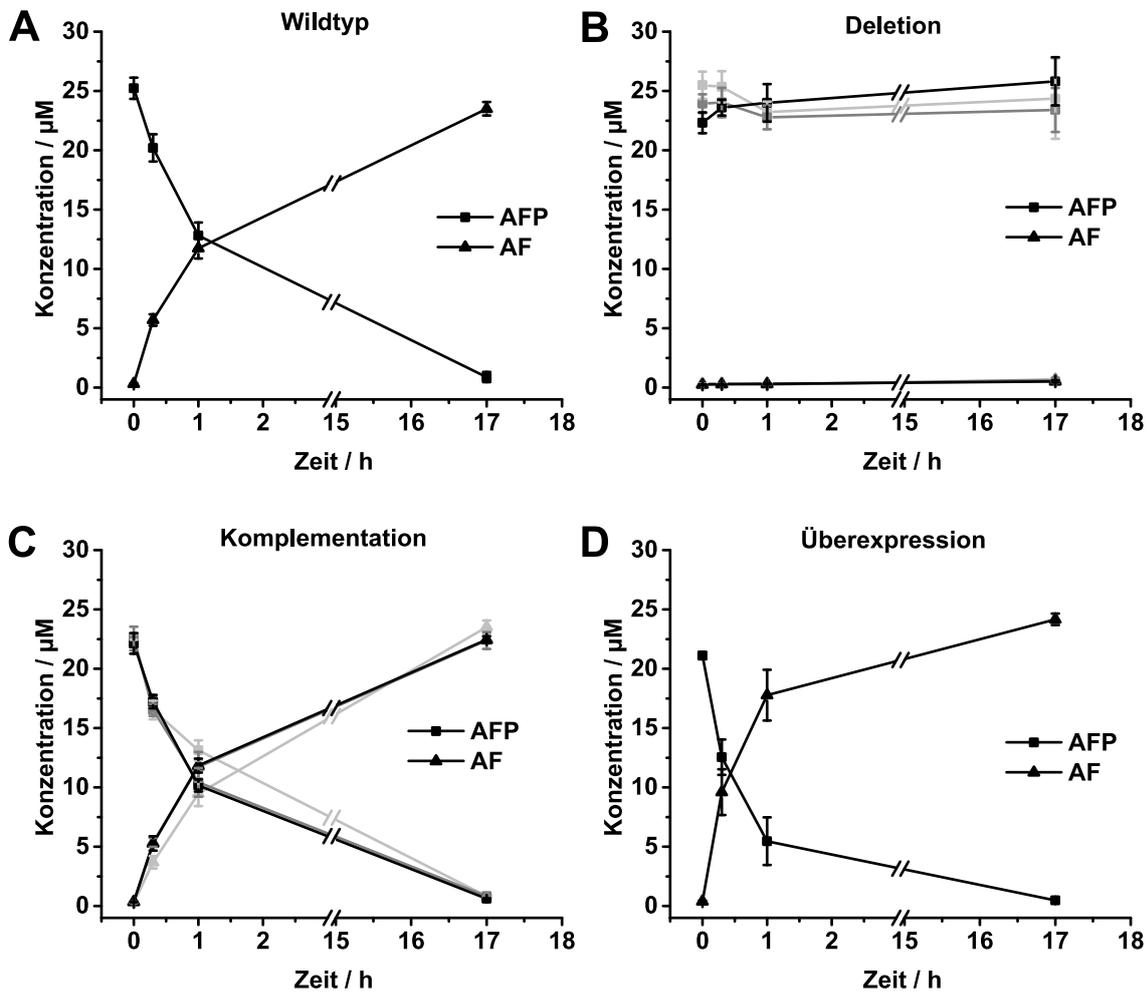


Abbildung 9. *In vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest mit zellfreien Extrakten von *S. davaonensis* Wildtyp (A), *S. davaonensis* BN159_8033 Deletionsstämmen (B), *S. davaonensis* BN159_8033 Komplementationsstämmen (C) und *S. davaonensis* BN159_8033 Überexpressionsstamm (D). AFP (■) und AF (▲) Konzentrationen in µM ± SD (n = 3) über 17 Stunden Reaktionszeit. Für eine verbesserte Darstellung wurde die Zeit-Achse zwischen 3 und 15 h unterbrochen. Im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp (A) führte eine Deletion von BN159_8033 (B) zum Verlust der *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität, die durch die Komplementation durch BN159_8033 (C) wiederhergestellt werden konnte. Eine BN159_8033 Überexpression (D) führte zu einer gesteigerten *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität in *S. davaonensis*.

In einem *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest konnte, wie bereits in Abbildung 6 in Kapitel 5.1, eine AFP-Phosphataseaktivität in zellfreien Extrakten von *S. davaonensis* Wildtyp festgestellt werden. Während Konzentrationen des Substrates AFP mit der Zeit sanken, konnte ein Anstieg des Produktes AF, proportional zum AFP-Abbau, detektiert werden. Nach 17 Stunden Reaktionszeit wurde AFP nahezu vollständig zu AF umgesetzt (bis 0,9 µM Endkonzentration AFP und 23,5 µM AF; Abbildung 9 A). Die Deletion von BN159_8033 in *S. davaonensis* führte in allen drei Deletionsstämmen zum Verlust der *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität. Konstante Konzentrationen von AFP (23,4 – 25,8 µM) und AF

(0,51 – 0,65 μM) wurden detektiert (Abbildung 9 B). Das Gen BN159_8033 steht offenbar in Verbindung mit der AFP-Phosphataseaktivität. Eine Komplementation von BN159_8033 führt zu wildtyp-ähnlichen AFP-Phosphataseaktivitäten *in vitro*. In zellfreien Extrakten der BN159_8033 Komplementationsstämme konnte ein Abbau des Substrates AFP (bis zu 0,6 μM Endkonzentration) und eine Bildung von AF (bis zu 23,4 μM Endkonzentration) detektiert werden (Abbildung 9 C). Die AFP-Phosphataseaktivität wurde durch Integration von BN159_8033 in *S. davaonensis* Δ BN159_8033 wiederhergestellt. Eine Überexpression von BN159_8033 in *S. davaonensis* führte zu einer erhöhten *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität, im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp. Während im Ansatz mit zellfreien Extrakten von *S. davaonensis* Wildtyp beispielsweise nach 60-minütiger Reaktionszeit noch 12,8 μM des eingesetzten AFP (und 11,7 μM AF) vorhanden war (Abbildung 9 A), konnten zum gleichen Messzeitpunkt im BN159_8033 Überexpressionsstamm nur noch 5,5 μM AFP detektiert werden (und 17,8 μM AF, Abbildung 9 D). Diese gesteigerte *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität führte *in vivo* zu einer gesteigerten RoF-Produktionsrate in *S. davaonensis* (siehe Abbildung 8).

Das Genprodukt von BN159_8033 ist die gesuchte AFP-Phosphatase in *S. davaonensis*. Da es sich um das dritte entdeckte Enzym der RoF-Biosynthese handelt, wird das Enzym RosC und sein korrespondierendes Gen *rosC* genannt.

5.3 Sequenzvergleiche und Klassifizierung von RosC

Neben *S. davaonensis* ist auch der nah verwandte Stamm *S. cinnabarinus* ein RoF-Produzent (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). In zellfreien Extrakten von *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* konnte eine AFP-Phosphataseaktivität festgestellt werden (Abbildung 6 in Kapitel 5.1) und vermutlich gibt es auch im *S. cinnabarinus* Genom ein Gen, welches für eine AFP-Phosphatase kodiert.

Um das dazugehörige Gen in *S. cinnabarinus* zu identifizieren, wurde die Nukleotidsequenz von *rosC* (BN159_8033) aus *S. davaonensis* in einer BLASTn-Analyse mit dem *S. cinnabarinus* Genom verglichen. Es konnte ein Treffer identifiziert werden: Das Gen SCIN_03070 von Nukleotid 657495 bis Nukleotid 658163 (Nukleotidsequenz siehe Kapitel 7) liegt auf dem komplementären Strang des *S. cinnabarinus* Chromosoms. Die Primärstrukturen der Genprodukte von BN159_8033 (*S. davaonensis*) und SCIN_03070 (*S. cinnabarinus*, Kapitel 7) wurden in einer BLASTp-Analyse verglichen. Beide detaillierten Sequenzvergleiche sind in Abbildung 26 in Kapitel 7 dargestellt. Das *rosC*-Homolog in *S. cinnabarinus* (SCIN_03070) und *rosC* aus *S. davaonensis* weisen eine hohe Ähnlichkeit auf (Abbildung 26). Somit sind alle vier RoF-Enzyme und ihre dazugehörigen Gene (inklusive das neuentdeckte Phosphatasegen) im nah verwandten RoF-Produzenten *S. cinnabarinus* zu finden.

Die Organisation der RoF-Gene im *S. cinnabarinus* Chromosom gleicht der Organisation in *S. davaonensis*. Das RoF-Biosynthesegen *rosB* (BN159_7989 bzw. SCIN_03320) ist nicht zusammen mit *rosA* (BN159_8032 bzw. SCIN_03075) und *rosC* (BN159_8033 bzw. SCIN_03070) in einer Gengruppe arrangiert, sondern befindet sich im *S. davaonensis* Chromosom circa 48 kb strangaufwärts von *rosA/rosC*. Das Gen für das bifunktionelle Enzym RibCF (BN159_2715 bzw. SCIN_29690) ist über 5 Mbp von *rosB* entfernt. Die RoF-Biosynthesegene von *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* und ihre Genprodukte besitzen eine hohe Sequenzähnlichkeit (Nukleotid- und Aminosäuresequenz) und die Organisation der Gene ist im *S. cinnabarinus* Genom ähnlich zu *S. davaonensis*. In Abbildung 10 sind alle RoF-Gene und ihre korrespondierenden Genprodukte aus *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* verglichen (Sequenzen aller RoF-Biosynthesegene und ihrer Genprodukte, siehe Kapitel 7).

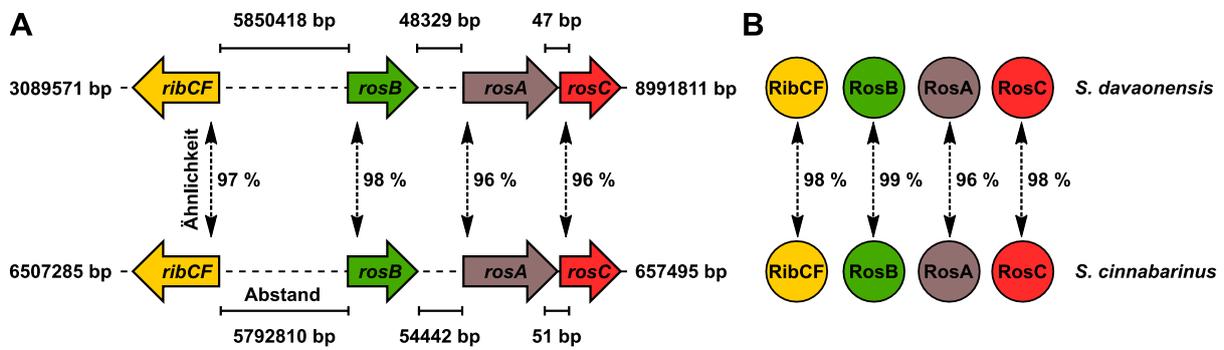


Abbildung 10. Vergleich der Roseoflavin-Biosynthesegene *ribCF*, *rosB*, *rosA* und *rosC* (A) und der Roseoflavin-Biosynthesenzyme RibCF, RosB, RosA und RosC (B) in den beiden Roseoflavin-Produzenten *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus*. Die Zahlen vor und nach den Roseoflavin-Biosynthesegenen geben die Lokalisierung im *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* Chromosom an. Die Abstände in bp zwischen den Genen sind aufgrund der großen Unterschiede nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Ähnlichkeiten auf dem Nukleotid-Level wurden durch eine BLASTn-Analyse und die Ähnlichkeiten auf dem Aminosäure-Level durch eine BLASTp-Analyse bestimmt und sind in % der totalen Sequenz angegeben.

Die Enzyme RibCF^{Scin} und RibCF^{Sdav} sind 98 % identisch auf dem Aminosäure-Level und 97 % identisch auf dem Nukleotid-Level; RosB^{Scin} und RosB^{Sdav} sind 99 % identisch auf dem Aminosäure-Level und 98 % identisch auf dem Nukleotid-Level; RosA^{Scin} und RosA^{Sdav} sind 96 % identisch auf dem Aminosäure-Level und 96 % identisch auf dem Nukleotid-Level. RosC^{Scin} und RosC^{Sdav} sind 98 % identisch auf dem Aminosäure-Level und 96 % auf dem Nukleotid-Level. RosC befindet sich, genau wie im *S. davaonensis*-Genom, auch im *S. cinnabarinus*-Genom direkt strangabwärts zum *rosA*-Analog (SCIN_3075) (Abbildung 10). Zur Klassifizierung des neuen Enzyms RosC wurde eine *in silico* Analyse der Primärstruktur von *S. davaonensis* RosC mithilfe des InterPro Tools des Europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie (EMBL) durchgeführt. InterPro kombiniert 13 Datenbanken unterschiedlicher Expertise, beispielsweise in der Klassifizierung von Protein-Domänen in Superfamilien, Identifizierung von Schlüssel-Aminosäuren im katalytischen Zentrum des Proteins oder in der Vorhersage von Signalpeptiden oder Transmembranregionen (Finn *et al.*,

2016; Mitchell *et al.*, 2018). Ein Sequenzvergleich der Primärstruktur von RosC mit einem Katalog an Phosphatasen innerhalb der InterPro-Datenbank lieferte eine Übereinstimmung mit Histidin-Phosphatasen, Bereich 1, für den Aminosäure-Bereich 28 – 210 von RosC. Die Aminosäuren 211 – 222 am C-Terminus und 1 – 27 am N-Terminus von RosC zeigten keine besonderen Übereinstimmungen mit bekannten Domänen und könnten unter anderem eine Rolle in der Ausbildung der Substratbindestelle spielen. In Abbildung 11 ist die RosC-Klassifizierung durch das InterPro Tool dargestellt.

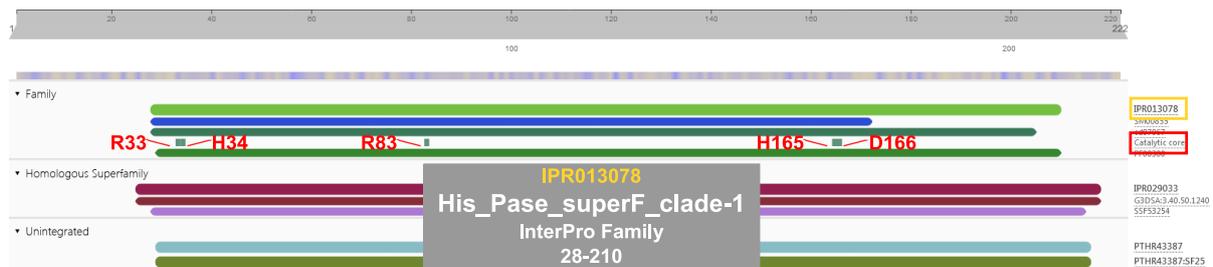


Abbildung 11. Ergebnisse der RosC-Klassifizierung durch das InterPro Tool des Europäischen Laboratoriums für Molekularbiologie (EMBL). Die Zahlen oben von 1 bis 222 beziehen sich auf die Primärstruktur von RosC. Im Bereich „Family“ ist die Übereinstimmung der Aminosäuren 28 – 210 mit bekannten Domänen von Histidin-Phosphatasen gezeigt (HIS_Pase_superF_clade-1, 28 – 210; grauer Kasten). Unter dem Bereich “Catalytic Core“ (hervorgehoben in einer roten Box) sind Aminosäurereste angegeben, die als katalytische Zentrum auf Basis der Datenbank CDD (Lu *et al.*, 2020) ermittelt wurden (rot; R33, H34, R83, H165 und D166).

Zusätzlich zur Klassifizierung als Histidin-Phosphatase wurden die Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 auf Basis der Datenbank CDD (*conserved domain database*) (Lu *et al.*, 2020) als Teil des katalytischen Zentrums identifiziert (Abbildung 11). Mutagenese-Studien und Strukturanalysen können im Folgenden die Bedeutung der identifizierten Aminosäuren für die katalytische Aktivität von RosC untermauern.

Die Analyse der Primärstruktur von RosC mithilfe des BLASTp-Programmes identifizierten Proteine mit geringen Ähnlichkeiten zu RosC. Aminosäuresequenzen repräsentativer Phosphatasen aus *E. coli* (die Phosphoglyceratmutase GpmB und die Phosphohistidin-Phosphatase SixA), *B. subtilis* (ein Histidin-Phosphatase-Protein) und *Streptomyces*-Spezies (ein Histidin-Phosphatase-Protein aus *Streptomyces nodosus* und ein putatives Multi-Spezies Phosphomutase-Protein MSMEG_4193 aus Streptomyceten) zeigten Sequenzähnlichkeiten von 26 bis 37 % zu *S. davaonensis* RosC. In einer Überlagerung der Aminosäuresequenzen können konservierte Regionen ermittelt werden. Dem Sequenzvergleich wurden außerdem die beiden besten Treffer der BLASTp-Analyse, ein Histidin-Phosphatase-Protein aus *Chloroflexus* Spezies (53 % Ähnlichkeit) und ein hypothetisches Protein aus „*Candidatus Dormibacteraeota bacterium*“ (52 % Ähnlichkeit), hinzugefügt (Abbildung 12).

RosC [Streptomyces davaonensis]	MS-----	DGRES--F-	-----	-----	LEVMRS	VYERYLVGVP	GVSEWV	IRH	ADSYTGLEDY	44
SCIN_03070 [Streptomyces cinnabarinus]	MS-----	DGRES--F-	-----	-----	LEVMRS	VYERYLVGVP	GVSEWV	IRH	ADSYTGLEDY	44
phosphoglycerate mutase GpmB [Escherichia coli]	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LQYVLRH	19
phosphohistidine phosphatase SixA [Escherichia coli]	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	QVIMRH	17
histidine phosphatase family protein [Bacillus subtilis]	M-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	QILIRH	18
histidine phosphatase family protein [Streptomyces nodosus]	MGRPGVPRPE	RTGQERGG IH	WGGRLPATA	RARPLADIRW	PTSLWSVTLP	GVTLFYLVQH	AEK	-----	-----	63
MSMEG_4193 family [Streptomyces species]	MP-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	TLILVRH	19
histidine phosphatase family protein [Chloroflexi bacterium]	MP-----	DDDRTAGF-	-----	-----	LRMIDE	LHARYLVGVE	GARQVW	IRH	ADAYRDLAAL	46
DLM67_08075 [Candidatus Dormibacteraeota bacterium]	M-----	-----	-----	-----	IDE	LHARHLIGVD	DVRELW	IRH	ADAYSGLAGL	34
RosC [Streptomyces davaonensis]	-DGDPRDPAL	SEKGRAQARL	LAARL-AG-V	PLHGVWASGA	HRAQQTASAV	A-AEHGLRVR	TDARLREVRT	-----	-----	110
SCIN_03070 [Streptomyces cinnabarinus]	-DGDPRDPAL	SEKGRAQARL	LAARL-AG-V	PLHGVWASGA	NRAQQTASAV	A-AEHGLRVR	TDARLREVRT	-----	-----	110
phosphoglycerate mutase GpmB [Escherichia coli]	IQGHSDSPL	TEKGEQAAWQ	VAERA-KA-L	GITHIIASDL	GRTRRTAEII	AELC-GGDIT	LDSRLRELD	-----	-----	85
phosphohistidine phosphatase SixA [Escherichia coli]	-----	DSIRPL	TTNGCDESRL	MANWLKQKV	EIERVLVSPF	LRAEQLLEEV	GDC	-----	LNLP	80
histidine phosphatase family protein [Bacillus subtilis]	HEG-RADFEL	TEKGREQVQR	LVQVKKAN-F	PPDFIWASTL	KRAETGETL	AEGI-GGPVQ	LEELME	-----	-----	82
histidine phosphatase family protein [Streptomyces nodosus]	-EPQPGDPL	TDLGRRQAR	TAERL-RQ-L	GLRAVFSPL	RRARQTAGII	A-APTGLRVQ	QDARIRE	-----	RM	128
MSMEG_4193 family [Streptomyces species]	LAGWTPGVAL	DERGAAQAAA	LPGRAL-AG-L	PLSEIVTSP	QRCQETLRPL	LDARPELRAH	TDERIGECYH	-----	-----	87
histidine phosphatase family protein [Chloroflexi bacterium]	-AEGPLDPL	SERGREQARR	LARL-AP-V	PLHAVWSSDL	RRAAETAAQV	A-GAHLAVV	SDARLREVRT	-----	-----	112
DLM67_08075 [Candidatus Dormibacteraeota bacterium]	-SDGRVDPPI	SMRGHDQARR	LAARL-AP-V	RFDAIWSDL	RRARETAAEV	A-RSHSLPVQ	VDARLREVRT	-----	-----	100
RosC [Streptomyces davaonensis]	-NWDDGRPSE	LKPHGVYFPF	E-----	PEKE	VAER---MRT	AVTAAVAATP	PAPDGTR	-----	-----	164
SCIN_03070 [Streptomyces cinnabarinus]	-NWDDGRPSE	LKPPGVYFPF	E-----	PEKE	VAER---MRT	AVTAAVAATP	AAPEGTR	-----	-----	164
phosphoglycerate mutase GpmB [Escherichia coli]	GVLEK-RNLE	TLTEEEGWR	RQLVNGTAGG	RIPGGESMQE	LADRMHAAL	-----	ATTAL	-----	-----	149
phosphohistidine phosphatase SixA [Escherichia coli]	PCGDVG	-----	-----	-----	LVSAYLQALT	NEGVAS	-----	-----	-----	107
histidine phosphatase family protein [Bacillus subtilis]	---FNNGVQAG	LSFEEAKKYP	EPKFLHDFE	NGESFIEFRM	RIEYIFSKIV	TENT	-----	-----	YDR	142
histidine phosphatase family protein [Streptomyces nodosus]	-NWDSQPME	DFLKDWAATV	E-----	DRDL	VPARGDSSRA	AAERLRACTL	DLTEEPGP	-----	-----	185
MSMEG_4193 family [Streptomyces species]	GDWSGRKLAE	L--GNEPLM	EVVQAHPSAA	AFPGGESMRA	MQTRAAEAVR	EWANARVERDH	GPDAVYLMCS	-----	-----	154
histidine phosphatase family protein [Chloroflexi bacterium]	-YWDEGREAV	PVTPEGYFPF	E-----	PEAE	VVAR---MRA	AVADVVAGLA	NVEAALPR	-----	-----	166
DLM67_08075 [Candidatus Dormibacteraeota bacterium]	-HWDEGRSEV	LNPEGVYFPF	E-----	PEEE	VLTR---MTA	ALAEVVAALP	SVGPQVPR	-----	-----	154
RosC [Streptomyces davaonensis]	HDSALVILMG	SLMNLGWGQL	DMILPLT--S	VSVLAVKDE-	-RM--VVR-	-SIGDATHLA	-----	-----	-----	215
SCIN_03070 [Streptomyces cinnabarinus]	HDSALVILMG	SLMNLGWGQL	DMILPLT--S	VSVLAVKDE-	-RM--VVR-	-SIGDATHLA	-----	-----	-----	215
phosphoglycerate mutase GpmB [Escherichia coli]	HGMALGCLVS	TILGLP-AYA	ERRLRLRNC	ISRIDYQDSA	WLASGVVVE-	-TAGDVSHL	AP	-----	-----	208
phosphohistidine phosphatase SixA [Escherichia coli]	HLPLVGLVA	ELC---PG	ETPPMFTTSA	IASVTIDESG	NGTFNMQMSP	CNLKMAKAI	-----	-----	-----	161
histidine phosphatase family protein [Bacillus subtilis]	HGGVINSLLR	AFFKMP-ISM	DYVFKMGDTG	ISLIEIDGEG	KTYF--	LS--VV-	-DITSVAHL	-----	GM	196
histidine phosphatase family protein [Streptomyces nodosus]	HGGVTVDLLR	TLIGDRAPD	DLMQHVS-LP	SCAITTLDH-	LS--VV-	-DITSVAHL	-----	-----	-----	234
MSMEG_4193 family [Streptomyces species]	HGDIKSLVA	EALGL--HL	DLFQRISVEP	CSVTAIRYT	-RLRPFVRL	GTDGDFASLA	PREEPSGDEA	-----	-----	217
histidine phosphatase family protein [Chloroflexi bacterium]	HNGAIAVYLS	SLLGLRWGQL	RVLQFQT--S	VSVVAFKGD-	-QA--VVQ-	-SIADATHLA	-----	-----	-----	219
DLM67_08075 [Candidatus Dormibacteraeota bacterium]	HNAAIAIYIS	RVLGLRWGQL	PVMPQFT--S	ITVLAVKDE-	-LV--VVQ-	-SIADATHLA	-----	-----	-----	205
RosC [Streptomyces davaonensis]	-AAPSDVI-	222								
SCIN_03070 [Streptomyces cinnabarinus]	-AAPSDVV-	222	98%							
phosphoglycerate mutase GpmB [Escherichia coli]	--ALDELQR	215	28%							
phosphohistidine phosphatase SixA [Escherichia coli]	-----	161	31%							
histidine phosphatase family protein [Bacillus subtilis]	-----	196	26%							
histidine phosphatase family protein [Streptomyces nodosus]	-----	Q	235	34%						
MSMEG_4193 family [Streptomyces species]	PVGGGAGAP	228	37%							
histidine phosphatase family protein [Chloroflexi bacterium]	-----	217	53%							
DLM67_08075 [Candidatus Dormibacteraeota bacterium]	-V--ELAE	210	52%							

