



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

**Die beiden terminalen Schritte der Roseoflavin-Biosynthese in *Streptomyces davawensis* werden von einer bisher unbekanntem *N,N*-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) katalysiert**

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

Das Gram-positive Bodenbakterium *Streptomyces davawensis* synthetisiert während der stationären Wachstumsphase das Antibiotikum Roseoflavin, ein Riboflavin-Analogon. Die genomische Sequenz von *S. davawensis* konnte in Zusammenarbeit mit der Universität Bielefeld vollständig ermittelt werden, was eine wichtige Voraussetzung für die folgenden Arbeiten war. Roseoflavin wird wahrscheinlich ausgehend von Riboflavin über die Intermediate 8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin (AF) und 8-Methylamino-8-demethyl-D-riboflavin (MAF) synthetisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines neu entwickelten Enzymtests erstmals die S-Adenosylmethionin (SAM) abhängige Umsetzung von AF zu MAF und Roseoflavin beobachtet. Das für diese Reaktion verantwortliche Enzym, eine *N,N*-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase, wurde mit Hilfe fraktionierter Fällungen mit Ammoniumsulfat und daran anschließender Säulenchromatographie (drei Schritte) mindestens um den Faktor 1000 angereichert. Nach dem letzten Reinigungsschritt waren nach Analyse mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Färbung mit Coomassie Brilliant Blue G-250 noch fünf verschiedene Proteine zu erkennen. Diese wurden durch enzymatischen Verdau und daran anschließender *de novo* Peptidsequenzierung mittels Tandem-Massenspektrometrie analysiert (*peptide mass fingerprinting*).

Eine der ermittelten Peptidsequenzen konnte dem bisher nicht charakterisierten offenen Leserahmen sda77220 in der genomischen Sequenz von *S. davawensis* zugeordnet werden. Das Transkript des offenen Leserahmens konnte mittels *reverse Transkriptase PCR* und spezifischen Primern nur während der Produktionsphase von Roseoflavin (Stationärphase) nachgewiesen werden. Die heterologe Expression von sda77220 in *Escherichia coli* Rosetta 2 (DE3) zeigte, dass das dazugehörige Genprodukt *N,N*-8-Amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase Aktivität aufwies. Die Inaktivierung von sda77220 durch Insertion einer Resistenzgenkassette in das Chromosom von *S. davawensis* (Wildtyp) erzeugte einen *S. davawensis* Stamm der kein Roseoflavin oder MAF produzieren konnte. Dieser Stamm reichert stattdessen Roseoflavin dessen Vorstufe, AF, an.

Zusammengenommen zeigen die Befunde, dass das Genprodukt von sda77220 das erste bekannte Enzym der Roseoflavin-Biosynthese ist. Aus diesem Grund erhielt das Genprodukt von sda77220 die systematische Bezeichnung RosA. Eine Variante von RosA (mit sechs zusätzlichen C-terminalen Histidin-Resten) konnte aus dem zellfreien Extrakt eines rekombinanten *E. coli* Stammes mit Hilfe der Metallchelat-Affinitätschromatographie gereinigt und biochemisch charakterisiert werden. Für das Substrat AF wurde ein  $K_M$ -Wert von  $57,7 \pm 9,2 \mu\text{M}$  bestimmt ( $V_{\text{max}} = 0,58 \pm 0,03 \mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ;  $k_{\text{kat}} = 0,37 \pm 0,02 \text{ s}^{-1}$ ). Zusätzlich wurde mit Hilfe eines spektroskopischen Titrationsexperiments eine Dissoziationskonstante (KD) für AF von  $10,0 \mu\text{M}$  ermittelt. Auch die zuletzt genannten Daten sprechen dafür, dass AF das natürliche Substrat von RosA ist.

Das Gen *rosA* liegt in einem Genkomplex, der aus 10 Genen besteht und dessen Transkription von dem putativen Promotor  $P_{\text{ros}}$  (TTGACR, -35;-TASRRT, -10) gesteuert wird. Die heterologe Expression dieser Gengruppe in *Streptomyces lividans* bzw. *Streptomyces albus*, beide Bakterienarten produzieren kein Roseoflavin, führte zu keiner Roseoflavin Produktion in den entsprechenden rekombinanten Stämmen. Auch die heterologe Expression eines noch größeren DNA-Abschnitts (38277 bp), der diese Gengruppe und auch angrenzende Gene enthielt, führte nicht zu einer Bildung von Roseoflavin im Kulturüberstand entsprechender rekombinanter Stämme. Es ist daher

wahrscheinlich, dass nicht alle für die Roseoflavin-Biosynthese notwendigen Gene an einem Ort beieinander liegen.

Mit der Identifizierung von *RosA* bzw. des dazugehörigen Gens *rosA* wurde der Grundstein zur weiteren Analyse der Biosynthese von Roseoflavin auf molekularer Ebene gelegt. Mit Hilfe von Daten aus der vorliegenden Arbeit konnte ein hypothetischer Stoffwechselweg für die Biosynthese von Roseoflavin entwickelt werden, der die Basis für die Identifizierung der weiteren an der Roseoflavin-Biosynthese beteiligten Enzyme und Metabolite ist. Darüber hinaus erlauben die Erkenntnisse der Arbeit erstmals die Herstellung von [<sup>14</sup>C]-markiertem Roseoflavin bzw. die biotechnologische Herstellung von AF, das bisher nur in einem aufwendigen chemisch synthetischen Verfahren produziert werden konnte.