



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Riboflavin-Biosynthese und Roseoflavin-Resistenz im Gram-positiven Bodenbakterium *Streptomyces davawensis*

Autor: Simon Grill
Institut / Klinik: Institut für Molekular- und Zellbiologie der Hochschule Mannheim
Doktorvater: Prof. Dr. M. Hafner

In *Streptomyces davawensis* wird das Antibiotikum Roseoflavin (RoF) aus GTP und Ribulose-5-Phosphat über Riboflavin (RF) synthetisiert. Als erster Schritt zur Untersuchung des Flavin-Stoffwechsels in *S. davawensis* wurden die Riboflavin-Biosynthesegene mit Hilfe eines Koloniemakroarrays identifiziert und kloniert. Die Gene *ribB* (Riboflavin-Synthase; EC 2.5.1.9), *ribM* (Putatives Membranprotein), *ribB* (Bifunktionelle GTP-Cyclohydrolase II/3,4-Dihydroxy-2-Butanon-4-Phosphat-Synthase, EC 3.5.4.25) und *ribH* (Lumazin-Synthase, EC 2.5.1.9) sind in einer Transkriptions-Einheit organisiert. In Northern-Blot Experimenten konnten zwei Transkripte dieses Genclusters von 1,7 und 3,1 kb detektiert werden. Das Gen *ribB* wurde in *Escherichia coli* überexprimiert. Die spezifische Riboflavin-Synthase Aktivität im Rohextrakt eines rekombinanten Stammes betrug $0,246 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Das Gen *ribM* wurde in *E. coli* überexprimiert. Das putative Membranprotein RibM war in der Lage, Riboflavin in einen entsprechenden rekombinanten *E. coli* Stamm zu transportieren. Außerdem erhöhte die Überexpression von *ribM* die Roseoflavin-Sensitivität von *E. coli*. Auf einem weiteren subgenomischen Fragment von *S. davawensis* wurde das Gen *ribG*, welches für die fehlende Riboflavin-spezifische Deaminase/Reduktase (EC 3.5.4.26/EC 1.1.1.193) kodiert, gefunden. Darüber hinaus konnte auf diesem Fragment ein Gen (*ribA2*), das für eine monofunktionelle GTP-Cyclohydrolase II kodiert, identifiziert werden.

Vermutlich katalysiert die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase (EC 2.7.1.26/EC 2.7.7.2) Roseoflavin-sensitiver Organismen die Synthese der inaktiven Cofaktoren Roseoflavinmononukleotid (RoFMN) und Roseoflavinadenindinukleotid (RoFAD) und ist daher für den antimikrobiellen Effekt von Roseoflavin verantwortlich. Experimente mit der FAD-abhängigen D-Aminosäureoxidase aus *Sus scrofa* ergaben, dass das Enzym mit RoFAD als Cofaktor inaktiv ist. *S. davawensis* ist resistent gegen Roseoflavin, der Mechanismus ist jedoch nicht bekannt. Eine hochspezifische Flavokinase/FAD-Synthetase, die nur die Synthese von FMN/FAD aus Riboflavin, nicht aber die Synthese von RoFMN/RoFAD aus Roseoflavin katalysiert, könnte für diese Resistenz verantwortlich sein. Um dies zu untersuchen, wurde das Gen für die bifunktionelle Flavokinase/FAD-Synthetase aus *S. davawensis*, *ribC*, kloniert. RibC wurde in *E. coli* überproduziert und anschließend gereinigt. Die Analyse der kinetischen Eigenschaften von RibC aus *S. davawensis* ergab, dass das Enzym nicht Riboflavin-spezifisch ist (Roseoflavin, $K_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1.7 \cdot 10^{-2}$; Riboflavin, $K_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 7.5 \cdot 10^{-3}$). Ähnliche Ergebnisse wurden mit RibC des Roseoflavin-sensitiven Bakteriums *Bacillus subtilis* erhalten (Roseoflavin, $K_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1.3 \cdot 10^{-2}$; Riboflavin, $K_{\text{kat}}/K_{\text{M}} = 1.3 \cdot 10^{-2}$). Beide Enzyme katalysieren die Synthese von RoFMN und RoFAD. Die funktionelle Expression von *S. davawensis ribC* in einem *ribC* defizienten *B. subtilis* Stamm führte nicht zu einer Roseoflavin-Resistenz. RibC aus *S. davawensis* ist daher nicht an der Roseoflavin-Resistenz von *S. davawensis* beteiligt.