Abbildung 12. Sequenzvergleiche der Primärstrukturen repräsentativer Phosphatasen, die eine Ähnlichkeit zu RosC aus *S. davaonensis* aufweisen (basierend auf BLASTp-Analysen). Das RosC-Homolog SCIN_03070 aus *S. cinnabarinus* (Sequenz siehe Kapitel 7), die Phosphoglyceratmutase GpmB (RDT56976.1) und die Phosphohistidin-Phosphatase SixA (WP_089562987.1) aus *E. coli*, ein Histidin-Phosphatase-Protein (QBJ67826.1) aus *B. subtilis*, ein Histidin-Phosphatase-Protein (WP_079162344.1) aus *Streptomyces nodosus*, ein putatives Multi-Spezies Phosphomutase-Protein MSMEG_4193 (WP_003977159.1) aus *Streptomyces*, ein Histidin-Phosphatase-Protein (TMC09710.1) aus *Chloroflexus* Spezies und ein hypothetisches Protein (PZR97424.1) aus „*Candidatus Dormibacteraeota bacterium*“. Die Zahlen in % am Ende des Sequenzvergleiches beziehen sich auf Ähnlichkeiten der Primärstrukturen verglichen mit *S. davaonensis* RosC. Konservierte Regionen sind in blau hervorgehoben und die Intensität der blauen Farbe korreliert mit dem Ausmaß der Konservierung. Aminosäuren, welche auf Basis der Datenbank CDD (Lu *et al.*, 2020) als Teil des katalytischen Zentrums von RosC ermittelt wurden, sind in einer roten Box hervorgehoben (R33, H34, R83, H165 und D166).

Im Sequenzvergleich aus Abbildung 12 fällt auf, dass in der BLASTp-Analyse hauptsächlich potentielle Histidin-Phosphatasen Ähnlichkeiten zu *S. davaonensis* RosC aufweisen. Dieses Ergebnis stimmt mit der Vorhersage des InterPro Tools des EMBLs überein. InterPro stuft RosC ebenfalls als eine Histidin-Phosphatase ein (Abbildung 11). Eine zentrale Rolle spielen bei Histidin-Phosphatasen die Aminosäuren Histidin, Arginin, Asparaginsäure und/oder Glutaminsäure (Rigden, 2008). Im Sequenzvergleich (Abbildung 12) konnten einige konservierte Histidine (H34, H165 und H212), Arginine (R33, R67 und R83), Glutaminsäure (Q60) und Asparaginsäure (D50, D102 und D208) identifiziert werden. Die, von InterPro vorhergesagte, katalytisch essentielle Aminosäure D166 ist innerhalb des Sequenzvergleiches aus Abbildung 12 nicht konserviert.

5.4 Chromatographische Reinigung von RosC^{StrepN} aus *E. coli*

Für die biochemische Charakterisierung von RosC wurde das Gen *rosC* in *E. coli* BL21(DE3) in LB-Medium, durch Induktion mit 0,1 mM IPTG, exprimiert (siehe Kapitel 4.1.4). Das rekombinante, an einen N-terminalen Strep-Tag II fusionierte, RosC (RosC^{StrepN}) wurde chromatographisch gereinigt. Ausgangspunkte zur Erstellung von zwei optimierten Reinigungsprotokollen waren, neben dem N-terminal fusionierten Strep-Tag II, die Berechnung des isoelektrischen Punktes und die Berechnung der Größe von RosC^{StrepN}. Auf Basis der Primärstrukturen konnten eine RosC-Größe von 24,0 kDa und eine RosC^{StrepN}-Größe von 25,6 kDa errechnet werden. Der Isoelektrische Punkt liegt bei 5,57 (RosC) bzw. 5,66 (RosC^{StrepN}). Beide Kenngrößen wurden mithilfe des Programmes *Isoelectric Point Calculator* (<http://isoelectric.org/index.html>) ermittelt (Kozlowski, 2016).

Alle Chromatographieschritte wurden mit dem ÄKTApurifier System (GE Healthcare) durchgeführt. Für Kristallisationsexperimente, in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biophysik, wurden hochreine Enzymlösungen präpariert. Enzymlösungen, die bestmöglich frei von Kontaminationen durch andere Proteine waren, wurden nach einem Reinigungsprotokoll über drei Chromatographiesäulen, mit unterschiedlichem Trennprinzip, gereinigt (Strep-AEX-SEC; siehe Kapitel 4.3.4.1). Enzymlösungen für die biochemische Charakterisierung von RosC wurden, nach der Strep-Affinitätsreinigung, durch Verwendung einer SEC Entsalzungssäule von störenden Pufferbestandteilen getrennt (Strep-SEC Entsalzung; siehe Kapitel 4.3.4.1). Die typischen Elutionsprofile der beiden RosC^{StrepN}-Reinigungsprotokolle sind in Abbildung 13 dargestellt.

In dem Strep-AEX-SEC-Reinigungsverlauf wurde der Rohextrakt aus einem Liter *E. coli*-Kultur, in der pPSG_IBA3 <*rosC*_{opt_N}> exprimiert wurde, auf eine 5 ml Strep-Tactin Superflow high capacity Säule (IBA Lifesciences) geladen (Anstieg des UV-Signals auf circa 2300 mAU bei 0 – 40 ml Elutionsvolumen in Abbildung 13 A links). Proteine aus dem *E. coli* Rohextrakt wurden durch Spülen mit 100 % Puffer A entfernt bis UV- und Konduktivitätssignal konstant blieben. Die Elution von RosC^{StrepN} wurde mit einem linearen Puffer B-Gradienten von 0 bis 10 mM Desthiobiotin initiiert. Die RosC^{StrepN}-Elution startete typischerweise ab einer Puffer B-Konzentration von 25 % mit einem Peak-Maximum bei 35 % Puffer B und 90 ml Elutionsvolumen. Das entspricht einer Konzentration von 2,5 mM bzw. 3,5 mM Desthiobiotin. Bei der Elution konnte ein einzelner, symmetrischer Peak erhalten werden. Bei einem Spülschritt mit 100 % Puffer B (10 mM Desthiobiotin), zur Elution möglicher Proteinkontaminationen, wurden keine weiteren Proteine von der Säule eluiert (konstantes UV-Signal bei 0 mAU nach dem RosC-Elutionspeak; Abbildung 13 A links).

Das eluierte RosC^{StrepN} aus der Strep-Reinigung wurde konzentriert auf eine 1 ml Fractogel TMAE AEX-Säule (Merck KGaA) geladen. Gebundenes RosC^{StrepN} an der AEX-Säule wurde

mit 100 % Puffer A gewaschen. In dem Waschschritt konnte kein Anstieg des UV-Signals durch ungebundene Proteinkontaminationen beobachtet werden (niedriges UV-Signal bei 0 – 20 ml; Abbildung 13 A Mitte).

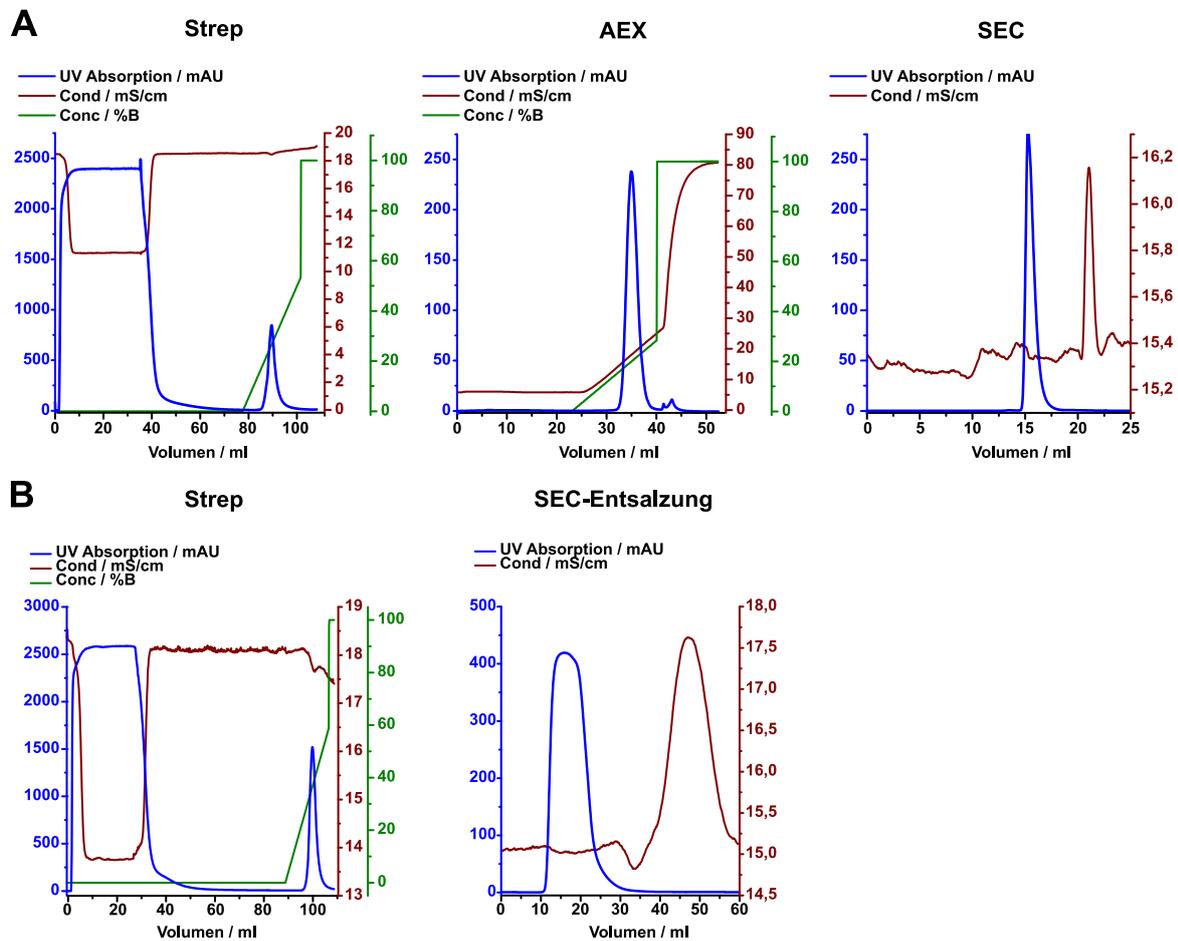


Abbildung 13. Elutionsprofile der RosC^{StrepN} Reinigungsprotokolle Strep-AEX-SEC (A) und Strep-SEC Entsalzung (B). UV-Absorption in mAU (blau), Leitfähigkeit in mS/cm (braun) und Konzentration in % Puffer B (grün) wurden gegen das Volumen in ml aufgetragen. A Links: Strep-Affinitätschromatographie von RosC^{StrepN} aus einem Liter *E. coli*-Kultur, in der pPSG_IBA3 <rosC_{opt_N}> exprimiert wurde. Proteine aus dem *E. coli* Rohextrakt wurden von der Säule gewaschen (UV-Peak von 0 – 40 ml) bis UV- und Leitfähigkeitssignal konstant waren. Im Anschluss wurde die Elution von RosC^{StrepN} durch einen linearen Puffer B-Gradienten initiiert (zweiter UV-Peak bei 90 ml). Mitte: AEX-Chromatographie des Eluates aus der Strep-Reinigung. An die AEX-Säule gebundenes RosC^{StrepN} wurde mit 100 % Puffer A gewaschen (0 – 20 ml, kein Anstieg des UV-Signals). Anschließend wurde die Elution von RosC^{StrepN} durch einen linearen Puffer B-Gradienten initiiert (UV-Peak bei 35 ml). Weitere Unreinheiten wurden mit 100 % Puffer B von der Säule gespült (UV-Peaks bei 40 – 50 ml). Rechts: Das konzentrierte RosC^{StrepN} aus der AEX wurde in einer SEC isokratisch eluiert (UV-Peak bei 15,3 ml). B Links: Strep-Affinitätschromatographie von RosC^{StrepN} aus einem Liter *E. coli*-Kultur, in der pPSG_IBA3 <rosC_{opt_N}> exprimiert wurde. Proteine aus dem *E. coli* Rohextrakt wurden von der Säule gewaschen (UV-Peak von 0 – 40 ml) bis UV- und Leitfähigkeitssignal konstant waren. Im Anschluss wurde die Elution von RosC^{StrepN} durch einen linearen Puffer B-Gradienten initiiert (zweiter UV-Peak bei 100 ml). Rechts: RosC^{StrepN} aus der Strep-Affinitätschromatographie wurde auf einer SEC Entsalzungssäule bei konstanter Flussrate isokratisch eluiert (UV-Peak bei 11 – 25 ml).

Nach dem Waschschritt mit 100 % Puffer A in der AEX-Reinigung wurde RosC^{StrepN} durch einem linearen Puffer B-Gradienten von 25 mM bis 1 M NaCl eluiert. RosC^{StrepN} eluierte

typischerweise ab einer Puffer B Konzentration von 14 %. Das entspricht einer Konzentration von 165 mM NaCl und einer Konduktivität von 12,95 mS/cm. Unreinheiten oder verbliebenes RosC^{StrepN} auf der AEX-Säule wurden mit 100 % Puffer B von der Säule gespült (UV-Signal bei 40 – 45 ml). Die maximale Peak-Höhe der Unreinheiten bzw. RosC^{StrepN}-Reste von 11,25 mAU zeigt den geringfügigen Anteil im Vergleich zum eluierten RosC^{StrepN} (maximale Peak-Höhe von 235 mAU; Abbildung 13 A Mitte). Das RosC^{StrepN} Eluat aus der AEX-Chromatographie wurde konzentriert, als finaler Polierschritt, auf eine Superdex 200 Increase 10/300 GL SEC-Säule geladen und isokratisch eluiert (Abbildung 13 A rechts). RosC^{StrepN} eluierte typischerweise bei einem Elutionsvolumen von 15,3 ml (Peak-Maximum). Der Peak im Konduktivitätssignal zeigt das Ende des Chromatographielaufes an. Die restlichen Pufferbestandteile aus den Puffern für die AEX eluierten bei 20,5 ml. Salze und andere kleine Moleküle interagieren stärker mit dem SEC-Säulenmaterial und eluieren dementsprechend als Letztes. Das SEC-Chromatogramm zeigt keine weiteren Unreinheiten durch Proteine höherer oder niedriger Größe an (kein Anstieg des UV-Signales von 0 – 15 ml und 17 – 25 ml; Abbildung 13 A rechts).

In dem Reinigungsverlauf über Strep-AEX-SEC konnten kaum Protein-Kontaminationen beobachtet werden. In der SDS-PAGE konnten ebenfalls keine Unreinheiten über der Detektionsgrenze von Coomassie-Blau festgestellt werden (SDS-PAGE in Abbildung 14). Um einen unnötigen Verlust von Protein während des Reinigungsverlaufes über mehrere Säulen zu vermeiden, wurden Enzymlösungen für biochemische Experimente aus diesem Grund nach der Strep-Affinitätschromatographie, durch eine SEC Entsalzungssäule, von störenden Pufferbestandteilen getrennt und direkt in Enzymtests eingesetzt (siehe Abbildung 13 B).

Für den Reinigungsverlauf Strep-SEC Entsalzung wurde der Rohextrakt aus einem Liter *E. coli*-Kultur, in der pPSG_IBA3 <rosC_{opt}_N> exprimiert wurde, auf eine 5 ml Strep-Tactin Superflow high capacity Säule (IBA Lifesciences) geladen und wie im Strep-Reinigungsprotokoll aus Abbildung 13 A (links) prozessiert. Zusammenfassend, Proteine aus dem *E. coli* Rohextrakt wurden durch Spülen mit 100 % Puffer A entfernt bis UV- und Konduktivitätssignal konstant blieben. Die Elution von RosC^{StrepN} wurde mit einem linearen Puffer B-Gradienten von 0 bis 10 mM Desthiobiotin initiiert (UV-Peak bei 100 ml Elutionsvolumen in Abbildung 13 B links). Das eluierte RosC^{StrepN} wurde direkt über eine 10 ml Probenschleife auf eine HiPrep 26/10 Entsalzungssäule geladen (GE Healthcare) und bei konstanter Flussrate isokratisch eluiert (UV-Peak zwischen 11 und 25 ml in Abbildung 13 B rechts). Der Peak im Konduktivitätssignal (40 – 60 ml) zeigt das Ende des SEC-Chromatographielaufes an.

RosC^{StrepN}-Eluate aus beiden Reinigungsprotokollen wurden konzentriert und nach Zugabe von Glycerin bis zur finalen Konzentration von 20 % (v/v) bei -20 °C gelagert. Unter diesen Bedingungen konnte die Enzymlösung über mindestens 6 Monate bei -20 °C ohne

Aktivitätsverlust gelagert werden. Die Reinheit der Proteinlösung wurde stets mithilfe einer SDS-PAGE analysiert. In Abbildung 14 ist repräsentativ eine SDS-PAGE aus dem Reinigungsprotokoll Strep-AEX-SEC dargestellt.

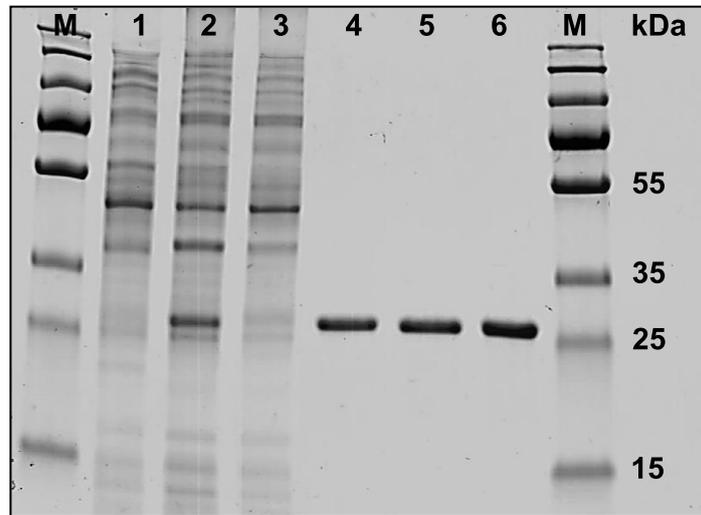


Abbildung 14. SDS-PAGE/ Coomassie R-250 G Färbung von *E. coli* Rohextrakten (10 µg Gesamtprotein) und RosC^{StrepN} Elutionsfraktionen (5 µg Gesamtprotein) aus der Strep-AEX-SEC Reinigung. M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Spur 1: Rohextrakt *E. coli* mit pPSG_IBA3 Leerplasmid. Spur 2: Rohextrakt einer induzierten (0,1 mM IPTG) *E. coli*-Kultur, die pPSG_IBA3 <rosC_{opt_N}> exprimiert. Spur 3: Durchfluss der Affinitätschromatographie. Spur 4 – 6: Eluate der Affinitäts-, Anionenaustausch- und Größenausschlusschromatographie.

In Spur 2 der SDS-PAGE ist der induzierte (0,1 mM IPTG) Rohextrakt einer *E. coli*-Kultur, in der pPSG IBA 3 <rosC_{opt_StrepN}> exprimiert wurde, aufgetragen. Eine Bande zwischen 25 und 35 kDa ist deutlich hervorgehoben, verglichen zu der *E. coli* Leerplasmid-Probe (Spur 1 in Abbildung 14). Die errechnete Größe von RosC^{StrepN}, basierend auf der Primärstruktur, stimmt mit der hervorgehobenen Bande in Spur 2 der SDS-PAGE überein (Abbildung 14). Spur 3 der SDS-PAGE zeigt den Durchfluss der Affinitätschromatographie. Die auffällige Bande von Spur 2 auf Höhe von circa 25 kDa ist nur schwach zu erkennen, ähnlich zu Spur 1. Die verwendete Strep-Affinitätssäule konnte RosC^{StrepN} demnach wahrscheinlich vollständig binden. In Spur 4 bis 6 der SDS-PAGE sind Eluate nach den einzelnen Reinigungsschritten (Strep-AEX-SEC) aufgetragen. Bereits in Spur 4, nach der Strep-Affinitätschromatographie, konnten keine Unreinheiten aus unspezifisch gebundenen Proteinen an der Strep-Säule, durch Coomassie-Färbung, detektiert werden. Aus diesem Grund wurden, zur Vermeidung von Verlusten während des Reinigungsprotokolles, Enzympräparationen für biochemische Untersuchungen stets nach dem Reinigungsprotokoll aus Abbildung 13 B gereinigt.

5.5 Charakterisierung des neuen Enzyms RosC

5.5.1 Bestimmung der nativen Proteingröße

Basierend auf der Primärstruktur besitzt RosC^{StrepN} eine errechnete Größe von ca. 25,6 kDa. Diese Größe konnte durch eine SDS-PAGE nach der Reinigung von RosC^{StrepN} bestätigt werden (siehe Abbildung 14). Zur Bestimmung der nativen Proteingröße und der Identifizierung von Proteinaggregaten (falls vorhanden), wurde eine Gelfiltration auf einer Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) durchgeführt (siehe 4.3.4.2). Ein Vergleich des RosC^{StrepN}-Elutionsvolumens mit Standardproteinen liefert Hinweise über die native Größe des Proteins. Chromatogramme von Standardproteinen wurden mit dem Chromatogramm von RosC^{StrepN} mithilfe der Software Origin Pro2015G überlagert (Abbildung 15).

