

***In vivo*-Studien zur ClpP-Maschinerie in
Streptomyceten am Beispiel des ADEP-Produzenten
Streptomyces hawaiiensis NRRL 15010 und des
Modellorganismus *Streptomyces lividans***

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von
Dhana Manon Thomy
aus Mönchengladbach

Tübingen
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

13.09.2019

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Harald Groß

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung.....	VIII
Abstract	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Antibiotikaforschung und das Resistenzproblem unserer Zeit	1
1.2 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten.....	5
1.3 Acyldepsipeptid-Antibiotika.....	7
1.4 Die Clp Protease	9
1.5 ClpP als Target der Acyldepsipeptide	12
1.6 ClpP in Streptomyceten	14
1.7 ADEP-Resistenz in Streptomyceten	17
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Materialien	19
2.1 Geräte.....	19
2.2 Chemikalien, Antibiotika, Enzyme, Kits, Antikörper	19
2.2.1 Chemikalien	19
2.2.2 Antibiotika	21
2.2.3 Enzyme, Kits und Antikörper	21
2.3 Synthetische Oligonukleotide	22
2.4 Plasmide	25
2.5 Bakterienstämme	27
2.6 Medien	34
2.6.1 Flüssigmedien	34
2.6.2 Festmedien	35
2.7 Puffer, Lösungen, Größenstandards	35
2.8 Software und Internetanwendungen	39
3 Methoden.....	41
3.1 Mikrobiologische Methoden	41
3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen	41
3.1.2 Messung des Wachstums von Bakterien	41
3.1.3 Bioassays	41
3.2 Molekularbiologische Methoden.....	42
3.2.1 Aufreinigung von DNA	42
3.2.2 Aufreinigung von RNA.....	43

3.2.3	Enzymatische <i>in vitro</i> -Reaktionen von DNA.....	43
3.2.4	PCR-Methoden	45
3.2.5	Techniken zur Klonierung	47
3.3	Elektrophoretische Methoden	50
3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	50
3.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.4	Proteinbiochemische Methoden	51
3.4.1	Gewinnung von Protein-Zellextrakten aus Streptomyceten.....	51
3.4.2	Semidry Western Blot.....	51
3.4.3	Proteinexpression	52
3.4.4	Aufreinigung von Proteinen mittels Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography.....	52
3.4.5	Substratspezifitäts-Assay für Adenylierungsdomänen.....	53
3.5	Chromatographische Methoden	54
3.5.1	Adsorptionschromatographie zur Fraktionierung von Kulturüberständen.....	54
3.5.2	Semipräparative Aufreinigung von ADEP1.....	54
3.5.3	LCMS-Analyse von ADEP1.....	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Charakterisierung von <i>Streptomyces hawaiiensis</i> NRRL 15010	56
4.1.1	Allgemeine Beobachtungen.....	56
4.1.2	Wachstumskurven und Charakterisierung der ADEP-Produktion.....	56
4.1.3	DNA-Transfer in <i>S. hawaiiensis</i>	58
4.2	Aufreinigung von ADEP1 aus dem Kulturüberstand	60
4.3	Sensitivität von Streptomyceten gegen verschiedene ADEP-Derivate	61
4.4	Das ADEP-Biosynthesegencluster	62
4.4.1	<i>In silico</i> -Analyse der Gencluster-Sequenz	62
4.4.2	Knockout- und Knockdown-Versuche.....	68
4.5	Studien zur Clp-Maschinerie in Streptomyceten	70
4.5.1	Analyse von <i>clpP</i> -Genen und ihrer Expression in <i>S. hawaiiensis</i> und <i>S. lividans</i> TK24	71
4.5.2	Analyse von ClpP-Proteinen in <i>S. lividans</i>	75
4.5.3	ClpP _{ADEP} -vermittelte ADEP-Resistenz in Streptomyceten.....	84
5	Diskussion	95
5.1	Die konstitutive ADEP-Produktion von <i>S. hawaiiensis</i> ermöglicht ein robustes Aufreinigungsverfahren für ADEP1 aus dem Kulturüberstand im kleinen Maßstab	95
5.2	Das <i>ade</i> -BGC besteht aus drei minimalistischen Subclustern zur Biosynthese des peptidischen Rückgrats, der Polyenseitenkette und des nicht-proteinogenen MePros.....	96

5.3	Die ClpP-Maschinerien von <i>S. hawaiiensis</i> und <i>S. lividans</i> TK24	97
5.3.1	<i>clpP</i> -Genexpressionsanalysen in <i>S. hawaiiensis</i> und <i>S. lividans</i> TK24	98
5.3.2	<i>In vivo</i> -Studien zur ClpP-Maschinerie in <i>S. lividans</i> TK24 zeigen höchste Komplexizität und strikte Kontrolle der Protease auf	100
5.3.3	ClpP _{ADEP} vermittelt ADEP-Resistenz in <i>S. lividans</i> TK24 durch Interaktion mit ClpP1 und ClpP2	105
5.4	Ausblick.....	108
6	Anhang	111
6.1	Weitere Western Blot-Analysen	111
6.1.1	Western Blot-Analysen von <i>S. hawaiiensis</i> -Zellextrakten	111
6.1.2	Induzierbare Expression von ClpP _{ADEP} in <i>S. lividans</i> $\Delta clpP1$	111
6.1.3	Induzierbare Expression von ClpP _{ADEP} und ClpP _{ADEP} -His in <i>S. lividans</i> $\Delta clpP1$	112
6.1.4	Prozessierungstabelle	112
6.2	Vektorkarten.....	113
6.2.1	Konstrukte basierend auf pET-Duet.....	113
6.2.2	Konstrukte basierend auf pIJ6902	115
6.2.3	Konstrukte basierend auf pSET152ermE* Δ HindIII.....	118
6.2.4	Konstrukte basierend auf pIJ12551	119
6.2.5	Konstrukte basierend auf pIJ10257	123
6.2.6	Konstrukte basierend auf pGusA21	127
6.2.7	Konstrukte basierend auf pGM-GUS.....	129
6.2.8	Konstrukte basierend auf pGM-GUS-Xba	130
6.2.9	Konstrukte basierend auf pA18	138
6.3	Sequenzen und Alignments	140
6.3.1	Alignment von AdeA und GriE aus <i>Streptomyces</i> DSM 40835	140
6.3.2	Alignment von AdeB und GriF aus <i>Streptomyces</i> DSM 40835	140
6.3.3	Alignment potentieller Enzyme für die Reduktion von (3 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-3-Methyl- Δ 1-pyrrolin-5-carboxylsäure zu (2 <i>S</i> ,4 <i>R</i>)-4-Methylprolin in verschiedenen Organismen	141
6.3.4	Alignment von AdeC mit putativen Acyl-Carrier-Proteinen verschiedener Organismen	142
6.3.5	Alignment von AdeD mit putativen Ketosynthase- α -Untereinheiten verschiedener Organismen.....	142
6.3.6	Alignment von AdeE mit putativen Ketosynthase- β -Untereinheiten verschiedener Organismen.....	143
6.3.7	Alignment von AdeF mit putativen Ketoreduktasen verschiedener Organismen	144
6.3.8	Alignment von putativen Dehydratasen des Primärstoffwechsels verschiedener Organismen	145

6.3.9	Das <i>clpP1clpP2</i> -Operon und <i>clpX</i> in <i>S. hawaiiensis</i>	145
6.3.10	Das <i>clpP3clpP4</i> -Operon und <i>popR</i> in <i>S. hawaiiensis</i>	150
6.3.11	<i>clpP5</i> in <i>S. hawaiiensis</i>	154
6.3.12	<i>clpP_{ADEP}</i> in <i>S. hawaiiensis</i>	155
6.3.13	Sequenzen von bekannten Regulatoren der <i>Streptomyces</i> -ClpP-Maschinerie in <i>S. hawaiiensis</i>	157
6.3.14	Clp-ATPasen in <i>S. hawaiiensis</i>	159
6.4	GenBank-Zugangsnummern (Accession Numbers)	168
6.5	Literaturverzeichnis	169
6.6	Abbildungsverzeichnis	180
6.7	Tabellenverzeichnis	187
6.8	Publikationen.....	188
6.9	Danksagung	189

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
μ	mikro (10 ⁻⁶)
2xYT	engl. <i>twofold yeast-trypton</i>
A	L-Alanin
A	Adenin
A	Ampere
AAA+	engl. <i>ATPases associated with diverse cellular activities</i>
CoA	Coenzym A
<i>ade</i>	Acyldepsipeptid-Biosynthesegen
ADEP	Acyldepsipeptid
Ala	L-Alanin
AS	Aminosäure
Asp	L-Asparaginsäure
AT	Acyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	engl. <i>area under the curve</i>
BGC	Biosynthesegencluster
BLAST	engl. <i>basic local alignment search tool</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	L-Cystein
cDNA	komplementäre DNA
CLF	engl. <i>chain length factor</i>
ClgR	engl. <i>clp and lon gene regulator</i>
Clp	caseinolytische Protease
C _t	engl. <i>cycle treshold</i>
D	L-Asparagin
DHF	Dihydrofolsäure
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	L-Glutaminsäure
EDTA	Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure
ESBL	engl. <i>extended spectrum β-lactamases</i>
ESI	Elektrosprayionisation
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa</i>
F	L-Phenylalanin
g	Gram
G	L-Glycin
gDNA	genomsiche DNA
Gly	L-Glycin
h	Stunde
H	L-Histidin
His	L-Histidin
His6	sechsfacher Histidin-Taq
HPLC	engl. <i>high performance liquid chromatography</i>
I	L-Isoleucin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

