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

Aufklärung der Biosynthese des Antibiotikums Roseoflavin aus dem Bakterium Streptomyces davawensis

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

Die Gram-positiven Bodenbakterien *Streptomyces davawensis* und *Streptomyces cinnabarinus* sind die einzigen bekannten Produzenten von Roseoflavin (RoF), einem Riboflavinanalogon mit antibiotischer Wirkung. RoF wird in der stationären Wachstumsphase der Produzenten in das Kulturmedium sekretiert. Der Biosyntheseweg von RoF konnte bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Bekannt waren lediglich die letzten beiden Syntheseschritte, die enzymatische Umwandlung von 8-Demethyl-8-Aminoriboflavin (AF) zu RoF über das Intermediat 8-Demethyl-8-Methylaminoriboflavin (MAF). Beide Methylierungsreaktionen werden dabei von einer *S*-Adenosylmethionin-abhängigen Dimethyltransferase (RosA) durchgeführt.
Die Zugabe stabiler RF-Isotope ([U-^{13}C]RF, [U-^{13}C-U-^{15}N]RF und [U-^{15}N]RF) zu wachsenden *S. davawensis* Kulturen führte zu einer höheren RoF-Konzentration im Kulturmedium ohne das bakterielle Wachstum zu fördern. Die massenspektrometrischen Analysen des neu gebildeten RoF deuteten darauf hin, dass [U-^{13}C]RF, [U-^{13}C-U-^{15}N]RF und [U-^{15}N]RF nach Aufnahme direkt in RoF umgewandelt wurden.
Experimente mit zellfreien Extrakten aus *S. davawensis*, die für enzymatische Tests mit den hypothetischen Intermediaten der RoF-Biosynthese 8-Demethyl-8-Carboxyriboflavin (CF) und 8-Demethyl-8-Hydroxyriboflavin (HF) eingesetzt wurden, ergaben keine enzymatische Umwandlung von CF oder HF. Mit Hilfe von Deletions- und Expressionsexperimenten von Kandidatengenen im heterologen Wirt *Streptomyces coelicolor* M1152 (kein RoF-Produzent) bzw. *S. davawensis* direkt konnte ein neues Enzym, BN159_7989, identifiziert werden, das die Synthese von AF in *S. coelicolor* M1152 erlaubt. Die Überproduktion und Reinigung von BN159_7989-His$_6$ in *Escherichia coli* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Anders als in *S. coelicolor* M1152 führte die Überproduktion von BN159_7989 in *E. coli* nicht zur Produktion von AF sondern von AF-Monophospat, das fest an das Protein gebunden vorlag. Die Überproduktion von BN159_7989 und RosA in *S. coelicolor* M1152 und *E. coli* resultierte in beiden Organismen in der Produktion von RoF, was darauf deutete, dass *in vivo* nur zwei Enzyme für die Synthese von RoF notwendig sind. *In vitro* Experimente mit BN159_7989 zeigten, dass das Enzym FMN und FAD nicht aber RF als Substrat akzeptierte. BN159_7989 katalysiert *in vitro* die Umwandlung von FMN zu einem neuen Flavin (sehr wahrscheinlich 8-Demethyl-8-Carbonylriboflavin, CaF) mit einem m/z-Wert von 471. In dieser Reaktion wurde also mit hoher Wahrscheinlichkeit die Methylgruppe an C8 von FMN zu einer Aldehydgruppe oxidiert. Das entstandene CaF wurde von BN159_7989 *in vitro* nicht komplett bis zum AF umgesetzt. Wie genau die Aminogruppe eingeführt wird bzw. welcher Metabolit Aminogruppendonor ist, ist z. Z. noch unklar. Allerdings deuten die meisten Daten dieser Arbeit darauf hin, dass BN159_7989 alleine die Umwandlung von FMN zu AF durchführen kann. Damit wäre die RoF-Biosynthese aufgeklärt.