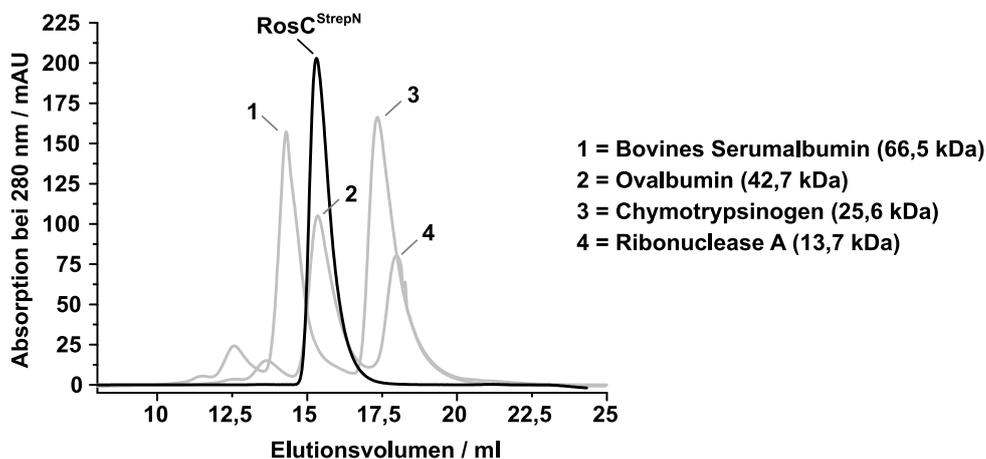


Abbildung 15. Vergleich der Chromatogramme der Gelfiltration von RosC^{StrepN} mit Referenzproteinen auf einer Superdex 200 Increase 10/300 GL Säule (GE Healthcare) in 0,5 ml/min TBS-Puffer. Vier Standardproteine 1 – 4 (grau): Bovines Serumalbumin (66,5 kDa; 1), Ovalbumin (47,6 kDa; 2), Chymotrypsinogen (25,6 kDa; 3) und Ribonuclease A (13,7 kDa; 4). RosC^{StrepN} (schwarz) eluierte bei einem Retentionsvolumen vergleichbar zu Ovalbumin (2).

Die verwendete Säule Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare) besitzt einen Trennbereich von 10 bis 600 kDa. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in absteigender Reihenfolge ihrer Größe. Das Referenzprotein Chymotrypsinogen (3) besitzt dieselbe Größe wie die, für RosC^{StrepN} errechnete (und durch SDS-PAGE bestätigte, siehe Abbildung 14) Größe von 25,6 kDa. Eine Elution von Chymotrypsinogen ($V = 17,3$ ml) erfolgte später als die Elution von RosC^{StrepN} ($V = 15,3$ ml). In der nativen Form ist das Protein RosC^{StrepN} folglich größer als seine errechnete Größe. Dieses Ergebnis deutet auf die Bildung von Aggregaten hin. Eine Überlagerung der Chromatogramme aller Referenzproteine 1 – 4 (grau) mit RosC^{StrepN} (schwarz) in Abbildung 15 lieferte ein vergleichbares Retentionsvolumen von RosC^{StrepN} ($V = 15,3$ ml) zu Ovalbumin ($V = 15,4$ ml). Ovalbumin besitzt mit 47,6 kDa eine annähernd doppelt so große Proteingröße, verglichen zu RosC^{StrepN}. Das Ergebnis dieses

Experimentes deutet darauf hin, dass RosC^{StrepN} nativ als Dimer vorkommt. Strukturanalysen sind notwendig, um dieses Ergebnis zu bestätigen.

5.5.2 Bestimmung der *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität

Um zu überprüfen, ob aus *E. coli* gereinigtes, rekombinantes RosC^{StrepN} die Dephosphorylierung von AFP katalysiert, wurden variierende Konzentrationen von RosC^{StrepN} in einem *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest eingesetzt (Kapitel 4.3.6.2). Jeweils 200 μM AFP wurden mit 15, 30 oder 60 mg/l RosC^{StrepN} (entspricht 0,6 – 2,4 μM) inkubiert. Nach definierten Zeitintervallen wurde die Reaktion, durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA, beendet und die Reaktionsgemische mithilfe der HPLC-DAD ($\lambda = 480 \text{ nm}$) analysiert (Kapitel 4.3.5.2). In Abbildung 16 ist der zeitliche Verlauf des RosC^{StrepN}-katalysierten AFP-Abbaus und AF-Aufbaus dargestellt.

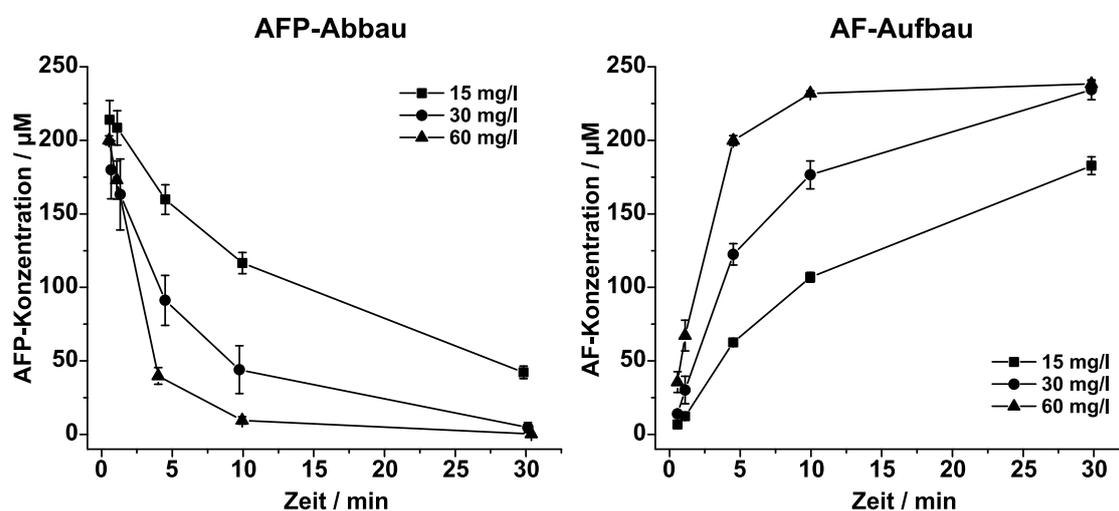


Abbildung 16. Zeitlicher Verlauf des RosC^{StrepN}-katalysierten AFP-Abbaus und AF-Aufbaus. Inkubation von 200 μM AFP mit variierenden RosC^{StrepN}-Konzentrationen (■: 15 mg/l; ●: 30 mg/l und ▲: 60 mg/l). Der Abbau des Substrates AFP (links) und der Aufbau des Reaktionsproduktes AF (rechts) sind in $\mu\text{mol} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) gegen die Reaktionszeit in min aufgetragen.

RosC^{StrepN} katalysiert die Dephosphorylierung von AFP zu AF. Die Geschwindigkeit des Abbaus des Substrates AFP ist proportional zu der Geschwindigkeit des AF-Aufbaus (Abbildung 16). Die Steigungen im linearen Bereich des AF-Aufbaus (Kapitel 4.3.6.3) zwischen 0 und 5 min Reaktionszeit und daraus berechnete spezifische Aktivitäten sind in Tabelle 39 in Kapitel 7 aufgelistet. Die Geschwindigkeit der AF-Bildung hängt von der eingesetzten RosC^{StrepN}-Konzentration ab. Beispielsweise ist die Steigung der AF-Bildung bei dem Einsatz von 30 mg/l RosC^{StrepN} doppelt so groß, verglichen zu 15 mg/ml (Tabelle 39). Nach Berücksichtigung der eingesetzten Proteinkonzentration decken sich die errechneten spezifischen Aktivitäten für 15 mg/l und 30 mg/l RosC^{StrepN} innerhalb der Standardabweichung (Tabelle 39). Bei einer RosC^{StrepN}-Konzentration von 60 mg/l konnte eine verringerte spezifische Aktivität berechnet werden. Möglicherweise ist beim Einsatz von 60 mg/l

RosC^{StrepN} keine Substratsättigung durch die eingesetzte AFP-Konzentration von 200 µM erreicht. Aktivitäten von Proteinen sind nur bei Substratsättigung miteinander vergleichbar.

5.5.3 Entfernung des N-terminalen Strep-Tags von RosC^{StrepN}

Vor der biochemischen Charakterisierung des neuen Enzyms RosC wurde ein möglicher Aktivitätsverlust durch den N-terminal-fusionierten Strep-Tag II an RosC^{StrepN} untersucht. Durch die integrierte Faktor Xa-Schnittstelle am 5'-Ende des optimierten Gens im Expressionsplasmid pPSG_IBA3 <rosC_{opt_N}> für *E. coli* (Sequenz siehe Kapitel 7) konnte der Strep-Tag II mithilfe des Factor Xa Cleavage Capture Kits entfernt werden (Kapitel 4.3.3). Als Kontrolle diente das Xa Cleavage Kontrollprotein, das in zwei Fragmente von 32 kDa und 17 kDa gespalten werden soll und leicht in einer SDS-PAGE visualisiert werden kann (Angaben des Herstellers). Die Entfernung des Strep-Tags (1 – 2 kDa) von RosC^{StrepN} konnte nicht durch eine Änderung der Proteingröße in der SDS-PAGE ermittelt werden. Restliches, nicht-hydrolysiertes RosC^{StrepN} wurde von RosC deshalb durch die Verwendung eines Gravity Flow Strep-Tactin Säulchen (IBA Lifesciences) entfernt. Bei einer erfolgreichen Entfernung des Strep-Tags können keine Wechselwirkungen zwischen RosC und dem Säulenmaterial stattfinden und das Enzym ist im Durchfluss zu finden. Verbliebenes RosC^{StrepN} (falls vorhanden) bindet an das Säulenmaterial und kann durch eine Elution in Elutionspuffer (siehe Tabelle 9) entfernt werden. In Abbildung 17 sind verschiedene Fraktionen der Auftrennung durch das Gravity Flow Strep-Tactin Säulchen auf eine SDS-Page aufgetragen.

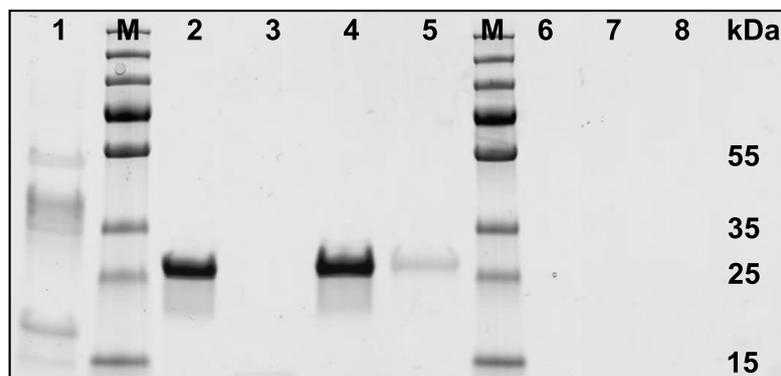


Abbildung 17. SDS-PAGE/ Coomassie R-250 G Färbung verschiedener Fraktionen aus der Affinitätschromatographie von RosC und RosC^{StrepN}, nach Behandlung mit Faktor Xa Protein. M: PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific). Spur 1: Ansatz des Cleavage Kontrollproteins (4 µg). Spur 2: 5 µg des Verdauansatzes aus der Faktor Xa Hydrolyse. Spur 3 – 5: Unterschiedliche Fraktionen (2 – 4) des Durchflusses. Spur 6 – 8 jeweils 20 µl der Elutionsfraktionen 1 – 3.

Das Faktor Xa Cleavage Kontrollprotein wurde nicht vollständig verdaut (Spur 1 in Abbildung 17). Neben Banden des 47 kDa Proteins konnten zwei Banden auf einer Höhe von circa 35 kDa und 20 kDa visualisiert werden, die ungefähr den angegebenen Fragmentgrößen 32 kDa und 17 kDa des Herstellers entsprechen. Spuren 3, 4 und 5 stellen verschiedene

Fractionen des Durchflusses durch das Gravity Flow Strep-Tactin Säulchen dar. Die intensivste Bande, und somit der Großteil des verdauten RosC, konnte in Fraktion 3 detektiert werden. In unterschiedlichen Elutionsfraktionen in den Spuren 6 – 8 konnte kein Protein festgestellt werden (Abbildung 17). Der Strep-Tag II wurde demnach vollständig von RosC entfernt. Die Enzymlösung aus der Durchflussfraktion 3 (Spur 4, Abbildung 17) wurde in *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests eingesetzt (siehe Kapitel 4.3.6.2). Die *in vitro* AFP-Phosphataseaktivität von RosC^{StrepN} und RosC (1,2 µM) wurde in einem Ansatz mit jeweils 200 µM AFP untersucht (Kapitel 4.3.6.2). Nach bestimmten Zeitintervallen wurde die Reaktion, durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA, beendet und die Proben weiter zur HPLC-DAD-Analyse vorbereitet (Kapitel 4.3.5.1). Die spezifische Aktivität in µmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein ± SD (n = 3) wurde anhand der Steigung im linearen Bereich der der AF-Bildung berechnet (Kapitel 4.3.6.3). Die Aktivität von RosC^{StrepN} betrug 0,969 ± 0,078 µmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein und von RosC 0,956 ± 0,054 µmol min⁻¹ mg⁻¹ Protein. Die ermittelten Unterschiede in den Aktivitäten befinden sich innerhalb der Standardabweichung. Der N-terminale Strep-Tag II von RosC^{StrepN} beeinflusst somit nicht die AFP-Phosphataseaktivität. Für weitere Untersuchungen wurde aus diesem Grund stets das Protein RosC^{StrepN} verwendet.

5.5.4 Identifizierung der Substrate

In Abbildung 18 ist der Reaktionsverlauf der RosC^{StrepN}-katalysierten Bildung der dephosphorylierten Reaktionsprodukte und die chemischen Strukturen der eingesetzten phosphorylierten Substrate dargestellt.

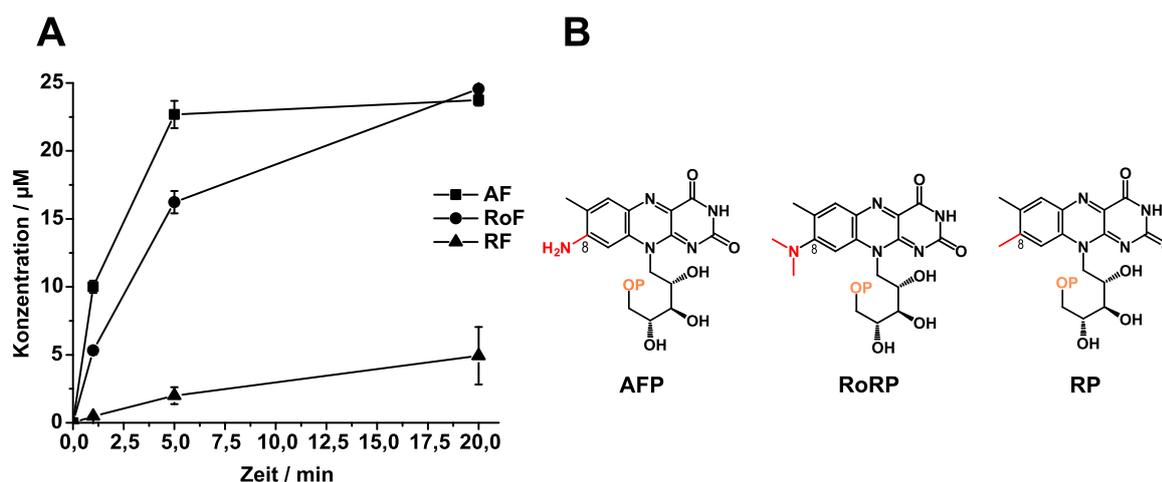


Abbildung 18. Reaktionsverlauf der RosC^{StrepN}-katalysierten Bildung der Reaktionsprodukte 8-Desmethyl-8-Amino-Riboflavin (AF), Roseoflavin (RoF) und Riboflavin (RF) und chemische Strukturen der eingesetzten phosphorylierten Substrate. **A** *In vitro* Phosphatase-Enzymtest aus 25 µM Substrat und 1,2 µM RosC^{StrepN}. Die Bildung der dephosphorylierten Reaktionsprodukte AF (■) aus AFP (●) aus RoRP und RF (▲) aus RP ist in µM ± SD (n = 3) dargestellt. **B** Chemische Strukturen der eingesetzten phosphorylierten Substrate AFP, RoRP und RP und ihr Unterschied im C8-Rest des Isoalloxazinring-Systems (rot markiert).

Für die Identifizierung möglicher weiterer Substrate von RosC^{StrepN}, neben AFP, wurden die strukturell ähnlichen, phosphorylierten Flavine RP und RoRP getestet. *In vitro* Phosphataseaktivität wurde in einem Ansatz mit jeweils 25 µM phosphoryliertem Substrat (AFP, RoRP oder RP) und 1,2 µM RosC^{StrepN} untersucht (Kapitel 4.3.6.2). Die beiden phosphorylierten Substrate AFP und RoRP wurden schnell zu ihren dephosphorylierten Varianten AF und RoF umgewandelt (Abbildung 18 A). Die Dephosphorylierung von AFP zu AF verlief schneller als die Dephosphorylierung von RoRP zu RoF. Nach 1 min Reaktionszeit konnten bereits 10,0 µM AF und 5,3 µM RoF detektiert werden. Bereits nach 5 min Reaktionszeit konnte eine vollständige Umsetzung des Substrates AFP zu dem Produkt AF detektiert werden. Eine vollständige Umsetzung von RoRP erfolgte zwischen 5 min und 20 min Reaktionszeit. RP wurde im Vergleich zu AFP und RoRP langsamer zu RF umgewandelt. Nach einer Reaktionszeit von 20 min konnten 4,9 µM RF detektiert werden (Abbildung 18 A). Die Strukturen AFP, RoRP und RP unterscheiden sich im C8-Rest des Isoalloxazinring-Systems. AFP trägt eine Amino-, RP eine Methyl- und RoRP eine Dimethylaminogruppe an dieser Stelle (Abbildung 18 B). Der unterschiedliche Rest am C8 trägt vermutlich zur Substratspezifität von RosC bei. Strukturelle Analysen können Hinweise auf Aminosäurereste geben, welche die Aminogruppe am C8-Rest des Isoalloxazinring-Systems und das Isoalloxazinring-System selbst stabilisieren.

Neben den strukturell ähnlichen phosphorylierten Flavinen AFP, RoRP und RP wurden zwei weitere Substrate getestet. GTP ist ein wichtiger zellulärer Bestandteil und ein Substrat für die RF-Biosynthese (Richter *et al.*, 1993). In einem Ansatz wurden 1000 µM GTP mit 0,6 µM RosC^{StrepN} bei 37 °C 60 min lang inkubiert (Kapitel 4.3.6.2). Das Freisetzen von Phosphat wurde mithilfe des Biomol Green Phosphate Detection Kits (Enzo Lifesciences) detektiert (Kapitel 4.3.6.5). Abbildung 19 zeigt das Ergebnis des GTP-Hydrolase-Enzymtests nach 60-minütiger Reaktionszeit.

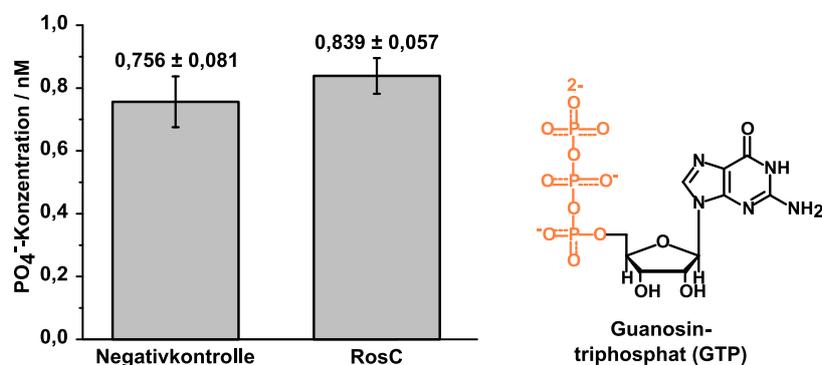


Abbildung 19. RosC^{StrepN} katalysiert nicht die Dephosphorylierung des Riboflavin-Vorläufers GTP. Links: Phosphat-Levels in nM PO₄⁻ ± SD (n = 3) nach 60 min Inkubation von 1000 µM GTP mit 0,6 µM RosC^{StrepN} oder H₂O (Negativkontrolle) bei 37 °C. Die Unterschiede zwischen Negativkontrolle und RosC^{StrepN} erwiesen sich als nicht signifikant ($P > 0,11$) in einem Zweistichproben t-Test, unter der Annahme gleicher Varianzen. Rechts: Chemische Struktur von GTP.

RosC^{StrepN} katalysiert nicht die Hydrolyse des RF-Vorläufers GTP. Die Unterschiede im GTP-Hydrolase-Enzymtest zwischen RosC^{StrepN} und der Negativkontrolle H₂O erwiesen sich in einem Zweistichproben t-Test, unter der Annahme gleicher Varianzen, nicht signifikant ($P > 0,11$). Die Ähnlichkeit der Purin-Struktur des RF-Vorläufers GTP reicht vermutlich nicht aus, um von RosC als Substrat akzeptiert zu werden. Die abzusplattende Phosphatgruppe ist nicht an einem Ribitylrest (wie bei AFP und RP) lokalisiert, sondern als Triphosphat an eine Riboseeinheit gebunden (Abbildung 19).

Die Verbindung 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP) ist ein Intermediat im RF-Stoffwechsel (siehe RF-Biosynthese in Kapitel 2.3). Bislang sind nur wenige Enzyme bekannt, welche die Dephosphorylierung von ARPP spezifisch katalysieren. RosC^{StrepN} wurde auf ARPP-Phosphataseaktivität nach der Methode von Sarge *et al.* (2015) in einem gekoppelten *in vitro* ARPP-Phosphatase-Enzymtest getestet (Kapitel 4.3.6.4). Das Reaktionsprodukt 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (LU) wurde mittels HPLC-FLD detektiert (Kapitel 4.3.5.3). Die Ergebnisse des *in vitro* ARPP-Phosphatase-Enzymtests und die chemische Struktur von ARPP sind in Abbildung 20 dargestellt.