KS	Ketosynthase
l	Liter
L	L-Leucin
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
LCMS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrikopplung
M	L-Methionin
m	Masse
m	milli (10^{-6})
M	Molarität (Stoffmengenkonzentration) [mol/L]
Mb	Megabasenpaare (10^6)
MePro	(2S,4R)-4-Methylprolin
MHK	Minimale Hemmkonzentration
min	Minute
mol	Stoffmenge ($6,022 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Mannitol-Sojamehl
MT	Methyltransferase
n	nano (10^{-9})
NCBI	engl. <i>national center for biotechnology information</i>
Ni	Nickel
noRT	Kontrolle ohne Reverse Transkriptase bei der qPCR
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NTA	Nitrilotriessigsäure
NTC	Kontrolle ohne Template bei der qPCR
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	engl. <i>open reading frame</i>
oriT	engl. <i>origin of transfer</i>
P	ClpP
PABA	<i>para</i> -Aminobenzoessäure
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PBST	PBS mit 0,1% Tween 20
PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
pH	lat. <i>pontentia hydrogenii</i> ; Gegenzahl des dekadischen Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
Phe	L-Phenylalanin
Pip	L-Pipecolinsäure
PKS	Polyketidsynthase
PopR	engl. <i>clpP3</i> operon regulator
Pro	L-Prolin
PRSP	Penicillin-resistenter <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Q	L-Glutamin
qPCR	engl. <i>quantitative real-time PCR</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	engl. <i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
S	L-Serin
s	Sekunde
SAM	engl. <i>Streptomyces antibiotic medium</i>

SDS-PAGE	engl. <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	L-Serin
T	L-Tyrosin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
THF	Tetrahydrofolsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSB	engl. <i>tryptic soy broth</i>
TYM	engl. <i>tryptone yeast magnesium</i>
V	L-Valin
V	Volt
VE	vollentsalzt
VRE	Vancomycin-resistenter <i>Enterococcus</i>
W	L-Tryptophan
Y	L-Tyrosin
YM	engl. <i>yeast malt</i>

Zusammenfassung

Streptomyces hawaiiensis NRRL 15010 ist der natürliche Produzentstamm des Sekundärmetabolitkomplexes A54556, einem Extrakt mit bisher sechs strukturell aufgeklärten antibiotisch wirksamen Acyldepsipeptid-Derivaten (ADEPs). Für diese neue Antibiotikaklasse konnte eine vielversprechende Aktivität gegen verschiedenste Gram-positive Bakterien gezeigt und ein vollkommen neuartiger Wirkmechanismus beschrieben werden. Das ADEP-Target ist die proteolytische Kernkomponente ClpP der bakteriellen caseinolytischen Protease, einer ATP-abhängigen Serinprotease, die eine wichtige Rolle für die Proteinhomeostase und -qualitätskontrolle sowie die regulatorische Proteolyse spielt. Durch seine Bindung an ClpP verdrängt ADEP die mit ClpP assoziierten Clp-ATPasen von ihren Bindestellen und unterbindet dadurch sämtliche natürlichen ClpP-Funktionen. Des Weiteren induziert die ADEP-Bindung eine Konformationsänderung der ClpP-Fasstruktur, welche die Eintrittspore zum katalytischen Zentrum erweitert, so dass essentielle, insbesondere naszierende Zellproteine hineingelangen und abgebaut werden, was einen lethalen Effekt auf die bakterielle Zelle hat.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Protokoll zur Aufreinigung von ADEP1, der aktiveren der beiden Hauptkomponenten des A54556-Komplexes, aus dem Kulturüberstand von *S. hawaiiensis* etabliert, so dass das Antibiotikum für Experimente im weiteren Verlauf dieser Arbeit in ausreichender Menge zur Verfügung stand.

Des Weiteren sollte das bisher unbekannte ADEP-Biosynthesegencluster in *S. hawaiiensis* identifiziert und analysiert werden. Mit Hilfe der Software-Tools antiSMASH und BLAST wurde ein Gencluster gefunden und annotiert, welches putative Gene für Biosyntheseeinheiten zur Bereitstellung von (2*S*,4*R*)-4-Methylprolin, zur Generierung der ADEP-Alkenseitenkette sowie zur Biosynthese des Hexadepsipeptidrückgrats, und damit der vollständigen ADEP-Primärstruktur, aufwies. Weiterführende Analysen und Experimente zur biochemischen Charakterisierung lieferten deutliche Hinweise auf die Identität des Clusters und bestätigten außerdem ein zusätzliches *clpP*-Homolog, *clpP*_{ADEP}, als Resistenzfaktor.

Die Funktionalität von ClpP_{ADEP} sowie der durch dieses ClpP-Homolog vermittelte Resistenzmechanismus konnten nicht durch *in vivo*-Experimente im Produzentstamm selbst untersucht werden, da es trotz einer Vielzahl angewandter Verfahren nicht gelang, den Stamm genetisch zu modifizieren. Allerdings konnte das Resistenzprinzip erfolgreich in den genetisch gut zugänglichen Modellorganismus *S. lividans* übertragen und dort untersucht werden. Vorteilhaft war weiterhin, dass in *S. lividans* bereits Vorarbeiten zur komplexen Multigen-Clp-Maschinerie in Streptomyceten durchgeführt worden waren.

Knockouts und anschließende Komplementierungen der verschiedenen *clpP*-Gene in *S. lividans* TK24 sowie die Analyse der Mutanten in Bioassays und ihrer Proteinzell-extrakte in Western Blots brachten neue Erkenntnisse über ADEP-Sensitivität, Prozessierungen, Interaktionen, Komplexbildung und Funktionalität der einzelnen ClpP-Homologe.

Auf Grundlage dieser Erkenntnisse wurde ebenfalls *clpP*_{ADEP} in *S. lividans* TK24 eingebracht und seine Funktionalität untersucht. Bioassay- und Western Blot-Analysen ergaben deutliche Hinweise auf einen neuartigen, dualen Resistenzmechanismus. Es konnte gezeigt werden, dass der Resistenzfaktor zum einen durch ADEP überaktivierte ClpP-Komplexe detoxifiziert, als auch selbst an der Bildung von funktionalen, ADEP-resistenten Komplexen beteiligt ist. Somit ist ClpP_{ADEP} in der Lage, die verlorene, essentielle proteolytische ClpP-Aktivität wiederherzustellen und dem Organismus das Überleben zu sichern.

Abstract

Streptomyces hawaiiensis NRRL 15010 is the natural producer of the secondary metabolite complex A54556, which comprises at least six closely related congeners of antibiotic acyldepsipeptides (ADEPs). This new class of antibiotics showed promising activity against a variety of Gram-positive bacteria and exhibits an unprecedented mode of action. ADEP targets the proteolytic core ClpP of the bacterial caseinolytic protease, an ATP-dependent serin protease, which plays a crucial role in protein homeostasis, quality control and regulatory proteolysis.

ADEP binding to ClpP displaces the associated Clp-ATPases from their binding sites, which results in the inhibition of natural substrate degradation. Furthermore, it induces a conformational shift in the ClpP tetradecamer, which widens the entrance pores to the catalytic sites and allows entry and uncontrolled degradation of essential cell proteins.

Within the scope of this thesis a purification protocol was established, to efficiently purify ADEP1, the most active of the two main congeners in the A54556 extract, from the *S. hawaiiensis* culture supernatant. The purified compound was central to many of the experiments detailed in this thesis.

A further aim of this study was the identification and characterization of the ADEP biosynthetic gene cluster which had remained elusive, so far. Using the software tools antiSMASH and BLAST, a cluster was found and annotated which comprised the putative biosynthetic genes necessary for the generation of (2*S*,4*R*)-4-methylproline, the ADEP alkene side-chain and the hexadepsipeptide backbone, accounting for all the structural elements present in the ADEP primary structure.

Further analyses and experiments to characterize the biosynthetic gene cluster biochemically provided strong evidence for the identity of the cluster and also confirmed an additional *clpP* homolog, *clpP*_{ADEP}, as resistance factor.

The functionalities of ClpP_{ADEP} as a peptidase, as well as the mode of resistance mediated by this protein, could not be investigated in *in vivo* experiments with the producer *S. hawaiiensis* itself, as despite substantial efforts, the strain was not genetically tractable in our hands. However, the resistance factor could be transferred and was functional also in the genetically well tractable model organism *S. lividans*, which was used for mechanistic studies on *clpP*_{ADEP}. By choosing *S. lividans* as a model, preceding information on the complex multigene Clp machinery in streptomycetes could be used that had been published for this strain.

Knockouts and subsequent complementations of the different *clpP* genes in *S. lividans* TK24 as well as analyses of the mutants in bioassays and their protein extracts in Western Blots provided new insights about ADEP sensitivity, processing, interactions, complex formation and functionality of the individual ClpP homologs.

Based on these experiments, *clpP*_{ADEP} was introduced into *S. lividans* TK24 and its functionality was characterized. Bioassay and Western Blot analyses yielded evidence for a novel, dual mode of resistance. The resistance factor was able to detoxify by ADEP overactivated ClpP complexes, while simultaneously being involved in the formation of functional, ADEP resistant complexes, which restored the essential proteolytic ClpP activity and in that way secured survival of the organism.

1 Einleitung

1.1 Antibiotikaforschung und das Resistenzproblem unserer Zeit

„Antibiotikaresistenzen“ und „Problemkeime“ sind Begriffe, die mittlerweile nicht mehr nur Fachgruppen wie Ärzten, Apothekern und Wissenschaftlern geläufig sind, sondern von den Medien auch immer häufiger an die Gesellschaft herangetragen werden. Wir haben einen Zeitpunkt erreicht, der von manchen schon als Beginn der „post-antibiotischen Ära“ beschrieben wird.

Laut dem Robert Koch Institut (RKI) erleiden jährlich 400.000 bis 600.000 Patienten in Deutschland eine nosokomiale, das heißt im Krankenhaus erworbene, Infektion. 30.000 bis 35.000 dieser Patienten sind mit multiresistenten Erregern infiziert und von diesen wiederum 1.500 mit Bakterien, gegen die kaum noch ein Antibiotikum wirksam ist (Gastmeier and Fätkenheuer, 2015). Abzuschätzen, wie viele Menschen aufgrund der im Krankenhaus erworbenen Infektionen sterben ist nahezu unmöglich, da die Patienten für gewöhnlich an schweren Primärerkrankungen leiden und durch ihren schlechten Immunstatus anfällig für Infektionen sind, so dass unklar bleibt, ob die Todesursache schlussendlich die eigentliche Erkrankung oder die im Krankenhaus erworbene Infektion ist.