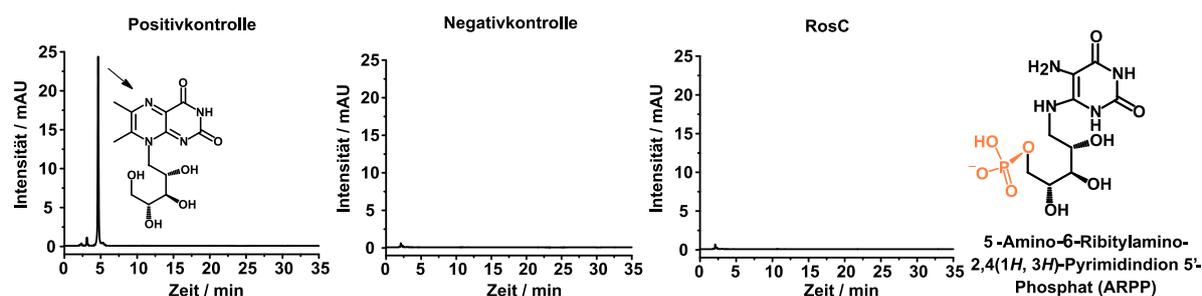


Abbildung 20. RosC^{StrepN} katalysiert nicht die Dephosphorylierung des Riboflavin-Intermediates 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP). Chromatogramme des *in vitro* ARPP-Phosphatase-Enzymtests nach der Methode von Sarge *et al.* (2015) in milli Arbitrary Units (mAU). Das Reaktionsprodukt 6,7-Dimethyl-8-Ribityllumazin (LU) eluierte bei 4,6 min und wurde mithilfe der HPLC-FLD detektiert. Als Positivkontrolle wurde rekombinantes YcsE aus *B. subtilis* verwendet (Chromatogramm links). Das Chromatogramm des *in vitro* ARPP-Phosphatase-Enzymtests von RosC^{StrepN} (Chromatogramm rechts) gleicht dem Chromatogramm der Negativkontrolle (H₂O, Chromatogramm Mitte). Ein Peak bei circa 2,5 min ist bei allen Proben vorhanden. Der dazugehörige Metabolit ist nicht bekannt. Rechts: Chemische Struktur von ARPP.

Als Positivkontrolle wurde das rekombinante Protein YcsE aus *B. subtilis* verwendet, da es ARPP-Phosphataseaktivität besitzt (Sarge *et al.*, 2015). Das Reaktionsprodukt LU konnte im *in vitro* ARPP-Phosphatase-Enzymtest der Positivkontrolle mit einer Retentionszeit von 4,6 min detektiert werden. Das Chromatogramm von RosC^{StrepN} gleicht dem Chromatogramm der Negativkontrolle. Es konnte kein Peak bei einer Retentionszeit von LU (4,6 min) detektiert werden. Die Dephosphorylierung läuft in diesem Enzymtest weder spontan noch von RosC^{StrepN} katalysiert ab (Abbildung 20). Die chemische Struktur von ARPP ähnelt der Struktur von RF und RoF durch den phosphorylierten Ribitylrest (Abbildung 20 rechts); das

Isoalloxazinring-System von RF wird jedoch erst in den Reaktionen nach der Dephosphorylierung ausgebildet (siehe RF-Biosynthese in Kapitel 2.3).

Abbildung 21 fasst alle für RosC^{StrepN} getesteten Verbindungen und deren chemische Strukturen zusammen, in absteigender Reihenfolge der Dephosphorylierungsgeschwindigkeit (soweit bekannt).

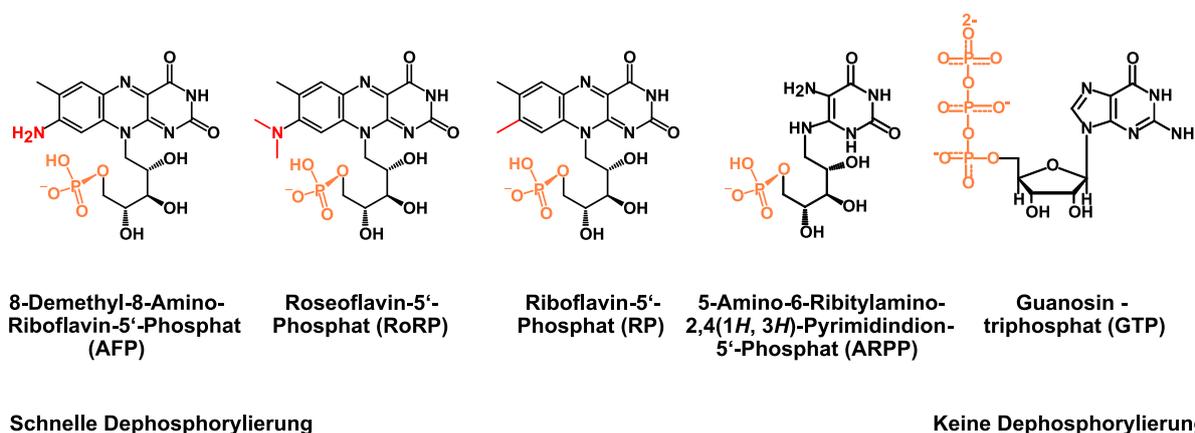


Abbildung 21. Alle getesteten Verbindungen im *in vitro* Phosphatase-Enzymtest und ihre chemischen Strukturen. Die Verbindungen sind in absteigender Reihenfolge bezüglich der Geschwindigkeit der Dephosphorylierung angeordnet (soweit bekannt). Die Dephosphorylierung des natürlichen Substrates 8-Demethyl-8-Amino-Riboflavin-5'-Phosphat (AFP) wird am schnellsten katalysiert, gefolgt von Roseoflavin-5'-Phosphat (RoRP) und Riboflavin-5'-Phosphat (RP). Die Dephosphorylierung von 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat (ARPP) und Guanosintriphosphat (GTP) wurde nicht von RosC^{StrepN} katalysiert.

Alle Verbindungen, deren Dephosphorylierung von RosC^{StrepN} katalysiert wurden, besitzen ein intaktes Isoalloxazinring-System und eine Phosphatgruppe an der Ribityl-Seitenkette (Abbildung 21). Diese Verbindungen unterscheiden sich am Liganden der C8-Position des Isoalloxazinring-Systems. Inwiefern das Enzym RosC^{StrepN} zwischen AFP, RoRP und RP unterscheidet und welche Aminosäuren beteiligt sind, kann in Strukturanalysen untersucht werden.

5.5.5 Bestimmung der kinetischen Parameter

Kinetische Parameter für die RosC^{StrepN}-katalysierte Dephosphorylierung wurden für die Substrate AFP und RP bestimmt. Von dem Substrat RoRP waren keine ausreichenden Mengen zur Bestimmung kinetischer Parameter vorhanden, da es nicht kommerziell erhältlich ist. *In vitro* Phosphatase-Enzymtests wurden mit variierenden Substratkonzentrationen (AFP 5 – 400 μ M und RP 100 μ M – 1000 μ M) und 0,6 μ M RosC^{StrepN} durchgeführt (Kapitel 4.3.6.3). Eine AF Bildung aus AFP wurde mithilfe der HPLC-DAD ($\lambda = 480$ nm) detektiert (Kapitel 4.3.5.2). Nach bestimmten Zeitintervallen wurden Aliquote aus dem Reaktionsansatz entfernt und die Reaktion, durch Zugabe von 5 % (w/v) TCA, beendet (Kapitel 4.3.5.1). Die Freisetzung von Phosphat aus der Hydrolyse von RP wurde durch das Biomol Green

Phosphate Detection Kit detektiert. Nach bestimmten Zeitintervallen wurden 100 μl -Aliquote aus dem Reaktionsansatz entnommen, die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml Biomol Green Phosphate Reagenz beendet (Kapitel 4.3.6.5).

Die initialen Reaktionsrate in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) wurde aus der Steigung im linearen Bereich der Produktbildung für jede Substratkonzentration berechnet und gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen. Mithilfe der Software Origin 2015Pro (Version 9) wurde ein nicht-linearer Fit auf Basis der Michaelis Menten Gleichung (Formel 4 in Kapitel 4.3.6.3) durchgeführt und die kinetischen Konstanten K_M und V_{max} wurden bestimmt (Abbildung 22).

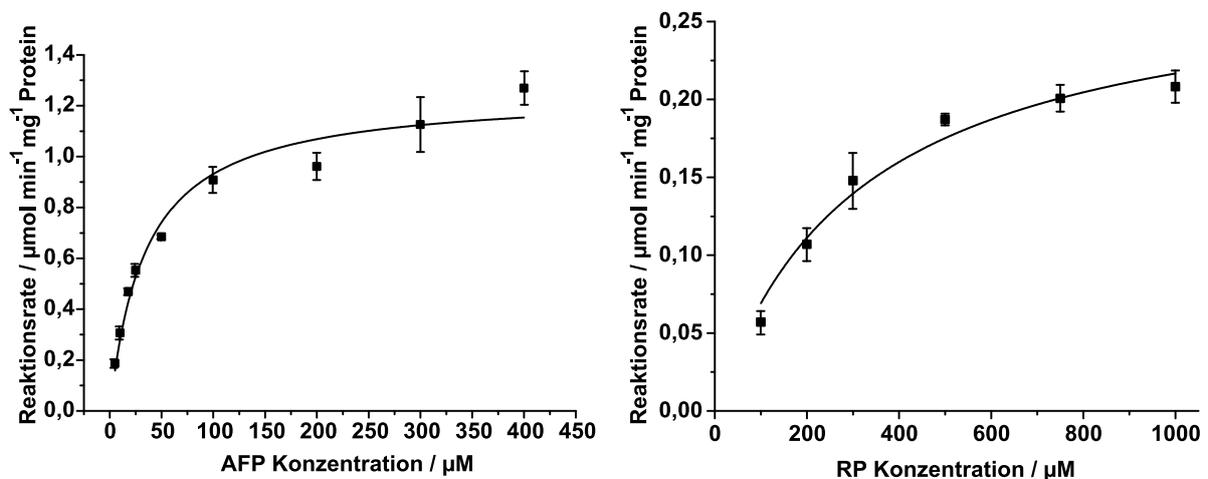


Abbildung 22. Bestimmung der kinetischen Parameter für die Dephosphorylierung von AFP (links) und RP (rechts). Variierende Konzentrationen von AFP (links; 5 – 400 μM) und RP (rechts; 100 – 1000 μM) wurden mit 0,6 μM RosC^{StrepN} inkubiert. Initiale Reaktionsraten in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) wurden gegen die eingesetzten Substratkonzentrationen aufgetragen. Kinetische Konstanten für AFP (links; $K_M = 34,5 \pm 5,6 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 1,25 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$) und RP (rechts; $K_M = 310,5 \pm 61,5 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 0,28 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$) wurden aus einem nicht-linearen Fit auf Basis der Michaelis Menten Gleichung abgeleitet.

Eine nicht-lineare Regression auf Basis der Michaelis-Menten Gleichung ergab kinetische Konstanten für AFP ($K_M = 34,5 \pm 5,6 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 1,25 \pm 0,06 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$) und RP ($K_M = 310,5 \pm 61,5 \mu\text{M}$ und $V_{\text{max}} = 0,28 \pm 0,02 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$). Die Konstante V_{max} ist die maximale Reaktionsrate der Reaktion und die Michaelis-Menten Konstante K_M diejenige Konzentration, bei der die Reaktionsrate halbmaximal ist. Anhand beider Parameter lassen sich Affinitäten von Enzym-Substratkomplexen abschätzen. Außerdem ist es möglich, Enzyme und die Umsetzung spezifischer Substrate anhand dieser Parameter zu vergleichen. Die Dephosphorylierung von AFP verläuft wesentlich schneller als die Dephosphorylierung von RP. Ein nahezu 10-fach geringerer K_M -Wert von AFP im Vergleich zu RP deutet auf eine höhere Affinität von RosC zu dem Substrat AFP hin.

5.5.6 Mutagenese der Phosphatbindetasche

Die Klassifizierung der RosC Primärstruktur durch InterPro (Finn *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 2018) stuft RosC als eine Histidin-Phosphatase ein und die Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 konnten als Teil des katalytischen Zentrums identifiziert werden (Abbildung 11 in Kapitel 5.3). Die Rolle dieser Aminosäuren in der Dephosphorylierung von AFP wurde mithilfe von Mutagenese-Experimenten untersucht. Im RosC Expressionsplasmid pPSG_IBA3 <rosC_{opt_N}> wurden Codons der oben genannten Aminosäuren einzeln in das Codon für Alanin (GCN), mithilfe des Quikchange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies), ausgetauscht (siehe Kapitel 4.2.7). Die ungeladene Methylgruppe von Alanin nimmt weniger Platz im katalytischen Zentrum des Enzyms ein und ist nicht in der Lage, Ladungen zu stabilisieren. Die gereinigten RosC^{StrepN}-Varianten (1,2 µM) wurden in einem *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest (200 µM AFP) untersucht (Kapitel 4.3.6.2). Die Bildung des Reaktionsproduktes AF wurde mithilfe der HPLC-DAD ($\lambda = 480$ nm) verfolgt (Kapitel 4.3.5.2). Spezifische Reaktionsraten wurden im linearen Bereich der AF-Bildung berechnet und mit der Aktivität von Wildtyp-RosC^{StrepN} verglichen (Abbildung 23).

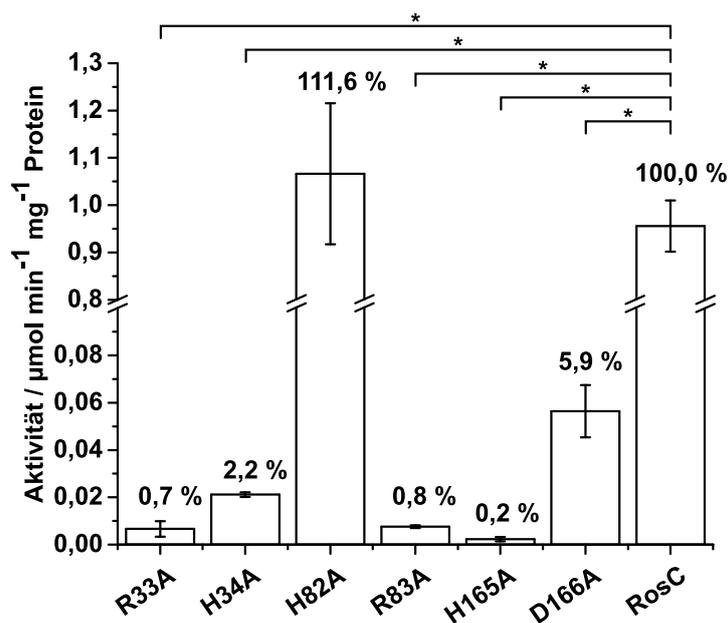


Abbildung 23. Die Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 sind essentiell für die RosC-Aktivität. Aktivitäten im *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest (200 µM AFP) der RosC^{StrepN}-Varianten R33A, H34A, H82A, R83A, H165A und D166A, im Vergleich zu Wildtyp RosC^{StrepN}, in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein} \pm \text{SD}$ ($n = 3$). Die Y-Achse ist für eine bessere Darstellung zwischen 0,1 und 0,8 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$ unterbrochen. Der Prozentanteil entspricht der Aktivität der RosC^{StrepN}-Varianten, normiert auf die Aktivität von Wildtyp-RosC^{StrepN}. Signifikanzanalysen wurden in einem Zweistichprobentest, unter Annahme unterschiedlicher Varianzen, durchgeführt (* $P \leq 0,005$).

Neben Wildtyp RosC^{StrepN} wurde eine RosC^{StrepN}-Variante H82A als Kontrolle verwendet. H82 wurde von InterPro nicht als katalytisch-bedeutende Aminosäure eingestuft (Kapitel 5.3).

Somit sollte eine Mutation dieser Aminosäure nicht zu einer verringerten Aktivität führen. Im *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest zeigten Mutationen in allen, von InterPro vorhergesagten, Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 (Abbildung 11 in Kapitel 5.3) signifikant reduzierte Aktivitäten. Für die RosC^{StrepN}-Varianten RosC^{StrepN} R33A und RosC^{StrepN} R83A konnten Aktivitäten unter 1 % der Aktivität von Wildtyp-RosC^{StrepN} ermittelt werden. Die Aktivität der Variante RosC^{StrepN} H165A sank sogar auf 0,2 % (Abbildung 23). RosC^{StrepN} H34A und RosC^{StrepN} D166A wiesen ebenfalls reduzierte Aktivitäten von 2,2 % bis 5,9 % auf, im Vergleich zu Wildtyp-RosC^{StrepN}. Für die Kontrolle (Variante RosC^{StrepN} H82A) wurde eine leicht erhöhte Aktivität, im Vergleich zu Wildtyp-RosC^{StrepN}, festgestellt. Unterschiede zwischen RosC^{StrepN} H82A und Wildtyp-RosC^{StrepN} erwiesen sich jedoch in einem Zweistichproben t-Test, unter der Annahme unterschiedlicher Varianzen, als nicht signifikant ($P \geq 0,313$). Die Mutation dieser Aminosäure beeinflusst demnach nicht die RosC^{StrepN}-Aktivität.

Die Variante RosC^{StrepN} R33A wies eine gelbliche Färbung der Enzymlösung bei der chromatographischen Reinigung auf. Alle weiteren RosC^{StrepN}-Varianten, einschließlich Wildtyp-RosC^{StrepN} sind farblos. Der Überstand einer TCA-gefällten Präparation der Variante RosC^{StrepN} R33A und von Wildtyp-RosC^{StrepN} wurden mittels HPLC-DAD analysiert (Kapitel 4.3.5.2) und mit Flavinstandards verglichen. In Abbildung 24 ist das Chromatogramm der HPLC-DAD-Analyse ($\lambda = 445$ nm), im Vergleich zu Flavinstandards, dargestellt.

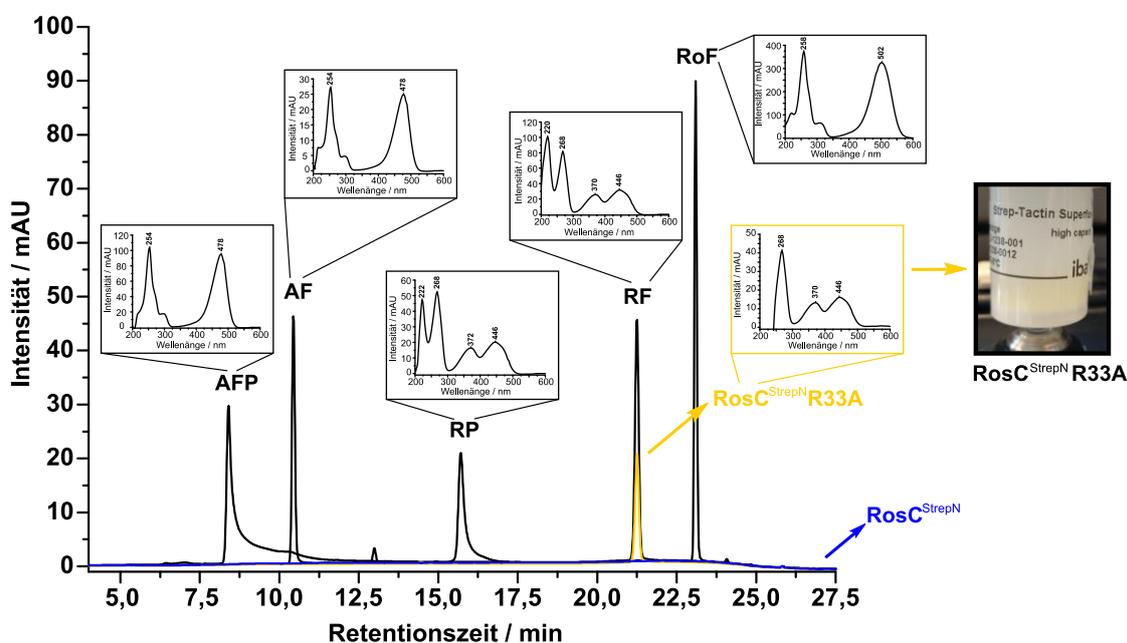


Abbildung 24. Die RosC^{StrepN}-Variante RosC^{StrepN} R33A bindet Riboflavin, im Gegensatz zu Wildtyp-RosC^{StrepN}. Chromatogramme der Überstände einer TCA-gefällten Präparation der Variante RosC^{StrepN} R33A (gelbe Linie) und von Wildtyp-RosC^{StrepN} (blaue Linie) in der HPLC-DAD-Analyse bei $\lambda = 445$ nm im Vergleich zu Flavinstandards (schwarze Linien). Einschübe: Absorptionsspektren der Peaks der Standard-Verbindungen (schwarz umrandet) und des Peaks bei 21,3 min der RosC^{StrepN} R33A-Variante (gelb umrandet) von $\lambda = 200$ nm bis $\lambda = 600$ nm. Bild rechts: Gebundenes RosC^{StrepN} R33A an einer Strep-Tactin Säule (gelbe Färbung) während der chromatographischen Aufreinigung.

Die farblose Enzympräparation von Wildtyp-RosC^{StrepN} bindet keine der analysierten Flavine. Im Chromatogramm der HPLC-DAD Analyse des Überstandes der TCA-gefällten Präparation wurden keine Peaks festgestellt (Abbildung 24). Im Gegensatz zu Wildtyp RosC^{StrepN}, konnte beim Vergleich des Chromatogramms der Variante RosC^{StrepN} R33A mit Flavinstandards (AFP, AF, RP, RF, RoF) ein Peak mit einer Retentionszeit von 21,3 min ermittelt werden. Die Retentionszeit ist identisch zu einem RF-Standard (Abbildung 24). Das Absorptionsspektrum dieses Peaks weist außerdem die typische RF-ähnliche Form auf, mit Absorptionsmaxima bei $\lambda = 268$ nm, 370 nm und 446 nm. Die analysierten Flavinstandards, beispielsweise AFP oder RP, sind durch ihre Retentionszeiten eindeutig von der RosC^{StrepN} R33A-Mutante unterscheidbar. Bis auf RP besitzen die analysierten Flavinstandards außerdem unterschiedliche Muster in den Absorptionsspektren. Die RoF-Intermediate AFP und AF besitzen Absorptionsmaxima bei $\lambda = 254$ nm und 478 nm und RoF bei $\lambda = 258$ nm und 502 nm (Abbildung 24). Die Fähigkeit der RosC^{StrepN}-Variante R33A, RF zu binden, kann durch Strukturanalysen untersucht werden. Zusätzlich zu der gelb-gefärbten Variante RosC^{StrepN} R33A (0,7 % aktiv) und Wildtyp-RosC^{StrepN}, wurde die farblose Variante RosC^{StrepN} H165A (0,2 % aktiv) dem Max-Planck-Institut für Biophysik (Dr. Ermler) für weitere Strukturanalysen zur Verfügung gestellt. Ein Vorteil der inaktiven RosC^{StrepN}-Varianten ist die Möglichkeit der Co-Kristallisation mit dem Substrat AFP ohne die Bildung des Hydrolyse-Produktes AF.

6 Diskussion

6.1 RosC katalysiert den letzten unbekanntesten Schritt der Roseoflavin-Biosynthese

Wie viele bekannte Verbindungen des Sekundärmetabolismus (Drew & Demain, 1977), wird das Antibiotikum RoF aus einer Verbindung des Primärmetabolismus produziert. Kurz nach der Entdeckung von RoF (Otani *et al.*, 1974) wurde RF als Vorstufe der RoF-Synthese identifiziert (Matsui *et al.*, 1979). Im Anschluss wurden die Verbindungen AF und MAF, durch Fütterungsversuche mit radioaktivem [2-¹⁴C]AF und [2-¹⁴C]MAF, als Intermediate des RoF-Stoffwechsels nachgewiesen (Juri *et al.*, 1987). Die Untersuchungen zur RoF-Biosynthese von Grill *et al.* (2008), Jankowitsch *et al.* (2011) und Schwarz *et al.* (2016) bestätigten RF als Vorstufe und AF und MAF als Intermediate (Grill *et al.*, 2008; Jankowitsch *et al.*, 2011; Schwarz *et al.*, 2016). Außerdem wurden die RoF-Intermediate OHC-RP, HOOC-RP und AFP entdeckt (Schwarz *et al.*, 2016). Darüber hinaus konnten in diesen Arbeiten die ersten drei Enzyme der Roseoflavin-Biosynthese (RibCF, RosA und RosB) charakterisiert werden. Mit der Entdeckung der fehlenden AFP-Phosphatase RosC, in dieser Arbeit, ist die Lücke im RoF-Stoffwechsel geschlossen und die Biosynthese von RoF, ausgehend von RF, vollständig aufgeklärt.

Innerhalb dieser Arbeit wurde das Phosphatasegen *rosC* (BN159_8033) mittels eines gekoppelten *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtests im *rosA*-Cluster (Gene BN159_8026 bis BN159_8035) von *S. davaonensis* direkt strangabwärts von *rosA* (BN159_8032) lokalisiert. Gendelektionen von *rosC* im *S. davaonensis* Chromosom resultierten in Deletionsstämmen (*S. davaonensis* ΔBN159_8033), die durchschnittlich 70 % geringere RoF-Produktionsraten aufwiesen, im Vergleich zu *S. davaonensis* Wildtyp, und *in vitro* keine AFP-Phosphataseaktivität mehr besitzen. In Experimenten mit Komplementationsstämmen konnten wildtyp-ähnliche Stämme generiert werden. Das Gen BN159_8033 und sein Genprodukt sind folglich für die Dephosphorylierung von AFP im RoF-Stoffwechsel verantwortlich. Die neuentdeckte Phosphatase wurde nach RosA und RosB als das dritte Ros-Enzym im RoF-Stoffwechsel entdeckt und wurde deshalb RosC benannt. Sein korrespondierendes Gen BN159_8033 wurde *rosC* genannt.

Eine Gendelektion von *rosC* im *S. davaonensis* Chromosom führt zu verringerten RoF-Mengen aber nicht zum vollständigen Verlust der RoF-Produktion. Dieses Ergebnis spricht für die Anwesenheit von mindestens einer unspezifischen Phosphatase in *S. davaonensis* mit dem Potential, AFP zu spalten. Auf Basis der Transkriptomanalyse von Kissling *et al.* (2020) konnten in *S. davaonensis* Phosphatasen aus der HAD-Enzym-Familie identifiziert werden, welche in der stationären Wachstumsphase (der RoF-Produktionsphase) überexprimiert sind (Kapitel 6.6). HAD-Enzyme akzeptieren eine Vielzahl an phosphorylierten Metaboliten (Kuznetsova *et al.*, 2006). Möglicherweise akzeptieren sie auch das, dem Cofaktor RP nah

verwandte, AFP mit einer geringen katalytischen Aktivität. Da *S. davaonensis* Δ rosC Stämme im *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest auch nach 17 h Reaktionsdauer keine AFP-Dephosphorylierung zeigten, machen sich diese unspezifischen Phosphatasen wahrscheinlich nur innerhalb der langen Kultivierungszeit von 7 Tagen bemerkbar aber nicht im *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest. Phosphatgruppen kommen im Metabolom von Bakterien sehr häufig vor (Nobeli *et al.*, 2003) und dementsprechend häufig sind Phosphatasen im Proteom eines Organismus. Eine „Hydrolase“- und „Phosphatase“-Stichwortsuche im UniProt-Verzeichnis von *S. davaonensis* (The Uniprot Consortium, 2018) ergab 328 Treffer für Hydrolasen und davon 149 Treffer für Phosphatasen; dies entspricht circa 1,8 % des Proteoms von *S. davaonensis* (Tabelle 36).

Tabelle 36. „Hydrolase“ und „Phosphatase“ Stichwort-Suche im UniProt-Verzeichnis von *S. davaonensis*.

Kodierende Sequenzen	Hydrolasen	Davon Phosphatasen
8503 (Jankowitsch & Schwarz <i>et al.</i> , 2012)	328 (The Uniprot Consortium, 2018)	149 (The Uniprot Consortium, 2018)

Von 8503 kodierenden Sequenzen in *S. davaonensis* sind 2032 mit unbekannter Funktion (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Mögliche Phosphatasen, die durch die automatische Annotation nicht oder nicht korrekt erfasst wurden, sind nicht aufgeführt. Auch das neuentdeckte RosC (BN159_8033) ist im UniProt-Verzeichnis als „uncharakterisiertes Protein“ aufgeführt. Vermutlich befinden sich im *S. davaonensis* Proteom also noch mehr falsch- oder nicht-annotierte Phosphatasen.

Alle RoF-Gene, einschließlich *rosC*, sind ebenfalls im nah verwandten RoF-Produzenten *S. cinnabarinus* zu finden. Sequenzvergleiche mit *S. coelicolor*, *E. coli* und *B. subtilis* zeigten keine weiteren vergleichbaren Übereinstimmungen. Das Vorhandensein eines RosC-Homologes in *S. cinnabarinus* aber nicht in den anderen untersuchten Organismen untermauert die Hypothese, dass RosC eine einzigartige Rolle im RoF-Stoffwechsel spielt.

6.2 Die Roseoflavin-Biosynthesegene sind nicht in einem Cluster arrangiert

In früheren Arbeiten zur RoF-Biosynthese konnte für BN159_8033 eine 30 % ige Ähnlichkeit der Aminosäurepositionen 62 bis 202 zu einer Fruktose-2,6-biphosphatase aus *Pelotomaculum thermopropionicum* ermittelt werden (Jankowitsch *et al.*, 2011). Eine Verbindung zum RoF-Stoffwechsel konnte nicht hergestellt werden. Erst nachdem das Schlüsselenzym der RoF-Biosynthese, eine AFP-Synthase RosB, entdeckt und dessen

Reaktionsprodukt AFP identifiziert wurde, gelangte die fehlende Phosphatase in den Vordergrund (Schwarz *et al.*, 2016). Das Phosphatasegen *rosC* (BN159_8033) befindet sich interessanterweise direkt strangabwärts von *rosA* (BN159_8032). Die beiden Gene befinden sich also in einer Gengruppe (sog. Gencluster oder Operon) und bilden eine Transkriptionseinheit (Kissling *et al.*, 2020). Eine Vielzahl der Antibiotika-Biosynthesegene in Streptomyceten sind in Gencluster auf dem Chromosom oder auf einem Plasmid lokalisiert und können zusammen mit Resistenzgenen oder Genen für den Export des Antibiotikums angeordnet sein (Cundliffe, 1989). Das 26 kb Gencluster des Polyketid-Antibiotikums Actinorhodin von *S. coelicolor* beinhaltet beispielsweise zusätzlich Gene zur Resistenz (Malpartida & Hopwood, 1986; Rudd & Hopwood, 1979) und zum Export des Antibiotikums (Tahlan *et al.*, 2007). Die Biosynthesegene der beiden weiteren Antibiotika Undecylprodigiosin und Methylenomycin A aus *S. coelicolor* sind ebenfalls in Clustern arrangiert, entweder auf dem Chromosom oder auf dem linearen Plasmid (Rudd & Hopwood, 1980; Kirby & Hopwood, 1977). Das Gen *rosB* ist nicht zusammen mit *rosA* und *rosC* in einem Gen-Cluster lokalisiert. Die Tatsache, dass die RoF-Biosynthesegene nicht in einer vollständigen Gengruppe lokalisiert sind, ist erschwerend für eine Identifizierung möglicher zugehöriger RoF-Gene (beispielsweise Gene für den Export). Ein Abstand von circa 48 kb zwischen den Biosynthesegenen *rosB* und *rosA/rosC* ist jedoch nicht ungewöhnlich. Die 50 Biosynthesegene des Makrolidantibiotikums Spiramycin aus *Streptomyces ambofaciens* sind beispielsweise auf einem 85 kb chromosomalen DNA-Fragment verteilt (Karray *et al.*, 2007) und in dem Organismus *Actinosynnema pretiosum* konnten zwei Biosynthese-Cluster (zusammen 48 Gene), mit einem Abstand von circa 30 kb, für das Antitumormittel Ansamitocin aus der Maytansinfamilie identifiziert werden (Yu *et al.*, 2002). Für die Biosynthese der beiden genannten Verbindungen, Spiramycin und Ansamitocin, werden mit circa 50 Genen wesentlich mehr Gene benötigt, als für das Antibiotikum Roseoflavin (vier Gene, einschließlich *ribCF* aus dem Primärmetabolismus).

Durch die Verteilung der drei RoF-Gene *rosA*, *rosB* und *rosC* innerhalb eines chromosomalen Bereiches von circa 48 kb in *S. davaonensis* ist die Identifizierung eines RoF-Exporters (falls vorhanden) schwierig. Bislang konnte kein RoF-Exportsystem identifiziert werden. Gene für den Export befinden sich häufig in der räumlichen Nähe zu den Biosynthesegenen. Oft befinden sich die Gene in einem Gen-Cluster mit Biosynthesegenen und tragen teilweise zur Resistenz bei (Cundliffe, 1989; Tahlan *et al.*, 2007; Menges *et al.*, 2007). Es ist nicht bekannt, ob das Gen für den RoF-Export innerhalb des 48 kb Bereiches zwischen *rosB* und *rosA/rosC* lokalisiert ist oder ob es sich in einer größeren Distanz zu den bekannten RoF-Genen befindet. Vergangene Arbeiten der AG Mack identifizierten ein 106 kb *S. davaonensis* Fragment (pESAC13-SD106kb), das vermutlich alle Gene für die RoF-Biosynthese enthält. Die heterologe Expression des Fragmentes führte zu einer RoF-Produktion in *S. coelicolor* M1152

(Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Die Untersuchung des RoF-Exportsystems von *S. davaonensis* könnte durch heterologe RoF-Produktion putativer Transportgene in dem schnell wachsenden Actinobacterium *Corynebacterium glutamicum* durchgeführt werden. *C. glutamicum* ist RoF-resistent und zur heterologen RoF-Produktion fähig (Mora-Lugo *et al.*, 2019). Die Integration und Expression der RoF-Gene *rosB*, *rosA* und *rosC*, mithilfe eines integrativen Plasmides, kann die Basis des Experimentes sein. Verschiedene Kandidatengene für den Export, beispielsweise putative Transportergene aus pESAC13-SD106kb, können in ein Plasmid hinter einen IPTG-induzierbaren Promoter kloniert werden (Kirchner & Tauch, 2003). Anhand von Wachstumskurven, kombiniert mit der Überwachung der RoF-Synthese (Vergleich induziert-nicht induziert), können erste Anhaltspunkte über die Effizienz eines möglichen RoF-Exportsystems gewonnen werden. Die anschließende Quantifizierung der RoF-Levels innerhalb und außerhalb der Zelle und die Berechnung des RoF-Verhältnisses liefern weitere Hinweise.

Die RF-Biosynthese und dessen Verbindung zur RoF-Biosynthese ist Teil weiterer Forschung in der AG Mack. Neben den RoF-Biosynthesegenen sind auch die Gene für die RF-Biosynthese in *S. davaonensis* im Genom verteilt (Kissling *et al.*, 2020). In den Genomen der RoF-Produzenten *S. davaonensis* und *S. cinnabarinus* konnten insgesamt 23 bzw. 21 Gene für die Synthese von RP und FAD, ausgehend von GTP, lokalisiert werden. Es gibt ein Biosynthesecluster *ribE1MAB5H*, das durch einen RoRP-resistenten RP-Riboswitch kontrolliert ist (Pedrolli *et al.*, 2012). Für die Synthese von RP ausgehend von GTP sind mindestens 7 Gene/Enzyme notwendig. Eine Erklärung für die große Differenz zwischen benötigten Genen/Enzymen und vorhandenen Genen/Enzymen ist, dass beide Stämme das RF-Analogon RoF produzieren und deshalb einen gesteigerten Bedarf an der RoF-Vorstufe RP haben (Kissling *et al.*, 2020).

Zusätzlich zu der hohen Anzahl an RF-Genen besitzt *S. davaonensis* die beiden Gene BN159_7987 und BN159_7988, welche sich direkt strangaufwärts des RoF-Gens *rosB* befinden (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012). Eine frühere Arbeit von Elspaß (2014) konnte zeigen, dass die beiden Gene wahrscheinlich für ein RF-Aufnahmesystem codieren. In dem ABC-Transporter-System ist BN159_7987 die Transmembrankomponente und BN159_7988 die Substratbindekomponente. Eine ATP-bindende Kasette wurde nicht identifiziert (Elspaß, 2014). *S. davaonensis* besitzt neben RibM, dessen Gen sich innerhalb des Riboswitch-kontrollierten *ribE1MAB5H*-Operons in *S. davaonensis* befindet (Hemberger *et al.*, 2011), folglich ein zweites RF-Transportsystem. Homologe sind ebenfalls im RoF-Produzenten *S. cinnabarinus* enthalten. Das Vorkommen mehrerer RF-Transportsysteme in einer bakteriellen Spezies, zusätzlich zu RF-Biosynthesegenen, wurde auch innerhalb der Studie zu RF-Transporter von Gutierrez *et al.* (2015) beschrieben. Beispielsweise besitzt das α -Proteobakterium *Ochrobactrum anthropi* zwei RF-Transportsysteme, ein RibN-Ortholog und

ein RfnT-Element (Gutierrez-Preciado *et al.*, 2015). Ein Vorkommen mehrerer RF-Transportsysteme in Actinobakterien wurde nicht beschrieben. Eine Aufnahme von RF aus der Umgebung hat den Vorteil, dass RF schnell bereitgestellt werden und gleichzeitig metabolische Energie gespart werden kann (Gutierrez-Preciado *et al.*, 2015). Der RoF-Produzent *S. davaonensis* besitzt einen hohen Bedarf an RF, der vermutlich nur durch die zwei RF-Transporter, zusätzlich zu der RF-Biosynthese, gedeckt werden kann. In einer Transkriptomanalyse von *S. davaonensis* konnte eine Hochregulierung der Gene sowohl für RF-Transporter als auch für RF-Biosynthesegene in der stationären Phase detektiert werden (Kissling *et al.*, 2020). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass in der stationären Wachstumsphase RF tatsächlich sowohl aus der Umgebung aufgenommen als auch endogen produziert wird. Die effiziente Aufnahme verbleibenden Riboflavins aus der Umgebung in Kombination mit einer RoRP-induzierten RF-Auxotrophie könnte auch ein Überlebensvorteil von *S. davaonensis* gegenüber Konkurrenten in seinem natürlichen Habitat, dem Erdboden, sein.

6.3 RosC Reinigung aus *E. coli* und Bestimmung der RosC-Aktivität

Für eine biochemische Charakterisierung der neuentdeckten Phosphatase RosC wurde *rosC* in *E. coli* exprimiert. Die G+C Gehalte von *S. davaonensis* (70,58 %) (Jankowitsch & Schwarz *et al.*, 2012) und dem Expressionswirt *E. coli* (50,8 %) (Blattner *et al.*, 1997) und ihre Codon-Verwendung unterscheiden sich deutlich. Deshalb wurde die Nukleotidsequenz von BN159_8033 für *E. coli* codonoptimiert. Zur vereinfachten Reinigung des Enzyms RosC wurden Nukleotide, welche für einen Strep-Tag II, an das 5'-Ende der optimierten *rosC*-Sequenz hinzugefügt. Einige Strategien zur Verwendung und Entfernung von Affinitäts-Tags sind im Review-Artikel von Arnau *et al.* (2006) ausführlich zusammengefasst. Die Verwendung eines Affinitäts-Tags, wie Strep-Tag II, stellt eine erhebliche Vereinfachung der chromatographischen Reinigung eines Proteins dar, ohne seine biochemischen Eigenschaften im Detail zu kennen (Arnaud *et al.*, 2006). Zahlreiche weitere Vorteile in der Verwendung eines Affinitäts-Tags sind unter anderem eine erhöhte Ausbeute oder eine verbesserte Löslichkeit des Proteins. Mögliche negative Auswirkungen von Protein-Tags sind eine Toxizität des Proteins oder ein Aktivitätsverlust, durch eine veränderte Proteinkonformation (Arnaud *et al.*, 2006). Nach Angaben des Herstellers des Strep-Tactin-Systems, IBA Lifesciences (Göttingen), ist eine Inhibition des Enzyms durch einen Strep-Tag II, beispielsweise durch eine fehlerhafte Proteinkonformation, unwahrscheinlich. Bislang wurde noch kein RoF-Enzym mithilfe eines Strep-Tags II am N-Terminus chromatographisch gereinigt. Das Enzym RosA wurde beispielsweise durch die Verwendung eines C-terminalen Poly-His-Tags durch Nickel-Affinitätschromatographie gereinigt (Jankowitsch *et al.*, 2011). Ein Aktivitätsverlust eines C-terminalen His₆-Tags von RosA wurde durch eine Expression von RosA und RosA-His₆ in

E. coli und anschließendem Vergleich der Aktivitäten der zellfreien Extrakte ausgeschlossen. Voraussetzung dafür ist ein einheitliches Verhältnis von RosA und RosA-His₆ zum restlichen Proteom. Dieses Verhältnis ist nur durch Abschätzung der Intensivität der Proteinbande auf einer SDS-PAGE möglich (Jankowitsch *et al.*, 2011). Um das Enzym RosC bestmöglich mit den bereits charakterisierten Enzymen der RoF-Biosynthese RibCF, RosA und RosB zu vergleichen, wurde der N-terminale Strep-Tag II von RosC^{StrepN} entfernt. Die Faktor Xa-Erkennungssequenz am 3'-Ende der Nukleotidsequenz für den Strep-Tag II und am 5'-Ende der *rosC*-Sequenz ermöglichte eine vollständige Entfernung des Strep-Tag II (Arnau *et al.*, 2006). Ein, am N-Terminus fusionierter, Strep-Tag II führte nicht zu einer verringerten RosC-Aktivität. Gleichzeitig ermöglichte ein Strep-Tag II eine einstufige Aufreinigung eines Proteins bis zu einer nahezu vollständigen Reinheit des Proteins.

Neben dem natürlichen Substrat AFP konnte in dieser Arbeit auch eine RosC-katalysierte Dephosphorylierung von RoRP ermittelt werden. RoRP entsteht im RoF-Stoffwechsel durch die Phosphorylierung von RoF durch promiskuitive Flavokinasen im Cytoplasma (Pedrolli *et al.*, 2011). RoRP kann Flavoproteine und RP-Riboswitches binden und die Zielzelle dadurch negativ beeinflussen (Ott *et al.*, 2009; Mansjö & Johansson, 2011; Pedrolli & Mack, 2014). Aufgrund limitierter Mengen an RoRP konnten keine kinetischen Untersuchungen durchgeführt werden. Für zukünftige Untersuchungen könnte die Verbindung durch die Inkubation von kommerziell erhältlichem RoF mit einer humanen Flavokinase synthetisiert und anschließend durch eine präparative HPLC-Analyse gereinigt werden (Pedrolli *et al.*, 2011). Um die Qualität der beiden Substrate AFP und RoRP zu vergleichen, müssten die maximale Reaktionsgeschwindigkeit und weitere kinetische Parameter bestimmt werden. Die Verbindung RoRP besitzt an der C8-Position eine voluminöse Dimethylaminogruppe, AFP besitzt an dieser Stelle eine Aminogruppe. Inwiefern die Dimethylaminogruppe von RoRP in der Substratbindetasche stabilisiert wird, könnte durch eine Strukturanalyse von RosC geklärt werden. Es ist fraglich, ob die Dephosphorylierung von RoRP durch RosC *in vivo* katalysiert wird und so durch geringere RoRP-Level in der Zelle zu der RoF-Resistenz in *S. davaonensis* beiträgt. Pedrolli *et al.* (2012) kultivierten sowohl den RoF-Produzenten *S. davaonensis* als auch den RoF-sensitiven *S. coelicolor* in Gegenwart von 50 µM RoF und detektierten vergleichbare Levels der Cofaktoranaloga RoRP und RoFAD in zellfreien Extrakten beider Kulturen (Pedrolli *et al.*, 2012). Inwiefern Flavoproteine von *S. davaonensis* vor RoRP und RoFAD geschützt werden ist bislang noch unbekannt.

Die RosC-katalysierte Dephosphorylierung des wichtigen Cofaktors RP verlief wesentlich langsamer im Vergleich zu AFP und RoRP. Wahrscheinlich kann die neutrale Methylgruppe von RP als Ligand am C8 des Isoalloxazinring-Systems schlecht von vermutlich geladenen Aminosäureresten der Substratbindetasche stabilisiert werden. In dieser Arbeit konnte ein annähernd 10-fach höherer K_M -Wert für RP im Vergleich zu AFP ermittelt werden. Bennet *et*

al. (2009) ermittelten absolute Metabolitkonzentrationen für *E. coli* und konnten unter anderem eine RP-Konzentration von $5,4 \times 10^{-5}$ M (entspricht 54 μ M) in einer *E. coli*-Zelle detektieren (Bennett *et al.*, 2009). Der in dieser Arbeit ermittelte K_M -Wert für die Dephosphorylierung von RP entspricht demnach etwa der 6-fachen RP-Konzentration in der Zelle. RP ist folglich kein gutes Substrat für RosC und die Reaktion läuft in der Zelle vermutlich nicht ab. Dieses Ergebnis ist von großer Bedeutung, da eine Hydrolyse von RP in Kombination mit der Flavokinase-Reaktion von RibCF im Primärmetabolismus (Synthese von RP aus RF und ATP (Grill *et al.*, 2008)) einen sogenannten „nutzlosen Kreislauf“ (*futile cycle*) darstellen würde. Katabole und anabole Reaktionen würden gleichzeitig ablaufen und zu einer Energieverschwendung in der Zelle beitragen.

Neben AFP, RoRP und RP konnten keine weiteren Substrate für RosC identifiziert werden. Eine Dephosphorylierung der Verbindungen GTP (eine RF-Vorstufe und ein essentieller zellulärer Baustein) und ARPP (ein Intermediat im RF-Stoffwechsel) wurde nicht festgestellt. Eine Voraussetzung für die Bindung des Substrates an RosC ist wahrscheinlich ein intaktes Isoalloxazinring-System. Die chemischen Strukturen von ARPP und GTP ähneln entfernt den Strukturen von RF und RoF; die Ähnlichkeit ist aber offenbar nicht ausreichend, um in der Substratbindetasche von RosC stabilisiert zu werden. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es sich bei RosC um eine sehr spezifische Phosphatase handelt. Die Substratspezifität von Phosphatasen ist sehr unterschiedlich (Rigden, 2008). Während HAD-Phosphatasen im RF-Stoffwechsel der Organismen *E. coli* und *B. subtilis* ein breites Substratspektrum aufweisen und unter anderem den RF-Vorläufer GTP dephosphorylieren (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015), konnte beispielsweise in der Pflanze *A. thaliana* eine ARPP-Phosphatase mit sehr hoher Substratspezifität identifiziert werden (Sa *et al.*, 2016).