Im Gegensatz zur allgemeinen Annahme, dass Antibiotikaresistenzen ein neuzeitliches Phänomen darstellen, wurde kürzlich in Studien mit Permafrostproben gezeigt, dass Resistenzgene schon vor mindestens 30.000 Jahren existiert haben. Erst der steigende und vor allem unbedachte Einsatz von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin sowie in der Massentierhaltung seit Beginn des 20. Jahrhunderts bewirkte einen Anstieg der Häufigkeit von resistenten Bakterien durch den permanenten Selektionsdruck (D'Costa et al., 2011).

Im Prinzip haben Bakterien evolutionär gesehen zwei Möglichkeiten sich gegen eine Antibiotikatherapie zu schützen. Zum einen können Mutationen dazu führen, dass sie gegen die eingesetzte Substanz unempfindlich werden, durch a) direkte Mutation des Targets, b) Mutationen, die dazu führen, dass die Substanz vermindert aufgenommen oder c) vermehrt ausgeschieden wird (Efflux-Pumpen). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, durch horizontalen Gentransfer von anderen Bakterien die Fähigkeit zu erwerben, Resistenzfaktoren zu exprimieren. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Expression von β -Lactamasen, die je nach Spezifität den β -Lactam-Ring in Penicillinen, Cephalosporinen und/oder Carbapenemen hydrolysieren und das Antibiotikum unwirksam machen (Blair et al., 2015; Munita and Arias, 2016). Besorgniserregend in diesem Kontext ist seit einigen Jahren das Auftreten von Bakterienstämmen, die sogenannte *extended spectrum β -lactamases* (ESBL), also β -Lactamasen mit einem erweiterten Spektrum, exprimieren. Diese sind in der Lage, die Mehrheit der Antibiotikaklassen, die einen β -Lactamring besitzen (Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Monobactame), zu hydrolysieren (Bradford, 2001). Als Folge steht gegen ESBL-Stämme durch eine solche Kreuzresistenz ein ganzes Panel von Antibiotika nicht mehr zur Verfügung (Paterson and Bonomo, 2005).

Betrachtet man die sogenannten ESKAPE-Pathogene (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und verschiedene *Enterobacter*-Spezies), eine Auswahl an multiresistenten Erregern, die weltweit für die Mehrheit der nosokomialen Infektionen verantwortlich sind, wird schnell klar, dass nahezu alle Antibiotikaklassen von einer ähnlichen Entwicklung betroffen sind und der Bedarf an neuen

Substanzen sowie neuen Targets immens und dringlich ist (Pogue et al., 2015; Scheld et al., 2008).

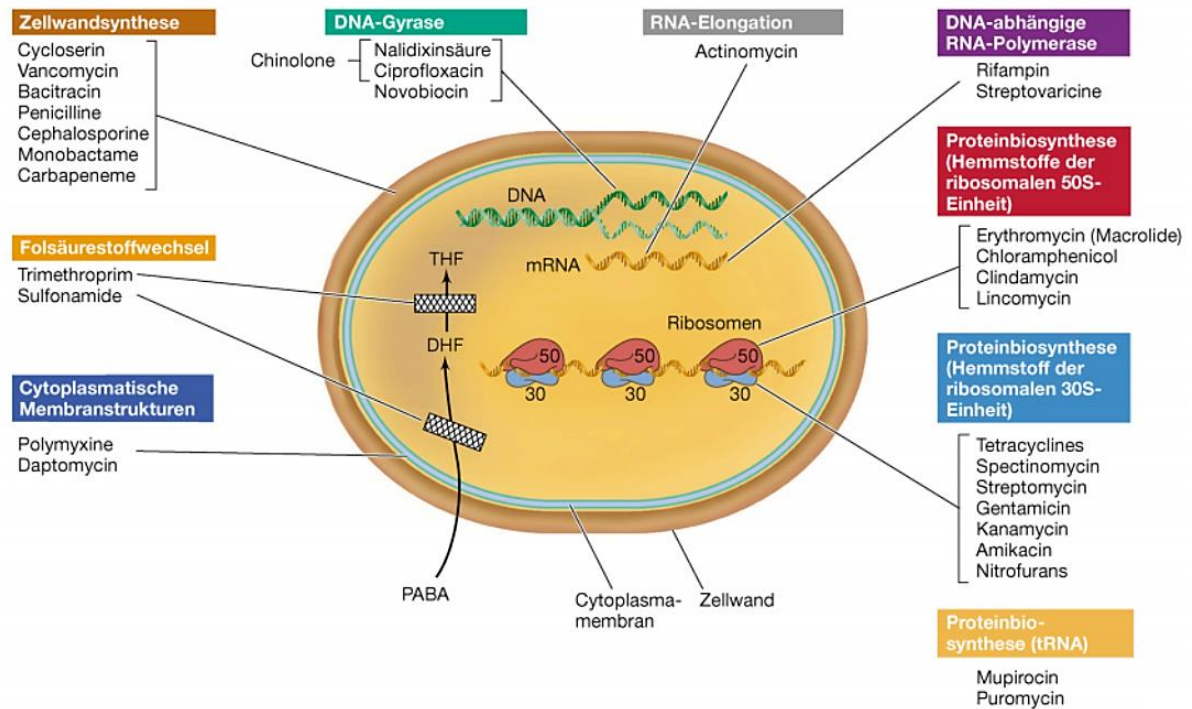


Abbildung 1: Angriffsorte von Antibiotika an und in der bakteriellen Zelle (Madigan and Martinko, 2013). THF: Tetrahydrofolsäure, DHF: Dihydrofolsäure; PABA: Paraaminobenzoensäure.

In **Abbildung 1** sind die Zielstrukturen der gängigsten Antibiotika aufgezeigt. Die absolute Mehrheit aller verwendeten Substanzen greift insgesamt in lediglich fünf verschiedene Stoffwechselwege inhibierend ein: DNA- und RNA-Synthese, Proteinbiosynthese, Zellwandsynthese und Folsäurestoffwechsel. So bleibt die Hoffnung, dass in Zukunft antimikrobielle Substanzen gefunden werden, die noch weitere bakterielle Strukturen und Stoffwechselwege angreifen und somit Resistenzbrecher sind.

Neben einer potenten, in der Regel inhibitorischen Wirkung am Target muss ein gutes Antibiotikum auch physikochemische, pharmakologische und toxikologische Voraussetzungen erfüllen. Bei intrazellulären Targets ist außerdem eine gute Aufnahme in die Bakterienzellen erforderlich.

Die Cytoplasmamembran dient sowohl in Gram-positiven als auch in Gram-negativen Bakterien der Kontrolle, was passiv oder durch aktiven Transport in die Zelle gelangt. So können nur ungeladene, lipophile Moleküle hineindiffundieren, während alle anderen einen spezifischen, energieabhängigen Transporter benötigen. In Gram-positiven Bakterien besteht die auf der Cytoplasmamembran aufliegende, festigende Zellwand hauptsächlich aus Peptidoglykan, während sie bei Gram-negativen Bakterien lediglich aus einer dünnen Schicht Peptidoglykan besteht, auf die allerdings eine weitere Membran gelagert ist, die den Eintritt von Molekülen wiederum streng kontrolliert und als Resistenzfaktor gegen viele Antibiotika fungiert (**Abbildung 2**). So sind wesentlich mehr antibiotische Substanzen bekannt, die gegen Gram-positive Bakterien wirksam sind als gegen Gram-negative, da viele Substanzen bei diesen ihr Target im Inneren der Zelle durch die doppelte Membranbarriere gar nicht erst erreichen können.

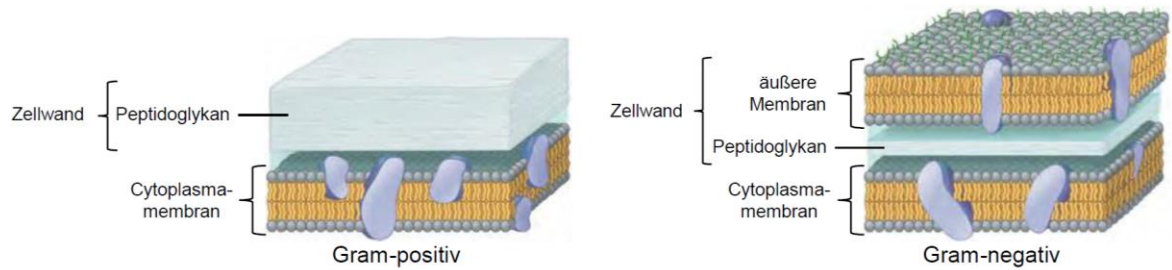


Abbildung 2: Aufbau der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Campbell et al., 2010).

Die klassischen Breitbandantibiotika können gleichermaßen in Gram-positive wie Gram-negative Bakterien aufgenommen werden und machen eine Antibiose durch eine kalkulierte Initialtherapie möglich, wenn noch nicht bekannt ist, welches Bakterium die zu therapierende Infektion hervorruft.

Allerdings stellt die Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen mit innovativen Wirkmechanismen an bisher unbekanntem Targets, selbst mit nur einem schmalen Spektrum, Wissenschaft und Pharmaindustrie seit Jahren vor eine große Hürde.

Während zwischen 1940 und 1960 noch das „Goldene Zeitalter“ der Antibiotika gefeiert wurde, kam es nach 1962 nur noch zu wenigen Entdeckungen neuer Antibiotikaklassen (Silver, 2011) (**Abbildung 3**). Zwar kommen bis heute jedes Jahr neue Antibiotika als Medikamente auf den Markt, jedoch handelt es sich in der Regel um optimierte Vertreter einer bereits bekannten Klasse sowie Wirkstoffkombinationen und Substanzen zur ausschließlich topischen Anwendung (Butler et al., 2016; Lewis, 2013). Auch werden bereits seit langem bekannte Substanzen weiterentwickelt, die nach vielen Jahren der Optimierung und klinischen Studien schließlich zugelassen werden (Daptomycin z. B. wurde 1986 als erstes Lipopeptid-Antibiotikum entdeckt, erlangte seine Zulassung als Medikament allerdings erst im Jahr 2003).

Alle „frühen“ Antibiotikaklassen wurden, abgesehen vom Zufallsfund von Penicillin durch Sir Alexander Fleming im Jahre 1928, durch einfache Screenings von Naturstoffextrakten oder Chemikalien als antibakteriell erkannt und zeigten in weiteren Untersuchungen gute pharmakologische und toxikologische Eigenschaften. Leider scheint der Erfolg dieser Art des Screenings limitiert zu sein, da mittlerweile zwar viele neue Bakterienstämme gefunden werden, die bekannte Substanzen produzieren, aber die Anzahl der neuen antibakteriellen Strukturen, die zudem adäquate pharmakologische und toxikologische Eigenschaften zeigen, ist minimal (Lewis, 2013).

Auch die Suche nach neuen synthetischen Leitstrukturen mittels Target-basierter Ansätze durch Hochdurchsatz-Screenings von Substanzbibliotheken zur Inhibierung isolierter Enzyme brachte bisher nur mäßigen Erfolg. In einem solchen Ansatz können zwar die physikochemischen Eigenschaften gesteuert werden, aber die notwendige Aufnahme in die bakterielle Zelle sowie pharmakologische Aspekte werden nicht berücksichtigt (Payne et al., 2007).

Daher gehen die aktuellen Ansätze wieder in Richtung Naturstoffe, z. B. durch die Suche in bisher weniger berücksichtigten Lebensräumen wie den Ozeanen. Ebenso liegen die Hoffnungen auf sogenannten stillen Biosynthesegenclustern, die z. B. nur unter bestimmten Wachstumsbedingungen, durch Quorum Sensing oder bei Co-Kultivierungen zur Produktion von

antimikrobiellen Substanzen angeschaltet werden und auch durch bioinformatische Screenings von sequenzierten Genomen gefunden werden können (Lewis, 2013).

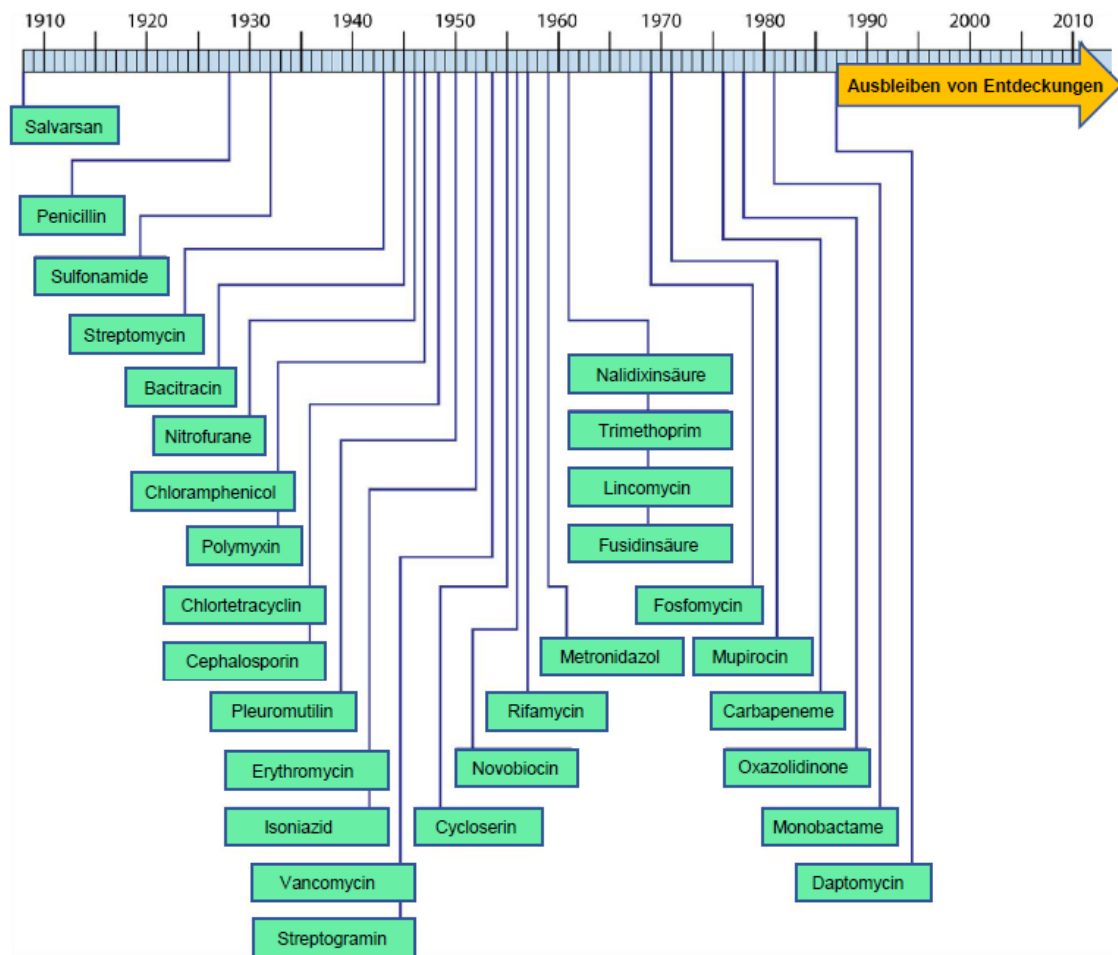


Abbildung 3: Zeitstrahl über die Entdeckung neuer Antibiotikaklassen. Angegeben sind die Zeitpunkte der ersten Veröffentlichung oder Patentierung (Silver 2011, modifiziert).

Da viele Mikroorganismen unter Laborbedingungen nicht kultivierbar sind, werden metagenomische Ansätze verwendet, die die Identifizierung von Genclustern, zellunabhängig, allein aus DNA ermöglichen. Dazu wird aus Umweltproben isolierte DNA entweder bioinformatisch analysiert oder in Wirtsorganismen eingebracht, so dass metagenomische Klone auf interessante Phänotypen und neue Sekundärmetabolite untersucht werden können (Katz et al., 2016; Milshteyn et al., 2014).

Ein weiterer Ansatz ist die gezielte Suche nach Substanzen gegen bestimmte Pathogene, wie z. B. den Tuberkulose-Erreger *Mycobacterium tuberculosis* oder Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA). So wurde kürzlich mit dem MRSA-wirksamen Antibiotikum Lugdunin eine neuartige Struktur mit noch unbekanntem Wirkmechanismus beschrieben, die von einem im Mikrobiom des Menschen angesiedelten *Staphylococcus*-Stamm produziert wird (Zipperer et al., 2016).

Trotz innovativer Ansätze besteht auf mehreren Ebenen ein akuter Handlungsbedarf: bei der generellen Hygienesituation in deutschen Krankenhäusern, beim unbedachten Einsatz insbesondere von Reserveantibiotika und bei der Suche nach neuen antibakteriellen Wirkstoffen.

Letztere werden bis heute mehrheitlich als Sekundärmetabolite von Bakterien oder Pilzen entdeckt oder davon abgeleitet. Die Gattung *Streptomyces* stellt dabei die prominenteste Bakteriengattung dar und wird im folgenden Kapitel vorgestellt.

1.2 Streptomyceten als Naturstoffproduzenten

Gram-positive Bakterien lassen sich grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilen, in Bakterien, deren Genom einen niedrigen Gehalt an Guanin- und Cytosin-Basen aufweist und solche mit einem hohen Gehalt. Letztere bilden die Abteilung der Actinobacteria, in welche die Gattung *Streptomyces* eingegliedert ist. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um aerobe, saprophytische Bodenbakterien mit einer großen Ähnlichkeit zu filamentösen Pilzen, da ihnen ein komplexer, multizellulärer Lebenszyklus gemein ist (**Abbildung 4**). Aus einer Spore, einer ruhenden Dauerform, bildet sich unter geeigneten Bedingungen ein Keimfaden, der durch Längenwachstum zu Hyphen auswächst. Durch zusätzliche Verzweigungen wächst ein dichtes, vegetatives Mycel heran, welches in das Substrat eindringt, um Nährstoffe aus der Umgebung aufzunehmen. Eine Erschöpfung des Nährstoffangebots dient neben anderen Faktoren als Signal für das Auswachsen eines Luftmycels. Lufthyphen werden durch eine spezielle Form der Zellteilung in Kompartimente gegliedert und wachsen durch Verdickung der Sporenwände und weitere Entwicklungsschritte zu reifen Sporen heran (Chater, 1993; Flärdh and Buttner, 2009).

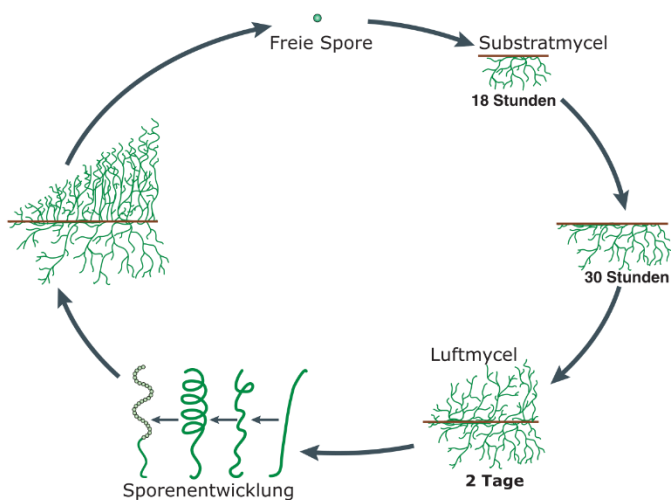


Abbildung 4: Der Lebenszyklus von Streptomyceten (Angert 2005, modifiziert). Aus einer keimenden Spore wächst eine vegetative Hyphe aus, die sich durch Zellteilung verzweigt und ein Substratmycel bildet. Werden Nährstoffe rar, induziert dies die Bildung eines Luftmycels. Durch Zellteilung der Enden von Substratmycelfilamenten entstehen schließlich Sporenketten.