6.4 RosC ist ein Mitglied der Histidin-Phosphatase Superfamilie

Erste Einblicke in den Reaktionsmechanismus von RosC und dessen Struktur wurden durch eine *in silico* Analyse der Primärstruktur erhalten. Mithilfe des InterPro-Tools (Finn *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 2018) konnte RosC als ein Mitglied der Histidin-Phosphatase Superfamilie, Bereich 1, identifiziert werden. Histidin-Phosphatasen sind im Review-Artikel von Rigden (2008) ausführlich beschrieben. Die best-charakterisierten Mitglieder aus Bereich 1 der Histidin-Phosphatase-Superfamilie sind Fruktose-2,6-Biphosphatase und die Cofaktor-abhängige Phosphoglyceratmutase. Die meisten Mitglieder dieser Gruppe sind Phosphatasen, beispielsweise die bakterielle Proteinphosphatase SixA aus *E. coli*, und besitzen hochkonservierte Histidin- oder Argininreste innerhalb der Phosphattasche (Rigden, 2008). Tatsächlich sind die von InterPro vorausgesagten Aminosäuren R33, H34, R83, H165 im Sequenzvergleich der RosC-Primärstruktur mit repräsentativen Phosphatasen

hochkonserviert und ihr Austausch gegen Alanin (A) führte zu signifikant reduzierten RosC-Aktivitäten. Hingegen konnte keine Konservierung der vorausgesagten Aminosäure D166 in den untersuchten Phosphatasen ermittelt werden. Da die RosC^{StrepN} D166A-Mutante ebenfalls reduzierte RosC-Aktivitäten zeigte, handelt es sich vermutlich um den Protonendonator der Reaktion. Die Lage der möglichen Protonendonatoren in Histidin-Phosphatasen ist nicht immer konserviert (Rigden, 2008). Das InterPro-Tool des EMBLs konnte eine sehr präzise Vorhersage der RosC-Struktur bezüglich des katalytischen Zentrums liefern. Die Variante RosC^{StrepN} H165A wies im *in vitro* AFP-Phosphatase-Enzymtest eine Aktivität von 0,2 % auf, während die Variante RosC^{StrepN} H34A noch 2,2 % aktiv war, verglichen mit Wildtyp RosC^{StrepN} (Kapitel 5.5.6). Dieses Ergebnis führt zu der Vermutung, dass H165 der zentrale Histidinrest von RosC ist. In der Phosphohistidin-Phosphatase SixA wird das Histidin innerhalb einer hochkonservierten Region aus einem benachbarten Arginin (R7) und einem Histidin (H8) während der Reaktion phosphoryliert (Rigden, 2008). Die hohe Konservierung der Region R33 und H34 in RosC spricht entsprechend für H34 als zentrales Histidin. Die anderen voluminösen, geladene Reste der basischen Aminosäuren Arginin (R33 und R83) können negative Ladungen in der Phosphattasche stabilisieren. Die sauren Aminosäure Asparaginsäure (D166) kann als ein Protonendonator während der Dephosphorylierung fungieren. Der hypothetische Mechanismus der Dephosphorylierung von RosC und die Rolle der Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 sind in Abbildung 25 in Anlehnung an Rigden (2008) dargestellt.

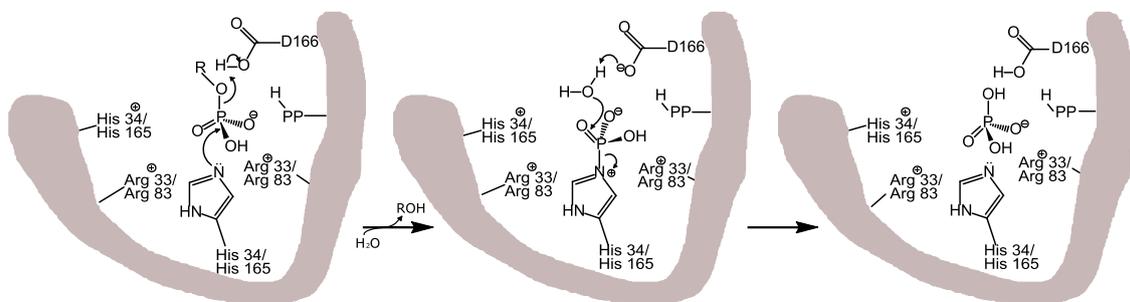


Abbildung 25. Hypothetischer Mechanismus der Dephosphorylierungsreaktion in RosC in Anlehnung an Rigden (2008). H34 (oder H165) wird während der Reaktion phosphoryliert. Die anderen Aminosäuren R33, R83 und H165 (oder H34) bilden die Phosphattasche und interagieren mit der Phosphatgruppe während des Transfers. Der Asparaginsäurerest D166 fungiert vermutlich als Protonendonator. Die Anwesenheit möglicher weiterer Aminosäuren in der Phosphattasche ist mit der Abkürzung PP-H verdeutlicht.

Die Bedeutung der katalytisch essentiellen Aminosäuren R33, H34, R83, H165 und D166 kann durch eine Strukturanalyse untermauert werden und es könnten wichtige weitere Aminosäurereste identifiziert werden. Die generierten RosC-Varianten können mit den Substraten AFP und RP co-kristallisiert werden und die Struktur von AFP/RP-gebundenem RosC analysiert werden, sodass ein Einblick in die Unterscheidung zwischen dem natürlichen Substrat AFP und dem wichtigen Cofaktor RP ermöglicht wird (Kooperation mit dem Max-

Planck-Institut für Biophysik). Neben einer präzisen Vorhersage des katalytischen Zentrums von Histidin-Phosphatasen, variieren Aminosäuren in der Substratbindestelle enzyspezifisch. Eine Identifizierung der Substratbindestelle ist deshalb nur durch Strukturanalysen möglich (Rigden, 2008). Ohne die Analyse der Struktur konnten auch bei RosC keine Aminosäuren vorausgesagt werden, welche das Isoalloxazinring-System von AFP oder die Aminogruppe am C8 des Ringsystems stabilisieren (beispielsweise durch die Stabilisierung der positiven Ladung). Die Identifizierung dieser Aminosäuren ist essentiell zur Aufklärung der Frage, wie RosC zwischen RP und AFP unterscheidet.

Bei der Aufreinigung der Variante RosC^{StrepN} R33A fiel eine gelbe Farbe der Enzympräparation auf. Alle weiteren RosC^{StrepN}-Varianten, einschließlich Wildtyp-RosC^{StrepN} waren farblos. HPLC-DAD Analysen identifizierten die gelbe Farbe, durch die Retentionszeit des Peaks im Chromatogramm und dessen Absorptionsspektrum, als RF. In *E. coli* überproduziertes RosB wies, je nach Reinigungsprotokoll, eine intensiv orangene Farbe auf, die hauptsächlich auf das gebundene Reaktionsprodukt AFP zurückzuführen war (Konjik, 2017). Auch das Enzym RosA wies eine gelbliche Färbung nach der chromatographischen Reinigung auf, welche im Anschluss als RF identifiziert werden konnte (Jankowitsch, 2012). Ob der Austausch R33A in RosC^{StrepN} eine Bindung von RF begünstigt, kann durch Strukturanalysen und Co-Kristallisation mit RF untersucht werden. Die Varianten RosC^{StrepN} (Wildtyp), RosC^{StrepN} R33A (gelbe, inaktive Variante) und RosC^{StrepN} H165A (farblose, inaktive Variante) wurden dem Max-Planck-Institut für Biophysik für Strukturanalysen zur Verfügung gestellt.

6.5 Die Phosphatase RosC im Roseoflavin-Stoffwechsel von *S. davaonensis*

Mit der Identifizierung des letzten unbekanntes RoF-Biosyntheseenzym RosC ist erstmals ein Vergleich aller vier RoF-Biosyntheseenzyme (RibCF, RosA, RosB, und RosC) und ihrer korrespondierenden Gene möglich (Tabelle 37). In einer Transkriptomanalyse von *S. davaonensis* wurden Transkripte der Gene *rosA*, *rosB* und *rosC* in vergleichbar hohen Levels detektiert (Kissling *et al.*, 2020). In *S. davaonensis* ist die Genexpression von *rosC* in der stationären Wachstumsphase (der RoF-Produktionsphase) über 32-fach hochreguliert (Tabelle 37). Für die beiden weiteren RoF-Biosynthesegene konnten ähnlich hohe Werte ermittelt werden, wobei *rosB* eines der stärksten exprimierten Gene in der stationären Phase darstellt. Das *ribCF* Gen ist in beiden Wachstumsphasen stark exprimiert (Tabelle 37). Vermutlich unterstützt RibCF die Bereitstellung von Flavoproteinen in der exponentiellen Phase und in der stationären Phase wird anschließend die Bereitstellung der RoF-Vorstufe Riboflavin-5'-Phosphat durch RibCF garantiert (Kissling *et al.*, 2020).

Tabelle 37. Eigenschaften der Roseoflavin-Biosynthesegene und Biosyntheseenzyme von *S. davaonensis*.

Eigenschaft	RibCF	RosB	RosC	RosA
Substrat	RF	RP	AFP	AF
Intermediat	Kein	OHC-RP HOOC-RP	Kein	MAF
Produkt	RP	AFP	AF	RoF
V_{\max}	0,50 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1} (Grill <i>et al.</i> , 2008)	0,44 \pm 0,01 nmol min^{-1} mg^{-1} (Schwarz <i>et al.</i> , 2016)	1,25 \pm 0,06 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1} (Diese Arbeit)	0,58 \pm 0,03 $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg^{-1} (Jankowitsch <i>et al.</i> , 2011)
K_M	40 μM (Grill <i>et al.</i> , 2008)	< 20 μM (Schwarz <i>et al.</i> , 2016)	34.5 \pm 5.6 μM (Diese Arbeit)	57.7 \pm 9.2 μM (Jankowitsch <i>et al.</i> , 2011)
Hochregulierung in der Stationärphase	Keine (Kissling <i>et al.</i> , 2020)	>128-fach (Kissling <i>et al.</i> , 2020)	>32-fach (Kissling <i>et al.</i> , 2020)	>32-fach (Kissling <i>et al.</i> , 2020)

Es gibt Hinweise auf einen möglichen Enzymkomplex aus den Enzymen RosB, RosA und RosC, wobei RosA vermutlich den Kern dieses Komplexes darstellt. Eine Interaktion mit dem Enzym RibCF wurde nicht festgestellt. Zusätzlich konnte eine Autointeraktion von RosC festgestellt werden (Schneider *et al.*, unveröffentlicht), welche sich mit den Gelfiltrationsexperimenten dieser Arbeit decken. Die Interaktion zwischen RosB, RosA und RosC ist ein weiteres Argument für die Beteiligung von RosC im RoF-Stoffwechsel in *S. davaonensis*.

Während sich die maximalen Reaktionsraten von RibCF, RosC und RosA in einer vergleichbaren Größenordnung im mikromolaren Bereich befinden (wobei RosC doppelt so schnell ist wie RibCF und RosA, siehe Tabelle 37), liegt die Reaktionsrate von RosB drei Größenordnungen niedriger, im nanomolaren Bereich. Ausgehend von den Daten aus Tabelle 37 scheint die komplizierte RosB-Reaktion von RP zu AFP daher der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der RoF-Biosynthese in *S. davaonensis* zu sein und könnte Teil einer Regulation sein. Inwiefern die niedrige ermittelte RosB-Reaktionsrate mit RibCF, RosC und RosA vergleichbar ist kann erst durch die Identifizierung des möglicherweise fehlenden Cofaktors von RosB beantwortet werden (Konjik & Brunle *et al.*, 2017). In vorausgegangenen Arbeiten konnten bereits einige mögliche Cofaktor-Kandidaten bestimmt werden. Thiamin und dessen Analoga scheinen geeignete Kandidaten zu sein (Schwarz *et al.*, 2016; Konjik & Brunle *et al.*, 2017). Bislang wurde aber noch kein eindeutiger Cofaktor identifiziert, welcher mit den Strukturanalysen von RosB im Einklang ist. Möglicherweise liegt

die Reaktionsrate der RosB-Reaktion höher, sobald ein Cofaktor identifiziert wird (falls vorhanden) und dem RosB-Enzymtest zugefügt wird.

RosC katalysiert die schnellste Reaktion der RoF-Biosynthese in *S. davaonensis* (Tabelle 37). Auch in *E. coli* ist die Dephosphorylierung von ARPP der schnellste Schritt der RF-Biosynthese (Haase *et al.*, 2013). Inwiefern die schnelle RosC-Reaktion das Enzym RosB in *S. davaonensis in vivo* beeinflusst ist noch nicht bekannt. Frühere Arbeiten beschrieben eine sehr intensive orange Farbe des überproduzierten, rekombinanten RosB aus *E. coli*, abhängig vom Reinigungsprotokoll. Diese orange Substanz konnte durch HPLC-MS-Analysen hauptsächlich als AFP identifiziert werden, mit Spuren der Intermediate HOOC-RP und OHC-RP und des Substrats RP (Konjik, 2017). Anders als in *S. davaonensis*, wird im Expressionswirt *E. coli* jedoch das RosB-Reaktionsprodukt AFP nicht direkt durch eine Phosphatase zu AF metabolisiert (Schwarz *et al.*, 2016). Inwieweit die Bindung von AFP an RosB *in vivo* im RoF-Produzenten *S. davaonensis* auftritt ist bislang unbekannt. Die hohe katalytische Aktivität von RosC deutet darauf hin, dass von RosB produziertes AFP sofort weiter metabolisiert werden kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wäre eine Expression von Strep- oder His₆-getagtem RosB in unterschiedlichen *S. davaonensis* Stämmen, beispielsweise *S. davaonensis* Wildtyp, *S. davaonensis* Δ rosC und *S. davaonensis* Δ clus_rosA (entspricht einer Deletion der Gene BN159_8026 bis BN159_8035, inkl. *rosA* und *rosC*) möglich. Die Stämme können auf ihre Metaboliten in den zellfreien Extrakten mittels HPLC-MS-Analysen untersucht werden. Zusätzlich könnten durch Affinitätschromatographie unterschiedliche Enzympräparate gewonnen werden, die möglicherweise unterschiedliche RosB-Stadien aufzeigen. Eine anschließende Analyse der präzipitierten Überstände mittels HPLC-MS könnte die Frage klären, inwieweit die neue Phosphatase RosC die Bindung von AFP an das Enzym RosB in *S. davaonensis* beeinflusst.

Mit der Identifizierung des letzten unbekanntes Enzyms der RoF-Biosynthese ist eine biotechnologische Produktion von RoF erstmals außerhalb des RoF-Produzenten *S. davaonensis* möglich. Die Expression der beiden Gene *rosB* und *rosA* führte bereits in dem schnell-wachsenden Actinobacterium *C. glutamicum* zu einer geringen RoF-Produktion (Moralugo *et al.*, 2019), welche durch das Einbringen einer AFP-spezifischen Phosphatase mit großer Wahrscheinlichkeit gesteigert werden könnte.

6.6 Phosphatasen im Riboflavin-Stoffwechsel

Die RF-Synthese in Bakterien und Pflanzen ist seit vielen Jahrzehnten Objekt der wissenschaftlichen Forschung. Bislang ist es in vielen Organismen noch nicht klar, ob es ein spezifisches Enzym für die Dephosphorylierung des RF-Intermediates 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion-5'-Phosphat zu 5-Amino-6-Ribitylamino-2,4(1*H*, 3*H*)-Pyrimidindion gibt. In *E. coli*, *B. subtilis* und *A. thaliana* konnten Phosphatasen der HAD-

Familie identifiziert werden, welche die Reaktion von ARPP zu ARP mit Aktivitäten zwischen 0,2 und 12,0 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein katalysieren. Die meisten Enzyme dephosphorylieren auch den wichtigen Cofaktor RP mit einer gleichen oder sogar einer höheren Reaktionsrate. In Deletionsexperimenten in *E. coli* und *B. subtilis* konnten keine RF-auxotrophen Stämme generiert werden. Diese Ergebnisse sprechen nicht für die Beteiligung eines einzigen Enzyms am RF-Stoffwechsel, sondern einer Gruppe von Phosphatasen (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015). Eine Ausnahme stellt das Enzym AtPyrP2 aus *A. thaliana* dar, welches ARPP spezifisch dephosphoryliert. Eine Hemmung der Genexpression des korrespondierenden Gens durch Gen-Silencing führte zu erniedrigten Levels von RF, RP und FAD im Cytoplasma. Diese Ergebnisse sprechen für eine essentielle Funktion von AtPyrP2 in *A. thaliana* (Sa *et al.*, 2016). Das Enzym RosC katalysiert nicht die Dephosphorylierung von ARPP in *S. davaonensis*. Im *S. davaonensis* Genom gibt es folglich eine weitere Phosphatase, die im Flavin-Stoffwechsel wirkt (spezifisch oder unspezifisch). Mithilfe der Primärstruktur von RosC könnten Phosphatase-Kandidaten in *S. davaonensis* und anderen Organismen, wie *B. subtilis*, identifiziert werden, sofern es sich bei der gesuchten Phosphatase um eine Histidin-Phosphatase handelt. Ein Kandidatengen aus *B. subtilis* konnte bereits durch eine Vergleichsanalyse mit RosC identifiziert werden. Das Protein YhfR aus *B. subtilis* wurde als „Phosphoglyceratmutase“ annotiert (Pearson *et al.*, 2000) und auf seine Aktivität in der Dephosphorylierung von ARPP untersucht (Hintze, 2019; Buck, 2019). Unter den getesteten Bedingungen konnte keine ARPP-Phosphataseaktivität für YhfR detektiert werden (Buck, 2019). Um die fehlende RF-Phosphatase in *S. davaonensis* zu identifizieren, wurde eine BLASTp-Analyse der Genprodukte hochregulierter Gene in der stationären Wachstumsphase von *S. davaonensis* durchgeführt. Die Basis bildet eine Transkriptomanalyse von *S. davaonensis* (Kissling *et al.*, 2020). Die Genprodukte von drei hochregulierten Genen konnten mittels einer BLASTp-Analyse als putative Phosphatasen identifiziert werden (Tabelle 38).

Tabelle 38. Identifizierung drei putativer Phosphatasegene in *S. davaonensis* und ihre hypothetischen Genprodukte.

Putatives Phosphatasegen	Hypothetisches Genprodukt
BN159_RS39700 (BN159_8013)	DUF1679 Domäne; Phosphotransferase (WP_015662717.1)
BN159_RS06560 (BN159_1365)	HAD-IIIC Familie, Phosphatase (WP_015656140.1)
BN159_RS22710 (BN159_4619)	HAD-IB Familie, Hydrolase (WP_063608152.1)

Zwei der drei Kandidatengene aus Tabelle 38 codieren für mögliche HAD-Enzyme. Diese Familie ist bereits dafür bekannt, ARPP-Phosphatasen zu beherbergen (Haase *et al.*, 2013; Sarge *et al.*, 2015). Die drei Gene aus Tabelle 38 können in einen *E. coli* Expressionsvektor (beispielsweise pPSG-IBA3) kloniert werden. Nach einer Protein-Überproduktion in *E. coli* und anschließender chromatographischer Reinigung, kann die Verbindung dieser Proteine zum RF-Stoffwechsel durch einen ARPP-Phosphatase-Enzymtest (Sarge *et al.*, 2015) untersucht werden.

7 Anhang

Sequenzen aus der Datenbank des Nationalen Zentrums für Biotechnologieinformation (*National Center for Biotechnology Information*, NCBI) wurden zuletzt am 12.05.2020 entnommen.

Nukleotidsequenzen

S. davaonensis ribCF (BN159_2715); NCBI Sequenznummer EF397307.1

GTGCAGCGCTGGCGTGGCTTGGAGGACATCCCCAGGACTGGGGGCGCAGCGTTCGTACCCATCGGTTC
 CTACGACGGTGTCCACCGCGGACACCAGCTCATCATTACGACACCCGTGGATCGCGCCCGGAAGTGG
 GCCTGCCCCGCGGTGGTGGTACCTTCGACCCGCACCCCAAGGAGGTGCTGCGCCCGGGCACCCATCCG
 CCCCTGCTGGCCCCGCACCACCGGCGGGCCGAACTCATGGCGGACCTGGGCGTGGACGCGGTCTGGT
 GCTCCCGTTACACCACGGAGTTCTCCAACCTGTCCCGGGCGGACTTCATCGTGAAGGTCCTCATCGACA
 AGCTGCGCGCAAGGCGGTGGTTCGAGGGCCCCGAACTTCCGCTTCGGCCACCGTTCGCGCGGGTACGTC
 ATGTACCTGGCCGAGCTGGGCAAGACGTACGACTTCGACGTCGAGGTCGTCGACCTGTTTCGTGTCCGG
 CGAGGCGGGCGGCGGCCAGCCGTTCTCCTCGACCCGACCCGCGGCTGGTTCGCGAGGGCGATGTTCG
 AGGGCGCGATGGAGATCCTGGGCCCGCCGACCCGCGTTCGAGGGCGTGGTGGTTCGCGCGGCCAGCGG
 GGGCGTGAGTTGGGCGTCCCGACGGCGAACGTCGAGACCCTCCCGCACACCCGCGATCCCCGCGGACGG
 CGTGTACGCCGGCTGGCTGCACGCCAGGGCGAGGCGATGCCGGCCGCGATCTCCGTAGGCACCAACC
 CGACGTTTCGACGGCACCGAGCGCACGGTGGAGGCGCATGTTCATCGACCCGCGTTCGGCCTCGACCTTAC
 GGCTGCACGTCGCCGTCGACTTCTGGCCTACGTGCGCGGTTCAGGTGAAGTTCGACTCGCTGGACGC
 GCTGATCGAGCGGATGGGCGAGGACATCAAGGTCAGCCGCGAACTGACAGCGGCGGGCGGAGGCGGGCG
 ACCGCTGA

S. davaonensis rosA (BN159_8032); NCBI Sequenznummer FR750395.1

ATGCGGCCGGAACCGACCGAGCACCCCGAACGCACCGCGGCACAACGCCTCTATCAGTACAACGTTCGA
 CCTCAAGGTCGCCCTTCGTGCTGTACGCCGTGGCCAAGCTGCACCTCCCCGATCTCCTCGCCGACGGCC
 CGCGCACACCGCGGACCTGGCCGCCGCGACCCGCTCCGACCCATCCCGGCTGCGCCGCTGCTGCGC
 GCGGCGGCCGCGCCGACGCGCTGCGCGAGGTGCCGAGGACAGCTTCGAACTGGCCCCGATGGGCGA
 CCTGTTGCGCTCCGCCACCCCGCTCCATGCGCGGCATGACGACGTTCTTCGCCGAACCGGACGTCC
 TCGCCGCTACGGTGACCTGGTGGAGTCCGTCCGACCCGAGTCCCCGCCTTCCAAGTTCGCGTTCATCGA
 GAACCGCTCTACGACTTCTTCGCCCGGCCGCAACACAAGGAAGTCCGCGACGAGTTCGACGCGGCGAT
 GGTTCGAGTTCGGCCAGTACTTCGCCGACGACTTCTGACCTCGTTCGACTTCGGGCGCTTACCCGCT
 TCGCCGACATCGGCGGCGGCCGCGGTTCAGTTCTTCGCCGAGTGTGACAGCCGTCGCCGTCGACCC
 GGGGTGCTGGTGGACGGGCGGCGGTGGCCGCGAGCGCCACAAGTTCCTCGCCTCACAGAATCTGAC
 CGAGCGGGTTCGAGGTACGGATCGGGGACTTCTTCGACGTCCTGCCACCCGCTGCGACGCCTACGTCC
 TCGGAGGAGTGTGGAGGACTGGGCGGACGCCGACCGCTACGCCTGCTCGTCCGCATCCGCCAGGCC
 ATGGGCGACCCCCGAGGCCCGGCTGCTCATCCTGGACTCGGTGATCGGCGAGACCGGGGAGCTGGG
 CAAGGTGCTGGACCTCGACATGCTGGTGTGGTTCGAGGGCGAGCACCCGACCCGCGCCAGTGGGACG
 ACCTGCTGGCACGCGCGGGCTTCGACATCGTTCGGCATCCACCCGGCCGGGACGTGTGGGCCGTCATC
 GAATGCCGCGGCACGGCCGGCTGA