Neben einem hohen GC-Gehalt von rund 70% (Wright and Bibb, 1992) weisen Streptomyceten außerdem mit rund 8 Mb ein fast doppelt so großes Genom wie *Escherichia coli* auf, das zudem als lineares Chromosom vorliegt (Kieser et al., 1992; Leblond et al., 1993).

Wie bereits erwähnt umfasst die Gattung *Streptomyces* die meisten Antibiotikaproduzenten unter den Mikroorganismen. Rund zwei Drittel aller antimikrobiellen Wirkstoffe und auch bioaktiver Metabolite mit anderer Wirkung (z. B. Zytostatika oder Antimykotika) werden von Actinomyceten produziert, von diesen wiederum rund 80% von Streptomyceten, wie z. B. Chloramphenicol aus *Streptomyces venezuelae*, Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* und Kanamycin aus *Streptomyces kanamyceticus* (Kieser et al., 2000).

Nicht zu Unrecht wurde *Streptomyces* im Jahr 2016 von der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie in Deutschland zur Mikrobe des Jahres gewählt. Die Fachgesellschaft

führt in ihrer Laudatio auf diese Gattung aus (Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie, 2016), dass *Streptomyces* indirekt bereits zwei Mal mit dem Nobelpreis geehrt wurde – als Produzent des Antibiotikums Streptomycin (1952) und des gegen Wurminfektionen wirkenden Ivermectins (2015) – und dass Streptomyceten viele weitere Talente besitzen: Sie spielen eine wesentliche Rolle beim Recycling abgestorbener Pflanzen, für die Humusbildung und sorgen nebenbei für den frischen Duft von Waldboden.

Streptomyceten, wie auch andere Mikroorganismen, produzieren eine Vielfalt an bioaktiven Sekundärmetaboliten und machen sich dabei verschiedene Synthesemaschinerien zu Nutze. Hier werden die für diese Arbeit wichtigen Systeme zur Synthese von peptid- und polyketidhaltigen Naturstoffen beschrieben.

Peptidische Verbindungen werden hauptsächlich auf zwei verschiedene Arten synthetisiert, entweder wie Peptide des Primärstoffwechsels durch ribosomale Synthese und anschließende post-translationale Modifikationen oder durch große Multienzymkomplexe, die nicht_ribosomalen_Peptidsynthetasen (NRPS). Letztere haben den Vorteil Peptide großer struktureller Diversität synthetisieren zu können, da sie bezüglich der Substrate nicht wie das Ribosom auf 20 proteinogene Aminosäuren beschränkt sind.

NRPS bestehen aus Modulen, wobei jedes Modul für den Einbau einer bestimmten Aminosäure verantwortlich ist und die Reihenfolge der Aminosäuren im Produkt abhängig von der Reihenfolge der Module ist. Jedes Modul besteht aus wenigstens drei Domänen (**Abbildung 5**): eine Adenylierungsdomäne (A) zur Substraterkennung, die die Aminosäure unter ATP-Verbrauch zu Aminoacyl-Adenylat aktiviert und diese kovalent als Thioester an den Co-Faktor 4'-Phosphopanthethin der Peptidyl-Carrier-Protein-Domäne (PCP) bindet und schließlich eine Kondensationsdomäne (C), die die an zwei benachbarten PCP-Domänen gebundenen Aminoacyl-Substrate mit einer Peptidbindung verknüpft. Ausgenommen hiervon sind das initiale Modul, das lediglich aus einer A- und einer PCP-Domäne besteht und das terminale Modul, das die Synthese in der Regel mittels einer zusätzlichen Thioesterase (TE) beendet und das Produkt, häufig unter Zyklisierung, freisetzt. Weitere Domänen können in den jeweiligen Modulen weitere Modifikationen bewirken, wie z. B. Epimerase-Domänen (E) oder Methyltransferase-Domänen (MT) (Dickschat, 2011; Finking and Marahiel, 2004; Fischbach and Walsh, 2006).

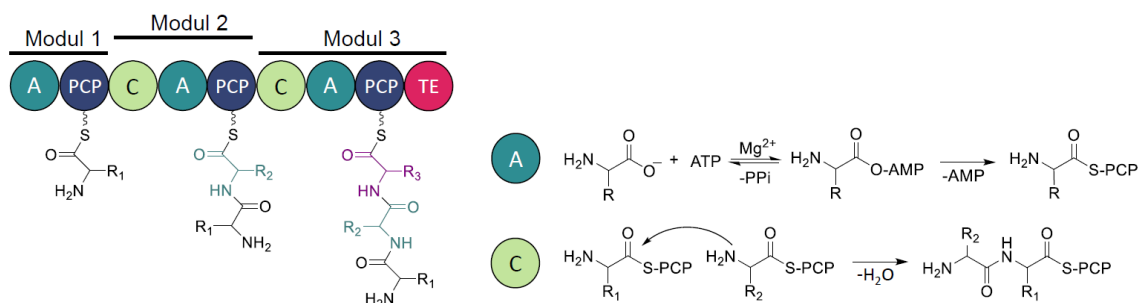


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biosynthese eines Peptids durch eine NRPS. Nach Auswahl und Aktivierung eines Substrats durch die A-Domäne wird dieses an die PCP-Domäne gebunden. Bei der Verknüpfung der Aminosäuren an zwei benachbarten PCP-Domänen durch die C-Domäne kommt es zum nukleophilen Angriff der Aminogruppe der bereits eingebauten Aminosäure an der Carboxylgruppe der neu Eintretenden Aminosäure und schließlich zur Ausbildung einer Amidbindung.

Ähnlich modular aufgebaut sind Polyketidsynthasen (PKS), welche Acetyl-CoA und Malonyl-CoA zu Polyketidverbindungen verknüpfen. Analog zu NRPS verknüpft eine Acyltransferase-Domäne (AT) das von ihr ausgewählte Substrat an die 4'-Phosphopanthethin-Gruppe der Acyl-Carrier-

Protein-Domäne (ACP), so dass eine Ketosynthase-Domäne (KS) die Erweiterung der Poly- β -Ketoesterkette katalysieren kann. Des Weiteren findet sich bei PKS wie bei NRPS im initialen Modul keine KS und eine TE-Domäne im letzten Modul beendet die Synthese. Weitere modifizierende Domänen können vorhanden sein, wie Ketoreduktase-Domänen (KR), die die β -Ketoacylgruppe zu einer β -Hydroxyacyleinheit reduzieren, Dehydratase-Domänen (DH), die durch den Verlust von Wasser eine Doppelbindung einführen sowie Enoylreduktase-Domänen (ER), die diese Doppelbindung zu einer gesättigten Einfachbindung reduzieren. Die beschriebene Form der PKS wird als modularer Typ I bezeichnet (Fischbach and Walsh, 2006; Smith and Tsai, 2007). Typ II-PKS bestehen aus einigen wenigen alleinstehenden Enzymen, die wiederholt genutzt werden, um eine Polyketidverbindung zu synthetisieren. Die minimale Typ II-PKS besteht aus einer ACP-Domäne, die die wachsende Polyketidkette trägt sowie einem Dimer aus einer funktionalen KS-Domäne (KS_{α}) und einer KS-Domäne (KS_{β}), deren katalytische Triade durch das Fehlen des Cysteins nicht funktional ist. Diese auch *chain length factor* (CLF) genannte KS_{β} -Domäne bestimmt zum einen die Kettenlänge der wachsenden Polyketidkette und ist zum anderen höchstwahrscheinlich am Laden von Malonyl-CoA-Einheiten auf die ACP-Domäne und ihrer anschließenden Decarboxylierung zu Acyl-KS beteiligt. Produkte von Typ II-PKS sind in der Regel große, aromatische Polyketidverbindungen (Hertweck et al., 2007). Typ III-PKS bestehen lediglich aus einer KS-Domäne, die sämtliche Reaktionen, zunächst die Kondensation von Startereinheiten zu einer Polyketidkette und anschließend eine intramolekulare Zyklisierung, alleine ausführt (Fischbach and Walsh, 2006; Shimizu et al., 2017).

NRPS und PKS können eigenständig vorkommen, aber auch kombiniert als Hybrid-NRPS/PKS-Systeme vorliegen und ermöglichen somit die Synthese einer unglaublichen Vielfalt an Naturstoffen (Fisch, 2013).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Biosynthese der antibiotisch wirksamen Acyldepsipeptide beleuchtet werden, die als peptid- und polyketidhaltige Sekundärmetabolite von einem *Streptomyces*-Stamm produziert werden und im folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

1.3 Acyldepsipeptid-Antibiotika

1985 wurde erstmals der antibiotisch wirksame Extrakt A54556 aus *Streptomyces hawaiiensis* NRRL 15010 (wird im Folgenden abgekürzt als *S. hawaiiensis* bezeichnet) beschrieben und sechs darin enthaltene, eng verwandte Komponenten wurden neben der Aufklärung ihrer Struktur bezüglich ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften charakterisiert (Michel and Kastner, 1985) (Abbildung 6).

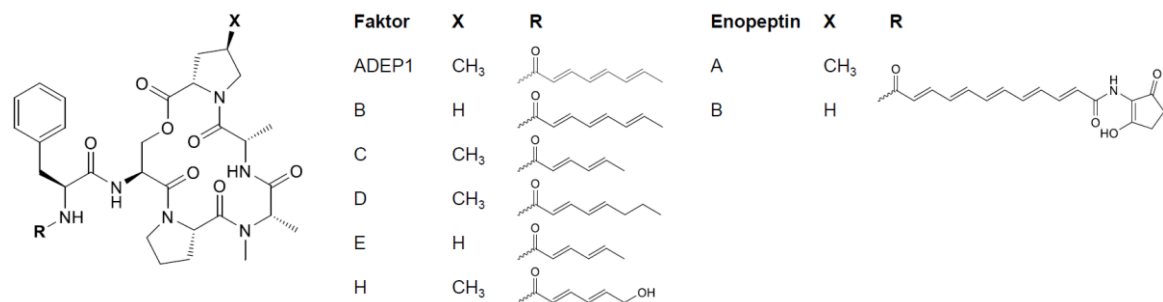


Abbildung 6: Natürliche Enopeptin-Depsipeptid-Derivate. Faktor A, B, C, D, E und H wurden 1985 aus dem Acyldepsipeptid-Extrakt A54556 aus *S. hawaiiensis* NRRL 15010 isoliert und strukturell aufgeklärt (Hinzen et al., 2006; Michel and Kastner, 1985). Die 1991 isolierten Enopeptine A und B sind Sekundärmetabolite aus *Streptomyces* sp. RK-1051 (Koshino et al., 1991).

Obwohl auch bereits eine Aktivität gegen Penicillin-resistente Staphylokokken und Streptokokken gezeigt werden konnte, wurde die Forschung an diesem Extrakt erst 20 Jahre später durch die Bayer AG wieder aufgenommen. Nach Vollsynthese der wirksamsten Hauptkomponente ADEP1 (vormals *factor A*) sowie der Synthese von strukturoptimierten Derivaten, wurde die antibiotische Aktivität untersucht und die neuartige Targetstruktur der Acyldepsipeptide (ADEPs) identifiziert (Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Bis heute sind ADEPs im Fokus vieler Wissenschaftler und sowohl die Substanzen selbst, als auch ihre Zielstruktur werden intensiv erforscht.

ADEPs gehören strukturell gesehen zur Familie der Enopeptine, mit einem Lactonring aus fünf S-konfigurierten Aminosäuren, an den über die Aminogruppe eines Serins ein Phenylalanin mit einer lipophilen Seitenkette verknüpft ist (Hinzen et al., 2006; Osada et al., 1991). Sie sind eng verwandt mit den 1991 isolierten Enopeptinen A und B, für die erstmals die richtige Konfiguration dieser Substanzklasse publiziert wurde (**Abbildung 6**) (Koshino et al., 1991).

Biosynthetisch interessant ist das (2*S*,4*R*)-4-Methylprolin in ADEP1 und Enopeptin A. Hierbei handelt es sich um eine nicht-proteinogene Aminosäure, deren Vorkommen bisher nur für wenige Naturstoffe berichtet wurde (Hibi et al., 2013; Liu et al., 2014b; Luesch et al., 2003; Lukat et al., 2017).

Um sowohl die physikochemischen als auch die pharmakokinetischen Eigenschaften (schlechte Wasserlöslichkeit, Licht- und Hitzeempfindlichkeit der konjugierten Alkenstruktur, Hydrolyseempfindlichkeit des Lactonrings sowie der Seitenkette) der natürlichen Derivate zu optimieren, wurden durch Totalsynthese verschiedene Derivate hergestellt (**Abbildung 7**) (Hinzen et al., 2006).

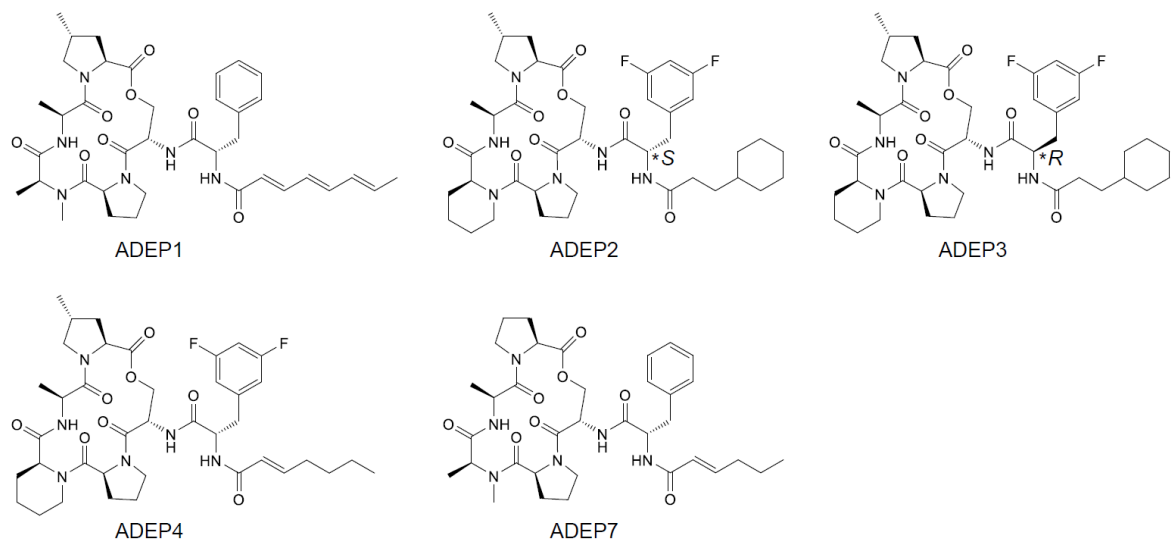


Abbildung 7: Strukturen verschiedener ADEP-Derivate. Chiralitätszentren in ADEP2 und ADEP3 sind mit einem Stern markiert.

Brötz-Oesterhelt *et al.* zeigten für zwei dieser Derivate, ADEP2 und ADEP4, im Vergleich zu dem natürlichen Derivat ADEP1 und dem durch *R*-Konfiguration inaktiven ADEP3 eine beeindruckende antibakterielle Aktivität gegen Gram-positive Pathogene im Tiermodell und *in vitro* (Tabelle 1).

Stamm	Resistenz-Phänotyp	ADEP1	ADEP2	ADEP3	ADEP4
<i>Bacillus subtilis</i> 168		0,2	0,05	>100	0,01
<i>Streptococcus pneumoniae</i> 665	PRSP	1,6	0,05	>100	0,02
<i>Streptococcus pyogenes</i> Wacker		0,4	0,01	>100	0,02
<i>Enterococcus faecalis</i> ICB 27159		0,4	≤0,01	>100	≤0,01
<i>Enterococcus faecium</i> L 4001	VRE	0,4	0,02	>100	≤0,01
<i>Staphylococcus aureus</i> NRS 119	MRSA	6,3	0,4	>100	0,05

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen für repräsentativ ausgewählte klinische Isolate als Maß für die antibakterielle *in vitro*-Aktivität verschiedener ADEP-Derivate (Brötz-Oesterhelt *et al.* 2005, modifiziert). PRSP: Penicillin-resistenter *Streptococcus pneumoniae*; VRE: Vancomycin-resistente Entereokokken; MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*.

In weiteren Optimierungsansätzen konnte gezeigt werden, dass durch Austausch bestimmter Aminosäuren im Lactonring eine Stabilisierung der bioaktiven Konformation und damit eine Wirkungssteigerung erreicht werden kann (Carney *et al.*, 2014b). So wurde ebenfalls das N-Acyldifluorophenylalanin als kleinste notwendige Einheit für die Bioaktivität beschrieben und bietet Möglichkeiten zum Design weiterer nicht-peptidischer Derivate (Carney *et al.*, 2014a).

Durch Einbauversuche mit radioaktiv markierten Ausgangsstoffen konnte keiner der klassischen Antibiotika-Wirkmechanismen (Biosynthese von RNA, DNA, Proteinen, Zellwand oder Folsäure) den ADEPs zugeschrieben werden. Untersuchungen einer spontan ADEP-resistenten *Escherichia coli*-Mutante (entstanden durch ADEP-Behandlung der Efflux-Pumpen-Mutante *E. coli* HN818 *ΔacrA* in Gegenwart des die Membran permeabilisierenden Polymyxin B Nonapeptids) zeigten Nonsense-Mutationen in ClpP, der katalytischen Kernkomponente der bakteriellen caseinolytischen Protease, welche damit als neuartiges antibakterielles Target identifiziert wurde (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005).

1.4 Die Clp Protease

Um nicht genutzte Proteine effizient abbauen zu können, während der Rest des Proteoms unangetastet bleibt, arbeiten in der bakteriellen Zelle eine Reihe von streng kontrollierten AAA+ Proteasen (*ATPases associated with diverse cellular activities*). Hierbei handelt es sich um kompartimentierte Proteasen, die aus einer Peptidase sowie einer energieliefernden ATPase bestehen, wobei erste als proteolytischer Kern fungiert und letztere Substrate erkennt, entfaltet und in die proteolytische Kammer der Peptidase einführt. In Bakterien gehören hierzu die Peptidase ClpP in Kombination mit verschiedenen Clp-ATPasen (ClpA, ClpC, ClpX), Lon, HslUV (alternativer Name ClpYQ), FtsH sowie in Actinomyceten das 20S Proteasom (Olivares *et al.*, 2015; Sauer and Baker, 2011).

Die caseinolytische Protease Clp ist eine in Prokaryoten streng konservierte, ATP-abhängige Serin-Protease, die ihren Namen aufgrund ihrer Fähigkeit, in *in vitro*-Experimenten Casein abzubauen zu können, trägt. Sie ist maßgeblich an der Proteinhomeostase in der Zelle beteiligt, indem sie durch Oxidation und Hitze geschädigte Proteine, falsch gefaltete oder anderweitig unbrauchbare Proteine sowie regulatorische Proteine, die z. B. wichtig für die Zelldifferenzierung oder Virulenz sind, abbaut (Feng *et al.*, 2013; Frees *et al.*, 2014; Olivares *et al.*, 2015).

Das proteolytische Zentrum ClpP besteht aus 14 ClpP-Monomeren, die sich nach Assemblierung von zwei Heptamerringen zu einer tetradekameren Faszstruktur zusammenlagern (**Abbildung 8**). Diese trägt in ihrem Inneren vierzehn aktive Zentren, deren katalytische Triaden von den Aminosäuren Serin (Ser), Histidin (His) und Asparaginsäure (Asp) gebildet werden.