S. davaonensis rosB (BN159_7989); NCBI Sequenznummer NC_020504.1 (*S. davaonensis* Genom)

ATGGCTCTCAAGGCTCTCATTCTCAACACCACTCTGCGCCGGTCACCCAGCCGCTCGCAGACCCAGGG
 ACTCATCGACAAGGCGGTCCCCCTCTATGAGAAGGAAGGGATTGAGACCGAGGTCGTCCGTGTCATCG
 ACCATGACATCGAGCAGGAGTACTGGGACGACTACGACGACTGGAACGCCGGCGAGAAGGCGCGCCGA

GAGGACGAGTGGCCCTGGCTGCTGGAGAAGATCAGGGAGGCGGACATCCTGGTGATCGCCACCCCGAT
CACCTCAACATGTGCACCTCCGCCGCCACGTCATCCTCGAGAAGCTCAACCTCATGGACGAGCTGA
ACGGCGACACCAAGCAGTTCCCGCTGTACAACAAGGTGCGGGGTTACTCATGTGCGGCAACGAGGAC
GGCGCCACCATGTGCGCGGCACCGTGCTGAACAACCTCGGACGGCTCGGCTACAGCGTGCCGCCGAA
CGCCGCGGCGTACTGGCTCGGCCCGGCCGACCAGGCCCGGCTACATCGAGGGCAAGGGCGACCGGC
ACTTCCACACCAACAAGCTGATCCGTTTCATGGTGGCCAACACCTCCACCTGGCCCGCATGCTCCAG
GAGACCCCGTACACCACGGACCTGGAGGCCTGTGCCAGGGCGGCCCGGGAGGAGAGCGACGACGTGTT
CGCGATCCGGGTCAACGTGAACACCCCGGCCATCCGCTACAAGCGGTTCCAGAAGCTCGGTGAGGTCA
AGGTGAGGAGAGCCAACCTCGGCTGA

***S. davaonensis rosC* (BN159_8033); NCBI Sequenznummer NC_020504.1 (*S. davaonensis*
Genom)**

GTGAGTGACGGACGCGAGAGCTTTCTTGAGGTCATGCGCTCGGTGTACGAGCGCTATCTGGTGGGGGT
CCCCGGGGTCAGCGAGGTCTGGCTGATCCGGCACGCCACTCCTACACCGGCTCGAGGACTACGACG
GGGACCCGCGCGATCCCGCCCTGTCCGAGAAGGGCAGAGCACAGGCGCGGTGCTGGCGGCCCGTCTC
GCCGGGGTCCCCTGCACGGGGTGTGGGCCAGCGGCGCGCACCGCGCCCAGCAGACGGCGTCCGGCCGT
CGCCCGGAGCACGGGCTGCGCGTCCGGACCGACGCACGGCTGCGGGAGGTGCGCACCAACTGGGACG
ACGGACGGCCCAGCGAGCTGAAGCCGCATGGCGTGTACCCCTTCCCCGAGCCGGAGAAGGAGGTGCC
GAACGCATGCGGACCGCGGTACGGCAGCCGTCGCCGCCACCCCTCCGGCGCCGACGGGACGACCCG
GGTGGCGGTGGTCCGCCATGACTCGGCCCTGGTCATCCTGATGGGCAGCCTGATGAACCTCGGCTGGG
GCCAGCTGGACATGATCCTGCCGCTGACCAGCGTCTCCGTCTCGCCGTCAAGGACGAGCGGATGGTC
GTACGGTCCATCGGCGACGCCACCCATCTGGCCGCGGCCCGTCCGACGTGATCTGA

***S. cinnabarinus ribCF* (SCIN_29690); (Sequenz nicht veröffentlicht)**

GTGCAGCGCTGGCGTGGCTTGAGGACATCCCCAGGACTGGGGGCGCAGCGTTCGTACCCATCGGTTTC
CTACGACGGTGTCCACCGCGGACACCAGCTCATCATTAGCACACCGTGGACCGCGCCCGGAACTGG
GCCTGCCCCGCGGTGGTTCGTACCTTCGACCCGCACCCCAAGGAGGTGCTGCGCCCGGGCACCCATCCG
CCCCTGCTGGCCCCGCACCACCGGCGGGCCGAACTCATGGCGGACCTGGGCGTGGACGCGGTCTGTT
CCTCCCGTTACCACGGAGTTCTCCAACCTCTCCCCGGCGGACTTCATCGTGAAGGTCCTCATCGACA
AGCTGCGCGCCAAGGCCGTGTCGAGGGCCCCGAACTTCCGCTTCGGCCACCGTGCAGCGGGTGGACGTC
GTGTTCTGGCCGAGCTGGGCAAGACGTACGACTTCGAGGTCGAGGTCGTCGACCTGTTCTGTGTCGG
CGAGGCGGGCGGCGGCCAGCCGTTCTCCTCGACCCGACCCGGCGGCTGGTTCGGCGAGGGCGATGTG
AGGGCGCGATGGAGATCCTGGGCCGCCCGCACCCGGGTCGAGGGCGTGGTGGTGGCGCCAGCGG
GGCCGGGAGTTGGGCGTACCGACGGCGAACGTCGAGACCCTTCCGCACACCGCGATCCCCGCGGACGG
TGTGTACGCCGGCTGGCTGCACGCCAGGGCGAGATGATGCCCTTCGCGATCTCCGTCCGGCACGAATC
CGACGTTTCGACGGCACGGAGCGCACGGTCGAGGCGCATGTTCATCGACCGGGTCCGGCTCGACCTTAC
GGCCTGCATGTGCGCGTGCACCTTCTGGCCTACGTCCGCGGCCAGGTGAAGTTCGACTCGCTGGACGC
GCTGATCGAGCGGATGGGCGAGGACATCAAGGTCAGCCCGGAACTGACGGCCGCGGGCGGAGGCGGGCG
ACCGCTGA

***S. cinnabarinus rosA* (SCIN_03075); (Sequenz nicht veröffentlicht)**

ATGCGGCCGAAACGACCGAGAACCCCGAACGCACCGCGGCACAACGCCTCTACCAGTACAACGTGCA
CCTCAAGGTCGCCTTCGTGCTGTACGCCGTGGCCAAGCTGAACATCCCCGACCTCCTCGCCGACGGCC
CGCGCACACCGCGGACCTGGCGGCTGCGACCGGCTCCGACACACCCCGGCTGCGCCGCTGCTGCGC
GCGGCGGCCGGCGCCGACGCGCTGCGCGAGGTGCCGCGGACAGCTTCGAACTGGCCCCGATGGGCGA
CCTGCTGCGCTCCGGCCACCCCGCTCCATGCGCGGCATGACGACGTTCTTCGCCGAACCGGACGTCC
TCGCCGCTACGGCGACCTGGTGGAGTCCGTCCGCACCGGAGTCCCGGCTTCCAACCTGCGCCACCGG

GAACCGCTCTACGACTTCCTTGCCCGGCCGCAACAGAAGGAAGTCCGCGACGAGTTCGACGCGGCGAT
GGTTCGAGTTCGGCCAGTACTTCGCCGACGACTTCCTGACCTCGTTCGACTTCGGGCGCTTCACCCGCT
TCGCCGACATCGGCGGCGGCCGCGGCCAGTTCCCTCGCCGAGTGCTGACGGCCGTCCCCTCGTTCGACC
GGGGTCTCGTGGACGGGCCCCGCGGTGGCCGAGAGCGCCACAAGTTCCCTCGCCTCGCAGCACCTGAC
CGAGCGGGTCGAGGTACGGATCGGGGACTTCTTCGACGTCTGCCCACCGGCTGCGACGCCTACGTCC
TGCGGGGAGTGCTGGAGGACTGGGCGGACGCCGACGCCGTACGCCTGCTCGTCCGCATCCGCCAGGCC
ATGGGCGACGCCCTGAGGCCCGGCTGCTCATCCTGGACTCGGTGATCGGCGAGACCGGGGAGCTGGG
CAAGGTGCTGGACCTCGACATGCTGGTGTGGTTCGAGGGCGAGCACCGGACCCGCGCCAGTGGGACG
ACCTGCTGACCCGCGCGGGCTTCGACATCGCCGCCGTCCACCCGGCCGGGGACGTGTGGGCCGTATC
GAATGCCGCGGCACCCGCGGGCTGA

***S. cinnabarinus rosB* (SCIN_03320); (Sequenz nicht veröffentlicht)**

ATGGCTCTCAAGGCTCTCATTCTCAACACCCTCTGCGCCGCTCACCCAGCCGCTCGCAGACCCAGGG
ACTCATCGACAAGGCGGTCCCCCTCTACGAGAAGGAGGGGATCGAGACCGAGGTCATCCGTGTCATCG
ACCATGACATCGAGCAGGAGTACTGGGACGACTACGACGACTGGAACGCCGGCGAGAAGGCGCGCCGC
GAGGACGAGTGGCCCTGGCTGCTCGAGAAGATCAGGGAGGCGGACATCCTGGTGTGATCGCCACCCCGAT
CACCTCAACATGTGCACCTCCGCCGCCACGTCATCCTCGAGAAGCTCAACCTCATGGACGAGCTGA
ACGGCGACACCAAGCAGTTCGCCGTGTACAACAAGGTGCGCGGGTTACTGATGTGCGGCAACGAGGAC
GGCGCCACCATGTGCGCCGCACCGTGCTGAACAACCTCGGACGGCTCGGCTACAGCGTGCCGCCCAA
CGCCCGGGCGTACTGGCTCGGCCCGGCCGTTACCGGCCCTGGCTACATCGAGGGCAAGGGCGACCCGC
ACTTCCACACCAACAAGCTGATCCGCTTCATGGTGGCCAACACCTCCACCTGGCCCGCATGCTCCAC
GAGACGCCGTACACCACGGACCTGGAGGCCTGCGCCCAGGCGGCCCGGGAGGAGAGCGACGACGTGTT
CGCGATCCGGGTCAACGTGAACACCCCGGCCATCCGCTACAAGCGGTTCCAGAAGCTCGGTTGAGGTCA
AGGTCGAGGAGAGCCAGCTCGGCTGA

***S. cinnabarinus rosC* (SCIN_03070); (Sequenz nicht veröffentlicht)**

GTGAGTGACGGACGCGAGAGCTTTCTCGAGGTCATGCGCTCGGTGTACGAGCGCTATCTGGTGGGGGT
CCCCGGAGTCAGCGAGGTCTGGCTGATCCGGCACGCCGACTCCTACACCGGCCTTGAGGACTACGACG
GAGACCCGCGCGACCCCGCCCTGTCCGAGAAGGGCAGAGCACAGGCACGACTGCTGGCGGCCCGGCTG
GCCGGGGTCCCCTGCACGGGGTGTGGGCCAGCGGAGCGAACCGCGCCCAGCAGACGGCGTCCGGCCGT
CGCCCGGAGCACGGACTGCGCGTCCGGACCGACGCACGGCTGCGGGAGGTGCGCACCAACTGGGACG
ACGGACGGCCCAGCGAGCTGAAGCCGCCCGCGTGTACCCCTTCCCCGAGCCGGAGAAGGAGGTGCC
GAGCGCATGCGGACCGCGGTACGGCGGCCGTCGCCGCCACCCCGGCCGCGCCCAGGGGACGACCCG
GGTGGCGGTGGTCCGCCATGACTCCGCCCTGGTTCATCCTGATGGGCAGCCTGATGAACCTCGGCTGGG
GCCAGCTGGACATGATCCTCCCCTTGACCAGCGTCTCCGTCTCGCCGTCAAGGACGAGCGGATGGTC
GTCCGGTCCATCGGTGACGCGACCCATCTGGCCGCGGCCCGTCCGACGTGGTCTGA

Aminosäuresequenzen

***S. davaonensis* RibCF; NCBI Sequenznummer ABN55909.1**

MQRWRGLEDIPQDWGRSVVTIGSYDGVHRGHQLIIQHTVDRARELGLPAVVVTFDHPKPEVLRPGTHP
PLLAPHHRAELMADLGVDAVLVLPFTTEFSNLSPADFIVKVLIDKLRAKAVEGPNFRFGHRAAGDV
MYLAELGKTYDFDVEVVDLFDVSGEAGGGQPFSSTLTRRLVGEVDVEGAMEILGRPHRVEGVVVRGAQR
GRELGVPTANVETLPHTAIPADGVYAGWLHAQGEAMPAAISVGTNPTFDGTERTVEAHVIDRVGLDL
GLHVAVDFLAYVRGQVKFDSLDA LIERMGEDIKVSRELTA AAEAGDR

***S. davaonensis* RosA; NCBI Sequenznummer CBY84436.1**

MRPEPTEHPERTAAQRLYQYNVDLKVAFVLYAVAKLHLPDLLADGPRTTADLAAATGSDPSRLRLLR
AAAGADALREVPEDSFELAPMGDLLRSRSGHPRSMRGMTTFFAEPDVLAAYGDLVESVRTGVPAFQLRHR
EPLYDFLARQPQHKVEVRDEFDAAMVEFGQYFADDFLTSFDFGRFTRFADIGGGRGQFLAGVLTAVPSST
GVLVDGPAVAASAHKFLASQNLTERVEVRIGDFFDVLTGCDAYVLRGVLEDWADADAVRLLVRIQQA
MGDAPEARLLIILDSVIGETGELGKVLDDLMLVVEGEHRTRAQWDDLLARAGFDIVGIHPAGDVWAVI
ECRGTAG

***S. davaonensis* RosB; NCBI Sequenznummer WP_015662694.1**

MALKALILNNTTLRRSPRSQTQGLIDKAVPLYEKEGIETEVVRVIDHDIEQEYWDDYDDWNAGEKARR
EDEWPWLEKIREADILVIATPITLNMCTSAAHVILEKLNLMDELNGDTKQFPLYNKVAGLLMCGNED
GAHHVAGTVLNNLGRGLGYSVPPNAAAYWLGPAAGTGPYIEGKGRHFHTNKLIRFMVANTSHLARMLQ
ETPYTTDLEACAQAAREESDDVFAIRVNVNTPAIRYKRFQKLGEVKVEESQLG

***S. davaonensis* RosC; NCBI Sequenznummer WP_015662737.1**

MSDGRESFLEVMSVYERYLVGVPGVSEVWLIRHADSYTGLEDYDGDPRDPALSEKGRAQARLLAARL
AGVPLHGVWASGAHRAQQTASAVAAEHGLRVRTDARLREVRTNWDDGRPSELKPHGVYPFPEPEKEVA
ERMRTAVTAAVAATPPAPDGTTRVAVVGHDSALVILMGSLMNLGWGQLDMILPLTSVSVLAVKDERMV
VRSIGDATHLAAAPSDVI

***S. cinnabarinus* RibCF (Sequenz nicht veröffentlicht)**

MQRWRGLEDIPQDWGRSVVTIGSYDGVHRGHQLIQHTVDRARELGLPAVVVTFDHPKVEVLRPGTHP
PLLAPHHRAELMADLGVDAVLVLPFTTEFSNLSPADFIVKVLIDKLRAKAVVEGPNFRFGHRAAGDV
VFLAELGKTYDFEVEVVDLFSVGEAGGGQPFSSTLTRRLVGEVDVEGAMEILGRPHRVEGVVVRGAQR
GRELGVPTANVETLPHTAIPADGVYAGWLHAQGEMMPSAISVGTNPTFDGTERTVEAHVIDRVGLDLY
GLHVAVDFLAYVRGQVKFDSLDAIERMGEDIKVSRELTAABEAGDR

***S. cinnabarinus* RosA (Sequenz nicht veröffentlicht)**

MRPETTENPERTAAQRLYQYNVDLKVAFVLYAVAKLNI PDLLADGPRTTADLAAATGSDTPRLRLLR
AAAGADALREVPADSFELAPMGDLLRSRSGHPRSMRGMTTFFAEPDVLAAYGDLVESVRTGVPAFQLRHR
EPLYDFLARPPQKEVRDEFDAAMVEFGQYFADDFLTSFDFGRFTRFADIGGGRGQFLAGVLTAVPSST
GVLVDGPAVAESAHKFLASQHLTERVEVRIGDFFDVLTGCDAYVLRGVLEDWADADAVRLLVRIQQA
MGDAPEARLLIILDSVIGETGELGKVLDDLMLVVEGEHRTRAQWDDLLTRAGFDIAAVHPAGDVWAVI
ECRGTAG

***S. cinnabarinus* RosB (Sequenz nicht veröffentlicht)**

MALKALILNNTTLRRSPRSQTQGLIDKAVPLYEKEGIETEVIRVIDHDIEQEYWDDYDDWNAGEKARR
EDEWPWLEKIREADILVIATPITLNMCTSAAHVILEKLNLMDELNGDTKQFPLYNKVAGLLMCGNED
GAHHVAGTVLNNLGRGLGYSVPPNAAAYWLGPAAGTGPYIEGKGRHFHTNKLIRFMVANTSHLARMLH
ETPYTTDLEACAQAAREESDDVFAIRVNVNTPAIRYKRFQKLGEVKVEESQLG

***S. cinnabarinus* RosC (Sequenz nicht veröffentlicht)**

MSDGRESFLEVMSVYERYLVGVPGVSEVWLIRHADSYTGLEDYDGDPRDPALSEKGRAQARLLAARL
AGVPLHGVWASGANRAQQTASAVAAEHGLRVRTDARLREVRTNWDDGRPSELKPPGVYPFPEPEKEVA
ERMRTAVTAAVAATPAAPEGTTRVAVVGHDSALVILMGSLMNLGWGQLDMILPLTSVSVLAVKDERMV
VRSIGDATHLAAAPSDVV

Abbildungen und Tabellen

A	SCIN_03070	GT GA GT GA CG	GACGCGAGAG	CTTT CT CGAG	GT CA TG CGCT	CGGT GT ACGA	GCGC TATC TG	GT GGGGGT C C	70
	SDAV_8033	GT GA GT GA CG	GACGCGAGAG	CTTT CT T GAG	GT CA TG CGCT	CGGT GT ACGA	GCGC TATC TG	GT GGGGGT C C	70
	SCIN_03070	CC GG A G TC AG	CGAGGT CT GG	CT GA TC CGGC	ACGC CG AC TC	CT AC AC CGGC	CT T G AGGAC T	ACGACG A G A	140
	SDAV_8033	CC GG G G TC AG	CGAGGT CT GG	CT GA TC CGGC	ACGC CG AC TC	CT AC AC CGGC	CT C G AGGAC T	ACGACG G G A	140
	SCIN_03070	CCC GC GCGA C	CCC GCCC TG TC	CGAGAA GGG	CA GAGC AC AG	GC A C GAC TG CT	GGCGGCCC G	C T G GCCGGG	210
	SDAV_8033	CCC GC GCGA T	CCC GCCC TG TC	CGAGAA GGG	CA GAGC AC AG	GC C C GAC TG CT	GGCGGCCC G	T C T GCCGGG	210
	SCIN_03070	GT CCC GCTG CA	CGGGG TG TG	GGCCA GCGG A G	CG A C CGCG	CCCA GCAGAC	GGCGTC GGCC	GT CG CC GC CG	280
SDAV_8033	GT CCC GCTG CA	CGGGG TG TG	GGCCA GCGG G G	CG C A CC GCG	CCCA GCAGAC	GGCGTC GGCC	GT CG CC GC CG	280	
SCIN_03070	AG CA CGG A C TG	CGCG TC CGGA	CC GA CG CA CG	GC TG CGGGAG	GT GC GC AC C	AAC TGGGAC GA	CGGA CGGC C	350	
SDAV_8033	AG CA CGG C C TG	CGCG TC CGGA	CC GA CG CA CG	GC TG CGGGAG	GT GC GC AC C	AAC TGGGAC GA	CGGA CGGC C	350	
SCIN_03070	CA GC GAGC TG	AA GC CGC C C G	GC GT GTA CCC	CT TCCCC GAGC	CG GA GA AGGA	GGTC GC CGA	C CGC AT GC GG	420	
SDAV_8033	CA GC GAGC TG	AA GC CGC A T G	GC GT GTA CCC	CT TCCCC GAGC	CG GA GA AGGA	GGTC GC CGA	A CGC AT GC GG	420	
SCIN_03070	AC CG CGGT CA	CGGC G GCC GT	CGCCGCCA CC	CC G G C GCGCC	CGA G GGGAC	GA CCC GGGTG	CGGGTG GT CG	490	
SDAV_8033	AC CG CGGT CA	CGGC A GCC GT	CGCCGCCA CC	CC T C C GCGCC	CGA G GGGAC	GA CCC GGGTG	CGGGTG GT CG	490	
SCIN_03070	GCCA TG AC TC	G GCCC TG GT CA	TC CT GA TG GG	CA GC CT GA TG	AAC CT CGGC	TGGGGCCA GC	TG GA CA TG AT	560	
SDAV_8033	GCCA TG AC TC	A GCCC TG GT CA	TC CT GA TG GG	CA GC CT GA TG	AAC CT CGGC	TGGGGCCA GC	TG GA CA TG AT	560	
SCIN_03070	CC T C G T GA	CCA GCGT CT	CCGT CC TC GC	CG TC AA GGAC	GAGCGGAT GG	TC GT C GGTG	CA TC GG T G AC	630	
SDAV_8033	CC T C G T GA	CCA GCGT CT	CCGT CC TC GC	CG TC AA GGAC	GAGCGGAT GG	TC GT A GGTG	CA TC GG G G AC	630	
SCIN_03070	GC A C C A TC	TG GCCGCGGC	CCC GT CC GA CG	TG G T CT GA	669				
SDAV_8033	GC A C C A TC	TG GCCGCGGC	CCC GT CC GA CG	TG A T CT GA	669				
B	SCIN_03070	MS DGRE SF LE	VMRS VY ERYL	VGVP GV SE VW	LI RHAD SY TG	LE DY DGDP RD	PA LS EK GRAQ	AR LL AAR LA G	70
	SDAV_8033	MS DGRE SF LE	VMRS VY ERYL	VGVP GV SE VW	LI RHAD SY TG	LE DY DGDP RD	PA LS EK GRAQ	AR LL AAR LA G	70
	SCIN_03070	VP LH GVWASG	A R RAQQT AS AV	AA EH GL RV RT	DARL RE VR TN	WDDGRP SE LK	P G VY PF PE	PE KE VA ER MR	140
	SDAV_8033	VP LH GVWASG	A N RAQQT AS AV	AA EH GL RV RT	DARL RE VR TN	WDDGRP SE LK	P G VY PF PE	PE KE VA ER MR	140
	SCIN_03070	TA VT AA VA AT	P A P E GTT RV	AV VG HDSA LV	IL MGSL MNLG	WGQL DM IL PL	TS VS VL AV KD	ER MV VR SI GD	210
	SDAV_8033	TA VT AA VA AT	P A P E GTT RV	AV VG HDSA LV	IL MGSL MNLG	WGQL DM IL PL	TS VS VL AV KD	ER MV VR SI GD	210
	SCIN_03070	AT HL AAA PS DV	I * 223						
SDAV_8033	AT HL AAA PS DV	V * 223							

Abbildung 26. Im Genom des Roseoflavin-Produzenten *S. cinnabarinus* befindet sich ein Homolog zu BN159_8033. Vergleich der (A) Nukleotid- und (B) Aminosäuresequenzen von BN159_8033 (SDAV_8033) SCIN_03070. Die Zahlen über und am Ende der Sequenzvergleiche beziehen sich auf die Länge der Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen. Rot hinterlegte Nukleotide und Aminosäuren markieren die Unterschiede in den Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen.