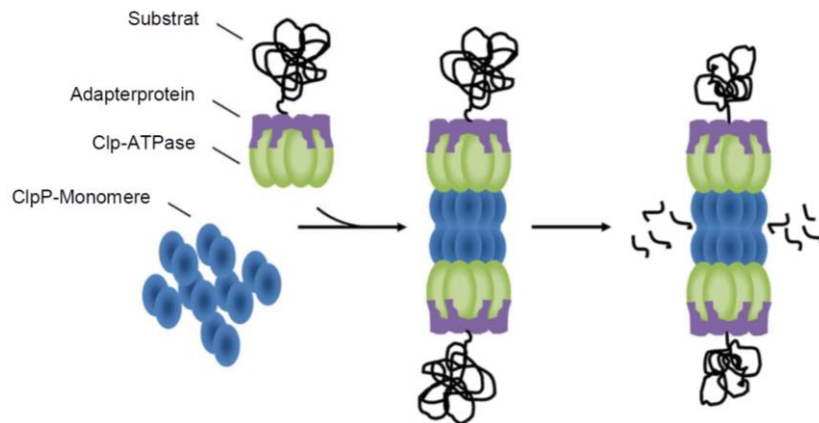


Abbildung 8: Zusammensetzung und Funktion der bakteriellen Clp-Protease (Brötz-Oesterhelt & Sass 2014, modifiziert). Clp-ATPasen fördern die Oligomerisierung von ClpP-Monomeren zu tetradekameren Komplexen und erkennen Substrate, die nach Entfaltung zum Abbau in die proteolytische Kammer eingeführt werden und dort zerschnitten werden. An der Substraterkennung können Adapterproteine beteiligt sein.

In *in vitro*-Experimenten mit isoliertem ClpP aus *E. coli* als Modellorganismus für Gram-negative Bakterien war das ClpP-Oligomer peptidisch aktiv, aber konnte keine Proteine schneiden (Thompson et al., 1994). ClpP aus *B. subtilis* hingegen war alleine nicht in der Lage selbst kurze Peptide abzubauen (Kirstein et al., 2006). Um *B. subtilis* ClpP zum Peptid- und Proteinverdau sowie *E. coli* ClpP zum Proteinabbau zu aktivieren, werden assoziierte Clp-ATPasen benötigt. Diese werden anhand von spezifischen Sequenzabschnitten und der Anzahl und dem Abstand ihrer Nukleotidbindestellen in Subfamilien eingeteilt. Während ClpX allen Bakterien gemein ist, treten für ClpA, ClpC und ClpE speziesabhängig verschiedene Kombinationen auf (Frees et al., 2007). Monomere der Clp-ATPasen bilden hexamere Ringstrukturen und je eine dieser Strukturen bindet über sechs flexible Schleifen an hydrophobe Taschen auf den Außenseiten des oberen und/oder unteren ClpP-Heptamers (Grimaud et al., 1998; Kirstein et al., 2006).

Die Erkennung der Substrate erfolgt über spezifische Erkennungssequenzen, sogenannte Degrons, die C-terminal, N-terminal oder auch innerhalb der Proteinsequenz lokalisiert sein können. Das wohl prominenteste Beispiel ist das SsrA-Tag, bestehend aus 11 hydrophoben Aminosäuren, welche C-terminal an naszierende Proteine angehängt werden, wenn die ribosomale Proteinsynthese durch beschädigte mRNA zum Erliegen kommt (Keiler et al., 1996). Abhängig vom jeweiligen Organismus erkennen unterschiedliche Clp-ATPasen SsrA-markierte Proteine (ClpX und ClpA in *E. coli*, ClpX in *B. subtilis*, ClpX, ClpC und ClpE in *Streptococcus mutans*) und führen sie ClpP zum Abbau zu (Gottesman et al., 1998; Tao and Biswas, 2015; Wiegert and Schumann, 2001). Während solche Degrons bereits einen spezifischen Abbau der durch sie markierten Proteine bewirken, kann die Substratspezifität der Clp-ATPasen weiter durch Adapterproteine gesteuert werden, die an diese binden, sie aktivieren und ihre Funktion modulieren (Kirstein et al., 2009b).

Der ersten Beschreibung von ClpP aus *E. coli* (Katayama-Fujimura et al., 1987) folgten vielfältige Studien über ClpP-Proteine aus verschiedenen Organismen sowie diverse hochaufgelöste Röntgenkristallstrukturen, die Einblick in die komplexe, dynamische Struktur und die Funktion der Peptidase gaben.

Das ClpP-Monomer lässt sich grob in drei funktionelle Bereiche gliedern: eine axiale Schleife am N-Terminus, eine Hauptdomäne sowie eine dynamische Henkelregion (Abbildung 9).

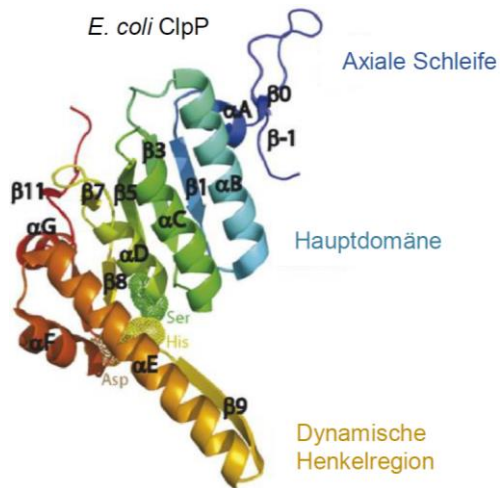


Abbildung 9: Sekundäre Strukturelemente eines ClpP-Monomers aus *E. coli*. Gepunktete Bereiche stellen die Aminosäuren der katalytischen Triade dar (Ser-His-Asp) (Yu & Houry 2007, modifiziert).

Nach der Oligomerisierung kontrollieren die N-terminalen axialen Schleifen den Zugang von Substraten durch die axialen Poren zum katalytischen Zentrum, indem sie verschiedene Konformationen annehmen („up“ und „down“) und außerdem zur Interaktion von ClpP mit den assoziierten Clp-ATPasen beitragen (Gribun et al., 2005). Die Hauptdomänen der ClpP-Monomere bilden zusammen den fassartigen Körper, der die katalytischen Triaden umgibt. Für die dynamische Henkelregion wurden mittels Kristallstrukturen drei verschiedene Zustände beschrieben, durch die ClpP eine elastische Struktur erhält. Im *extended state*, also einem gestreckten Zustand, sind die $\beta 9$ - sowie die E-Helix streng geordnet, was eine Konformation erzeugt, die die Aminosäuren der katalytischen Triade in einen für die Katalyse vorteilhaften Abstand bringt. Der *compact state*, ein kompakter Zustand, ist charakterisiert durch eine ungeordnete Henkelregion, was zu einer Inaktivierung der Protease durch eine ungeordnete katalytische Triade führt. Im *compressed state* führt ein Knick in der E-Helix zu einer gestauchten Anordnung, die zwar inaktiv bezüglich der Peptidaseaktivität ist, aber durch entstehende Seitenporen in der Equatorialebene vermutlich maßgeblich an der Freisetzung der Abbauprodukte beteiligt ist (Gersch et al., 2012; Gribun et al., 2005; Kimber et al., 2010; Liu et al., 2014a).

In *M. tuberculosis*, dem Erreger der Tuberkulose und einem aufgrund von Multiresistenzen weltweiten Problemkeim, sieht die Organisation der Clp-Protease anders aus als in den bisher beschriebenen Modellorganismen. Im Genom von Mykobakterien finden sich Gene für zwei ClpP-Homologe (Gene, die von einem gemeinsamen Vorfahren abstammen), die in einem bicistronischen Operon (*clpP1clpP2*) liegen und beide essentiell für das Wachstum, die proteolytische *in vitro*-Aktivität und *in vivo* für die Infektion von Mäusen sind (Raju et al., 2012). Anfänglich konnte gezeigt werden, dass ClpP1 sich selbst und auch ClpP2 *in vitro* zwar unabhängig von Clp-ATPasen prozessiert, aber dass beide Homologe *in vitro*, selbst in Kombination, nur peptidolytisch inaktive homotetradekamere Komplexe bilden. Erst zusammen mit einem synthetischen Aktivatorpeptid (Benzylloxycarbonyl-Leucyl-Leucin, kurz Z-LL) dissoziieren die zunächst inaktiven homotetradekameren Komplexe auseinander und lagern sich zu peptidolytisch aktiven Heterotetradekameren, bestehend aus einem ClpP1- und einem ClpP2-Homoheptamer, zusammen (Akopian et al., 2012). Außerdem entsteht in Anwesenheit beider ClpP-Homologe, einer Clp-ATPase (ClpC1 oder ClpX) und ATP sowie einem gefalteten Modellsubstrat wie GFP-SsrA ein stabiler Komplex, der proteolytisch aktiv ist und das Substrat

abbaut (Schmitz and Sauer, 2014). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass sich die Affinität der beiden ClpP-Homoheptamere zu den Clp-ATPasen stark unterscheidet, da nur für ClpP2 eine Interaktion mit den Clp-ATPasen ClpX und ClpC1 gezeigt werden konnte, die letztendlich zu einer aktiven Konformation führte (Leodolter et al., 2015).

Auch für weitere Bakterien-Gattungen wurden mehrere *clpP*-Gene beschrieben, die aber nicht zusammen in einem Operon transkribiert werden. So exprimieren *Listeria monocytogenes* und *Chlamydia trachomatis* jeweils zwei monocistronische ClpPs. Während für die ClpP-Homologe aus *Listeria* eine Heterokomplexbildung gezeigt werden konnte, wurde für die Chlamydien-ClpP-Proteine bisher eine unabhängige Homooligomerbildung angenommen (Fisher et al., 2018; Zeiler et al., 2013). Neuste *in vitro*-Experimente weisen aber auch für die ClpP-Homologe der Gattung *Chlamydia* auf die Bildung eines Heterotetradekamers hin (Stefan Pan, persönliche Mitteilung). *Pseudomonas aeruginosa* stellt ein weiteres Pathogen dar, dass zwei *clpP*-Gene besitzt. Hier scheinen die Homologe abhängig und unabhängig voneinander verschiedene Funktionen bezüglich der Motilität, Pigmentproduktion, Eisenaufnahme und Biofilmbildung zu erfüllen (Hall et al., 2017).