Tabelle 39. Steigungen aus dem AFP-Phosphatase-Enzymtest im linearen Bereich der AF-Bildung zwischen 0 und 5 min Reaktionszeit in $\mu\text{mol min}^{-1} \pm \text{SD}$ ($n = 3$) und daraus berechnete spezifische Aktivitäten in $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein} \pm \text{SD}$ ($n = 3$), abhängig von der eingesetzten RosC^{StrepN}-Konzentration.

RosC ^{StrepN} Konzentration / mg l^{-1}	Steigung AF-Bildung im linearen Bereich / $\mu\text{mol min}^{-1}$	Spezifische Aktivität / $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1} \text{Protein}$
15	$14,36 \pm 0,41$	$0,958 \pm 0,027$
30	$28,63 \pm 1,12$	$0,954 \pm 0,037$
60	$46,71 \pm 1,56$	$0,779 \pm 0,026$

Nukleotidsequenz des optimierten Gens *rosC_{opt}* vom 5'-Ende bis zum 3'-Ende

Start

Strep-Tag II

Faktor Xa

```
ATGTGGAGCCACCCGCGAGTTCGAAAAATCGAAGGGCGCATGTCTGACGGTCGTGAATCTTTCCTGGA
AGTTATGCGTTCTGTTTACGAACGTTACCTGGTTGGTGTTCGGGTGTTTCTGAAGTTTGGCTGATCC
GTCACGCTGACTCTTACACCGGTCTGGAAGACTACGACGGTGACCCGCGTGACCCGGCTCTGTCTGAA
AAAGGTCGTGCTCAGGCTCGTCTGCTGGCTGCTCGTCTGGCTGGTGTTCGGCTGCACGGTGTTCGGC
TTCTGGTGCTCACCGTGCTCAGCAGACCGCTTCTGCTGTTGCTGCTGAACACGGTCTGCGTGTTTCGTA
CCGACGCTCGTCTGCGTGAAGTTCGTACCAACTGGGACGACGGTCGTCCGTCTGAACTGAAACCGCAC
GGTGTTCACCCGTTCCCGGAACCGGAAAAAGAAGTTGCTGAACGTATGCGTACCGCTGTTACCGCTGC
TGTTGCTGCTACCCCGCCGGCTCCGGACGGTACCACCCGTGTTGCTGTTGTTGGTCACGACTCTGCTC
TGGTTATCCTGATGGGTTCTCTGATGAACCTGGGTTGGGGTCAGCTGGACATGATCCTGCCGCTGACC
TCTGTTTCTGTTCTGGCTGTTAAAGACGAACGTATGGTTGTTTCGTTCTATCGGTGACGCTACCCACCT
GGCTGCTGCTCCGTCTGACGTTATCTAA
```

Am 5'-Ende des optimierten Gens *rosC_{opt}* (schwarz) befinden sich ein Start-Codon (rot), Codons für den N-terminalen Strep-Tag II (blau), sowie Codons für die Faktor Xa-Erkennungssequenz (orange).

Literaturverzeichnis

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E. & Pedersen, J. (2006).** Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* **48**, 1–13.
- Bacher, A., Le Van, Q., Keller, P. J. & Floss, H. G. (1983).** Biosynthesis of riboflavin. Incorporation of ¹³C-labeled precursors into the xylene ring. *J. Biol. Chem.* **258**, 13431–13437.
- Bennett, B. D., Kimball, E. H., Gao, M., Osterhout, R., van Dien, S. J. & Rabinowitz, J. D. (2009).** Absolute metabolite concentrations and implied enzyme active site occupancy in *Escherichia coli*. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 593–599.
- Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, 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.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D. & Rode, C. K. & other authors (1997).** The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453.
- Blyth, A. W. (1879).** LVI.—The composition of cows' milk in health and disease. *J. Chem. Soc.* **35**, 530–539.
- 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.
- Buck, K. (2019).** Das Protein YhfR aus dem Bakterium *Bacillus subtilis* ist nicht aktiv im Riboflavin-Stoffwechsel. unveröffentlicht. Mannheim.
- Burrows, R. B. & Brown, G. M. (1978).** Presence of *Escherichia coli* of a deaminase and a reductase involved in biosynthesis of riboflavin. *J. Bacteriol.* **136**, 657–667.
- Campbell, W. C., Fisher, M. H., Stapley, E. O., Albers-Schonberg, G. & Jacob, T. A. (1983).** Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* **221**, 823.
- Cherepanov, P. P. & Wackernagel, W. (1995).** Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **158**, 9–14.
- Coquard, D., Huecas, M., Ott, M., van Dijk, J. M., van Loon, A. P. G. M. & Hohmann, H.-P. (1997).** Molecular cloning and characterisation of the ribC gene from *Bacillus subtilis*: a point mutation in ribC results in riboflavin overproduction. *Mol. Gen. Genet.* **254**, 81–84.
- Cundliffe, E. (1989).** How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annu. Rev. Microbiol.* **43**, 207–233.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6640.
- Demain, A. L. (1999).** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 455–463.
- Dingermann, T. & Zündorf, I. (2016).** Multitalent *Streptomyces*. Mikrobe des Jahres 2016. *Pharm. Ztg.*

- Drew, S. W. & Demain, A. L. (1977).** Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**, 343–356.
- Elspaß, V. (2014).** Die Gene BN159_7987 und BN159_7988 aus *Streptomyces davawensis* kodieren für ein Riboflavinaufnahmesystem. unveröffentlicht. Mannheim.
- Finn, R. D., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Bateman, A., Bork, P., Bridge, A. J., Chang, H.-Y., Dosztányi, Z. & El-Gebali, S. & other authors (2016).** InterPro in 2017—beyond protein family and domain annotations. *Nucleic Acids Res.* **45**, D190-D199.
- Fischer, M. & Bacher, A. (2005).** Biosynthesis of flavocoenzymes. *Nat. Prod. Rep.* **22**, 324–350.
- Fischer, M., Romisch, W., Saller, S., Illarionov, B., Richter, G., Rohdich, F., Eisenreich, W. & Bacher, A. (2004).** Evolution of vitamin B2 biosynthesis: structural and functional similarity between pyrimidine deaminases of eubacterial and plant origin. *J. Biol. Chem.* **279**, 36299–36308.
- 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. W. & Mattevi, A. (2000).** Flavoenzymes: diverse catalysts with recurrent features. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 126–132.
- Gelfand, M. S., Mironov, A. A., Jomantas, J., Kozlov, Y. I. & Perumov, D. A. (1999).** A conserved RNA structure element involved in the regulation of bacterial riboflavin synthesis genes. *Trends Genet.* **15**, 439–442.
- Gomez-Escribano, J. P. & Bibb, M. J. (2011).** Engineering *Streptomyces coelicolor* for heterologous expression of secondary metabolite gene clusters. *Microb. Biotechnol.* **4**, 207–215.
- Goo, Y. M., Kim, O. Y., Joe, Y. A., Lee, Y. B., Ju, J., Kim, B. T. & Lee, Y. Y. (1996).** A new streptothricin family antibiotic producing *Streptomyces* spp. SNUS 8810-111; Characterization of the producing organisms, fermentation, isolation, and structure elucidation of antibiotics. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 153–159.
- Green, R. & Rogers, E. J. (2013).** Transformation of chemically competent *E. coli*. In *Laboratory methods in enzymology: DNA*, pp. 329–336. Edited by J. Lorsch, 1st edn. Amsterdam: Elsevier Acad. Press.
- 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.
- 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.
- Gutierrez-Preciado, A., Torres, A. G., Merino, E., Bonomi, H. R., Goldbaum, F. A. & Garcia-Angulo, V. A. (2015).** Extensive identification of bacterial riboflavin transporters and their distribution across bacterial species. *PLOS ONE* **10**.

- Haase, I., Sarge, S., Illarionov, B., Laudert, D., Hohmann, H.-P., Bacher, A. & Fischer, M. (2013).** Enzymes from the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily catalyse the elusive dephosphorylation step of riboflavin biosynthesis. *Chembiochem* **14**, 2272–2275.
- Hasnain, G., Roje, S., Sa, N., Zallot, R., Ziemak, M. J., Crécy-Lagard, V. de, Gregory, J. F. & Hanson, A. D. (2016).** Bacterial and plant HAD enzymes catalyse a missing phosphatase step in thiamin diphosphate biosynthesis. *Biochem. J.* **473**, 157–166.
- 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**.
- Hintze, L. (2019).** Klonierung und Expression des putativen riboflavinspezifischen Phosphatasegens yhfR aus *Bacillus subtilis* in *Escherichia coli*. unveröffentlicht. Mannheim.
- Hollander, I. & Brown, G. M. (1979).** Biosynthesis of riboflavin: Reductase and deaminase of *Ashbya gossypii*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **89**, 759–763.
- Jankowitsch, F. (2012).** Die beiden terminalen Schritte der Roseoflavin-Biosynthese in *Streptomyces davawensis* werden von einer bisher unbekanntenen N,N-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) katalysiert. Heidelberg.
- Jankowitsch, F., Kuhm, 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.
- 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.
- Karray, F., Darbon, E., Oestreicher, N., Dominguez, H., Tuphile, K., Gagnat, J., Blondelet-Rouault, M.-H., Gerbaud, C. & Pernodet, J.-L. (2007).** Organization of the biosynthetic gene cluster for the macrolide antibiotic spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. *Microbiology* **153**, 4111–4122.
- Karrer, P., Becker, B., Benz, F., Frei, P., Salomon, H. & Schöpp, K. (1935).** Zur Synthese des Lactoflavins. *Helvetica Chimica Acta* **18**, 1435–1448.
- Keravala, A. & Calos, M. P. (2008).** Site-specific chromosomal integration mediated by phiC31 integrase. *Methods Mol. Biol.* **435**, 165–173.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. Norwich: John Innes Foundation.
- Kil, Y. V., Mironovi, V. N., Gorishin, I. Y., Kreneva, R. A. & Perumov, D. A. (1992).** Riboflavin operon of *Bacillus subtilis*: unusual symmetric arrangement of the regulatory region. *Mol. Gen. Genet.* **233**, 483–486.
- Kinashi, H. & Shimaji-Murayama, M. (1991).** Physical characterization of SCP1, a giant linear plasmid from *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* **173**, 1523–1529.
- Kirby, R. & Hopwood, D. A. (1977).** Genetic determination of methylenomycin synthesis by the SCP1 plasmid of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Gen. Microbiol.* **98**, 239–252.

- Kirchner, O. & Tauch, A. (2003).** Tools for genetic engineering in the amino acid-producing bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *J. Biotechnol.* **104**, 287–299.
- Kissling, L., Schneider, C., Seibel, K., Dorjjugder, N., Busche, T., Kalinowski, J. & Mack, M. (2020).** The roseoflavin producer *Streptomyces davaonensis* has a high catalytic capacity and specific genetic adaptations with regard to the biosynthesis of riboflavin. *Environ. Microbiol.* *n/a*.
- Konjik, V. (2017).** RosB from *Streptomyces davawensis* is the key enzyme of roseoflavin biosynthesis. Heidelberg.
- Konjik, V., Brunle, S., Demmer, U., Vanselow, A., Sandhoff, R., Ermler, U. & Mack, M. (2017).** The crystal structure of RosB: insights into the reaction mechanism of the first member of a family of flavodoxin-like enzymes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **56**, 1146–1151.
- Koonin, E. V. & Tatusov, R. L. (1994).** Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity: Application of an iterative approach to database search. *J. Mol. Biol.* **244**, 125–132.
- Kozlowski, L. P. (2016).** IPC – Isoelectric point calculator. *Biol. Direct* **11**, 55.
- Kuhn, R. & Rudy, H. (1935).** Konstitution und biologische Wirksamkeit der Flavine. *Naturwissenschaften* **23**, 286.
- Kuznetsova, E., Proudfoot, M., Gonzalez, C. F., Brown, G., Omelchenko, M. V., Borozan, I., Carmel, L., Wolf, Y. I. & Mori, H. & other authors (2006).** Genome-wide analysis of substrate specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family. *J. Biol. Chem.* **281**, 36149–36161.
- Landwehr, W., Kampfer, P., Glaeser, S. P., Ruckert, C., Kalinowski, J., Blom, J., Goesmann, A., Mack, M. & Schumann, P. & other authors (2018).** Taxonomic analyses of members of the *Streptomyces cinnabarinus* cluster, description of *Streptomyces cinnabarrigriseus* sp. nov. and *Streptomyces davaonensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **68**, 382–393.
- 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.
- 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.
- Levenberg, K. (1944).** A method for the solution of certain non-linear problems in least-squares. *Q J Mech. Appl. Math.* **2**, 164–168.
- Lima Procópio, R. E. de, Silva, I. R. da, Martins, M. K., Azevedo, J. L. de & Araújo, J. M. de (2012).** Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz. J. Infect. Dis.* **16**, 466–471.
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I. & Marchler, G. H. & other authors (2020).** CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res.* **48**, 265–268.
- Mack, M., van Loon, A. P. & Hohmann, H.-P. (1998).** Regulation of riboflavin biosynthesis in *Bacillus subtilis* is affected by the activity of the flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase encoded by *ribC*. *J. Bacteriol.* **180**, 950–955.
- MacNeil, D. J. (1988).** Characterization of a unique methyl-specific restriction system in *Streptomyces avermitilis*. *J. Bacteriol.* **170**, 5607–5612.

- MacNeil, D. J., Gewain, K. M., Ruby, C. L., Dezeny, G., Gibbons, P. H. & MacNeil, T. (1992).** Analysis of *Streptomyces avermitilis* genes required for avermectin biosynthesis utilizing a novel integration vector. *Gene* **111**, 61–68.
- Malpartida, F. & Hopwood, D. A. (1986).** Physical and genetic characterisation of the gene cluster for the antibiotic actinorhodin in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Mol. Gen. Genet.* **205**, 66–73.
- Mandal, M. & Breaker, R. R. (2004).** Gene regulation by riboswitches. *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* **5**, 451–463.
- Mansjö, M. & Johansson, J. (2011).** The riboflavin analog roseoflavin targets an FMN-riboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. *RNA Biol.* **8**, 674–680.
- Marquardt, D. W. (1963).** An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* **11**, 431–441.
- Massey, V. (2000).** The chemical and biological versatility of riboflavin. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 283–296.
- Matsui, K., Juri, N., Kubo, Y. & Kasai, S. (1979).** Formation of roseoflavin from guanine through riboflavin. *J. Biochem.* **86**, 167–175.
- Matsui, K., Wang, H.-C., Hirota, T., Matsukawa, H., Kasai, S., Shinagawa, K. & Otani, S. (1982).** Riboflavin production by roseoflavin-resistant strains of some bacteria. *Agric. Biol. Chem.* **46**, 2003–2008.
- Mattevi, A., Vanoni, M. A., Todone, F., Rizzi, M., Teplyakov, A., Coda, A., Bolognesi, M. & Curti, B. (1996).** Crystal structure of D-amino acid oxidase: a case of active site mirror-image convergent evolution with flavocytochrome b2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 7496.
- Menges, R., Muth, G., Wohlleben, W. & Stegmann, E. (2007).** The ABC transporter Tba of *Amycolatopsis balhimycina* is required for efficient export of the glycopeptide antibiotic balhimycin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 125–134.
- Michaelis, L. & Menten, M. (1913).** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.*, 333–369.
- Michaelis, L., Menten, M. L., Johnson, K. A. & Goody, R. S. (2011).** The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* **50**, 8264–8269.
- Mitchell, A. L., Attwood, T. K., Babbitt, P. C., Blum, M., Bork, P., Bridge, A., Brown, S. D., Chang, H.-Y. & El-Gebali, S. & other authors (2018).** InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. *Nucleic Acids Res.* **47**, D351–D360.
- Mora-Lugo, R., Stegmüller, J. & Mack, M. (2019).** Metabolic engineering of roseoflavin-overproducing microorganisms. *Microb. Cell Fact.* **18**, 146.
- Mörrtl, S., Fischer, M., Richter, G., Tack, J., Weinkauff, S. & Bacher, A. (1996).** Biosynthesis of riboflavin. Lumazine synthase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **271**, 33201–33207.
- Moszer, I. (1998).** The complete genome of *Bacillus subtilis*: from sequence annotation to data management and analysis. *FEBS Lett.* **430**, 28–36.
- Murphy, K. C. (1998).** Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 2063–2071.
- Neuberger, G. & Bacher, A. (1985).** Biosynthesis of riboflavin. An aliphatic intermediate in the formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine from pentose phosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **127**, 175–181.

- Neuberger, G. & Bacher, A. (1986).** Biosynthesis of riboflavin. Enzymatic formation of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine by heavy riboflavin synthase from *Bacillus subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1111–1116.
- Nobeli, I., Ponstingl, H., Krissinel, E. B. & Thornton, J. M. (2003).** A Structure-based anatomy of the *E. coli* metabolome. *J. Mol. Biol.* **334**, 697–719.
- Otani, S., Takatsu, M., Nakano, M., Kasai, S. & Miura, R. (1974).** Letter: Roseoflavin, a new antimicrobial pigment from *Streptomyces*. *J. Antibiot.* **27**, 86–87.
- Ott, E., Stolz, J., Lehmann, M. & 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.
- Pearson, C. L., Loshon, C. A., Pedersen, L. B., Setlow, B. & Setlow, P. (2000).** Analysis of the function of a putative 2,3-diphosphoglyceric acid-dependent phosphoglycerate mutase from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**, 4121.
- Pedrolli, D. B. & Mack, M. (2014).** Bacterial flavin mononucleotide riboswitches as targets for flavin analogs. *Methods Mol. Biol.* **1103**, 165–176.
- 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.
- Perkins, J. B., Sloma, A., Hermann, T., Theriault, K., Zachgo, E., Erdenberger, T., Hannett, N., Chatterjee, N. P. & Williams II, V. & other authors (1999).** Genetic engineering of *Bacillus subtilis* for the commercial production of riboflavin. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 8–18.
- Plaut, G. W. (1960).** Studies on the stoichiometry of the enzymic conversion of 6,7-dimethyl-8-ribityllumazine to riboflavin. *J. Biol. Chem.* **235**, PC41-2.
- Powers, H. J. (2003).** Riboflavin (vitamin B-2) and health. *Am. J. Clin. Nutr.* **77**, 1352–1360.
- Richter, G., Fischer, M., Krieger, C., Eberhardt, S., Luttmann, H., Gerstenschlager, I. & Bacher, A. (1997).** Biosynthesis of riboflavin: characterization of the bifunctional deaminase-reductase of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 2022–2028.
- Richter, G., Ritz, H., Katzenmeier, G., Volk, R., Kohnle, A., Lottspeich, F., Allendorf, D. & Bacher, A. (1993).** Biosynthesis of riboflavin: cloning, sequencing, mapping, and expression of the gene coding for GTP cyclohydrolase II in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 4045–4051.
- Rigden, D. J. (2008).** The histidine phosphatase superfamily: Structure and function. *Biochem. J.* **409**, 333–348.
- Rudd, B. A. & Hopwood, D. A. (1980).** A pigmented mycelial antibiotic in *Streptomyces coelicolor*: control by a chromosomal gene cluster. *J. Gen. Microbiol.* **119**, 333–340.
- Rudd, B. A. M. & Hopwood, D. A. (1979).** Genetics of actinorhodin biosynthesis by *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Microbiology* **114**, 35–43.
- Sa, N., Rawat, R., Thornburg, C., Walker, K. D. & Roje, S. (2016).** Identification and characterization of the missing phosphatase on the riboflavin biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **88**, 705–716.

- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989).** Molecular Cloning. A Laboratory Manual: Vol. 2, 2nd edn.: Cold Spring Harbor.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463–5467.
- Sarge, S., Haase, I., Illarionov, B., Laudert, D., Hohmann, H.-P., Bacher, A. & Fischer, M. (2015).** Catalysis of an essential step in vitamin B2 biosynthesis by a consortium of broad spectrum hydrolases. *Chembiochem* **16**, 2466–2469.
- 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.
- Schwechheimer, S. K., Park, E. Y., Revuelta, J. L., Becker, J. & Wittmann, C. (2016).** Biotechnology of riboflavin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2107–2119.
- Shinkai, S., Kameoka, K., Honda, N., Ueda, K., Manabe, O. & Lindsey, J. (1986).** Coenzyme models: 40. Spectral and reactivity studies of roseoflavin analogs: Correlation between reactivity and spectral parameters. *Bioorg. Chem.* **14**, 119–133.
- Strohm, D., Bechthold, A., Isik, N., Leschik-Bonnet, E. & Hesecker, H. (2016).** Revised reference values for the intake of thiamin (vitamin B1), riboflavin (vitamin B2), and niacin. *NFS J.* **3**, 20–24.
- Studier, F. W. (2005).** Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- Studier, F. W. & Moffatt, B. A. (1986).** Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.* **189**, 113–130.
- Sudarsan, N., Cohen-Chalamish, S., Nakamura, S., Emilsson, G. M. & Breaker, R. R. (2005).** Thiamine pyrophosphate riboswitches are targets for the antimicrobial compound pyrithiamine. *Chem. Biol.* **12**, 1325–1335.
- Tabor, S. & Richardson, C. C. (1985).** A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 1074–1078.
- Tahlan, K., Ahn, S. K., Sing, A., Bodnaruk, T. D., Willems, A. R., Davidson, A. R. & Nodwell, J. R. (2007).** Initiation of actinorhodin export in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* **63**, 951–961.
- The Uniprot Consortium (2018).** UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* **47**, D506–D515.
- 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.
- Volk, R. & Bacher, A. (1990).** Studies on the 4-carbon precursor in the biosynthesis of riboflavin. Purification and properties of L-3,4-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 19479–19485.
- Volk, R. & Bacher, A. (1991).** Biosynthesis of riboflavin. Studies on the mechanism of L-3,4-dihydroxy-2-butanone 4-phosphate synthase. *J. Biol. Chem.* **266**, 20610–20618.
- Wacker, H., Harvey, R. A., Winestock, C. H. & Plaut, G. W. (1964).** 4-(1'-D-Ribitylamino)-5-amino-2,6-dihydroxypyrimidine, the second product of the riboflavin synthetase reaction. *J. Biol. Chem.* **239**, 3493–3497.

- Wada, K., Ishigaki, S., Ueda, K., Sakata, M. & Haga, M. (1985).** An antivitamin B₆, 4'-methoxypyridoxine from the seed of Ginkgo Bilboa L. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3555–3557.
- Wada, K., Ishigaki, S., Ueda, K., Take, Y., Sasaki, K., Sakata, M. & Haga, M. (1988).** Studies on the constitution of edible and medicinal plants. I.: Isolation and identification of 4-O-methylpyridoxine, toxic principle from the seed of Ginkgo biloba L. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1779–1782.
- Waksman, S. A. (1943).** Production and activity of streptothricin. *J. Bacteriol.* **46**, 299–310.
- Waksman, S. A. & Henrici, A. T. (1943).** The Nomenclature and classification of the Actinomycetes. *J. Bacteriol.* **46**, 337–341.
- Waksman, S. A., Reilly, H. C. & Johnstone, D. B. (1946).** Isolation of streptomycin-producing strains of *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **52**, 393–397.
- Watve, M. G., Tickoo, R., Jog, M. M. & Bhole, B. D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* **176**, 386–390.
- Woolley, D. W. & White, A. G. C. (1943).** Selective reversible inhibition of microbial growth with pyrithiamine. *J. Exp. Med.* **78**, 489–497.
- Yu, T.-W., Bai, L., Clade, D., Hoffmann, D., Toelzer, S., Trinh, K. Q., Xu, J., Moss, S. J., Leistner, E. & Floss, H. G. (2002).** The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 7968.