Wie bereits erwähnt, wurde ClpP als neuartige Target-Struktur der antibiotisch wirksamen ADEPs in Gram-positiven Bakterien identifiziert (Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Kürzlich wurde aber auch eine Wirksamkeit gegen Gram-negative Endobakterien der Gattung *Wolbachia* und *Neisseria meningitidis* beschrieben (Goodreid et al., 2014; Schiefer et al., 2013). Im Gram-negativen Modellorganismus *E. coli* kann ADEP in Ganzzellversuchen die Zellwand nicht überqueren, stellt aber in *in vitro*-Experimenten mit der isolierten Protease ein wichtiges Werkzeug zur Erforschung der Clp-Maschinerie in Gram-negativen sowie in Gram-positiven Bakterien dar. Der Wirkmechanismus wird im folgenden Kapitel 1.5 beschrieben.

1.5 ClpP als Target der Acyldepsipeptide

Erste Studien zum ADEP-Wirkmechanismus wurden an isoliertem ClpP von *B. subtilis* durchgeführt. Durch Zugabe von äquimolaren Konzentrationen von ADEP1 oder ADEP2 konnte ClpP proteolytisch aktiviert werden und das Modellsubstrat Casein, unabhängig von den natürlich assoziierten ATPasen, vollständig abbauen (Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Des Weiteren wurde gezeigt, dass ADEPs auf mehreren Ebenen in Funktion und Organisation der ClpP-Maschinerie eingreifen (**Abbildung 10**).

In vitro triggern sie die Oligomerisierung von *B. subtilis* ClpP-Monomeren zu Tetradekameren und stabilisieren den ClpP-Tetradekamerkomplex in *E. coli* (Kirstein et al., 2009a; Li et al., 2010). Außerdem verhindern sie die Interaktion von ClpP mit den Clp-ATPasen durch Bindung an dieselben Bindestellen oder verdrängen letztere sogar aus bereits bestehenden Komplexen mit ClpP. Somit werden natürliche Substrate nicht mehr abgebaut, die Proteinhomöostase der Bakterienzelle ist gestört und alle natürlichen Funktionen der Protease werden unterbunden. Dies macht aber nicht den alleinigen Wirkmechanismus aus, da ClpP in den meisten Bakterien nicht essentiell ist. Zusätzlich aktivieren ADEPs ClpP zum Abbau von naszierenden, ungefalteten Proteinen *in vitro* und *in vivo* und berauben es so seiner Substratspezifität. Somit sind ADEPs die ersten Antibiotika, für die eine Überaktivierung der Zielstruktur im Gegensatz zu einer reinen Inhibierung beschrieben wurde (Brötz-Oesterhelt et al. 2005; Kirstein et al. 2009; Brötz-Oesterhelt & Sass 2014). Strukturell gesehen bewirkt die ADEP-Bindung an ClpP eine Konformationsänderung, die die axiale Pore erweitert und die N-terminalen Schleifen in eine

„up“-Stellung bringt, so dass die katalytischen Zentren im Inneren der Faszstruktur für ungefaltete Proteine erreichbar werden (Malik and Brötz-Oesterhelt, 2017).

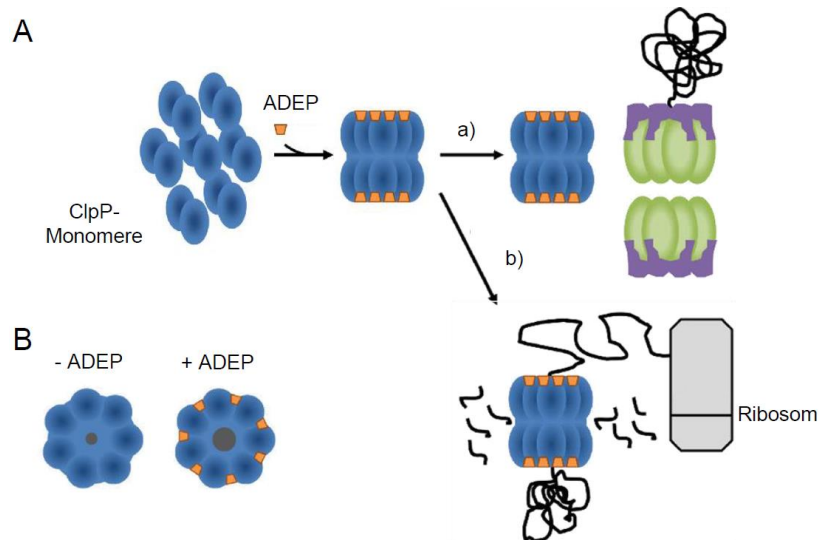


Abbildung 10: Modell des Wirkmechanismus von ADEPs an ClpP. A) ADEPs fördern die Oligomerisierung von Monomeren zu Tetradekamer-Komplexen und verdrängen die Clp-ATPasen von ihren Bindestellen (a). B) Durch eine Konformationsänderung öffnen sie die Eintrittsporen und ermöglichen den Abbau von ungefalteten, naszierenden Proteinen direkt am Ribosom (b) (Brötz-Oesterhelt & Sass 2014, modifiziert).

Sass *et al.* beobachteten unter ADEP-Konzentrationen nahe der minimalen Hemmkonzentration (MHK) als außergewöhnlichen Phänotyp eine Filamentierung bei *B. subtilis* sowie ein Anschwellen der Kokken *S. aureus* und *S. pneumoniae*. Sie identifizierten das Zellteilungsprotein FtsZ als erstes Substrat ADEP-aktivierten ClpPs. FtsZ polymerisiert unter physiologischen Bedingungen GTP-abhängig zu einem sogenannten Z-Ring und ist durch die Formierung des Divisoms maßgeblich an der Zellteilung beteiligt. FtsZ, und somit die Zellteilung, scheinen ein bevorzugtes Target für durch ADEPs reprogrammiertes ClpP zu sein (Sass *et al.*, 2011).

In den bisher untersuchten Gram-positiven Bakterien der Abteilung Firmicutes, wie *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. faecalis* und *S. pneumoniae*, ist ClpP nicht essentiell und unter ADEP-Behandlung ließen sich *in vitro* zu Resistenz führende Punktmutationen mit einer Häufigkeit von 10^{-6} selektieren, was für den Einsatz in der Klinik eine Kombinationstherapie nahelegt (Brötz-Oesterhelt *et al.*, 2005).

Interessant vor diesem Hintergrund ist aber, dass ClpP einen starken Einfluss auf die Virulenz von Pathogenen sowie das Ansprechen auf eine antibiotische Therapie hat. So verursacht eine *clpP*-Deletionsmutante von *S. aureus* im Mausmodell wesentlich geringere Gewebeläsionen als der Wildtyp und sie ist auch wesentlich weniger tolerant gegenüber oxidativem Stress (Frees *et al.*, 2003). Auch die humanen Pathogene *Listeria monocytogenes* und *Salmonella typhimurium* zeigen verminderte Virulenz gegenüber Makrophagen bzw. im Mausmodell, wenn *clpP* deletiert ist (Gaillot *et al.*, 2000). Dies bestätigt die Protease als interessantes Target und eröffnet neue Möglichkeiten für Studien über ADEPs als mögliche Antivirulenz-Antibiotika.

Kürzlich wurde gezeigt, dass ADEP4 in der Lage ist selbst persistierende Bakterien zu töten. Persister stellen eine ruhende Form von Bakterien dar, bei denen der Stoffwechsel sowie der ATP-Gehalt in der Zelle und die Expression der klassischen Targetstrukturen auf ein Minimum reduziert sind. Unter Bedingungen, bei denen klassische Antibiotika unwirksam sind, kann ADEP-

aktiviertes ClpP Proteine ATP-unabhängig abbauen und so in Kombination mit Rifampicin selbst Biofilme und schwere Infektionen mit *S. aureus* im Mausmodell ausmerzen (Conlon et al., 2013).

Mykobakterien stellen bezüglich der Wirkung von ADEPs bisher einen Sonderfall dar. Wie bereits beschrieben, binden die Clp-ATPasen hier im natürlichen Komplex lediglich an das ClpP2-Heptamer im ClpP1P2-Heterotetradekamer. Auch für ADEP2 konnte gezeigt werden, dass es ausschließlich an diese Untereinheit binden. Vor dem Hintergrund, dass ClpP in Mykobakterien essentiell ist, das Zellteilungsprotein FtsZ hier im Kontrast zu anderen Bakterien kein Substrat für ADEP-aktiviertes ClpP ist und die Aktivierung der Proteolyse durch ADEP nur schwach und nur in Anwesenheit des Aktivatorpeptids Z-LL möglich ist, kam die Möglichkeit in Betracht, dass ADEPs in Mykobakterien keine überaktivierende Funktion haben. Knockdown-Studien, bei denen die Expression des *clpP1clpP2*-Operons kontrolliert heruntergefahren wurde, zeigten, dass eine verringerte Menge an ClpP1 und ClpP2 die Zelle sensitiver gegenüber ADEP macht, anstatt sie vor einer möglichen Überaktivierung zu schützen. Somit sind Mykobakterien die erste bekannte Bakterien-Spezies, bei der die inhibierende Wirkung von ADEP ausschlaggebend für die Letalität des Antibiotikums ist (Akopian et al., 2012; Famulla et al., 2016; Vass and Chien, 2016).

Nach der Veröffentlichung von ADEPs und ihrem Target ClpP wurde das Interesse vieler geweckt, das mögliche Potential beider Strukturen aus verschiedenen Blickwinkeln zu beleuchten. Neue Ansätze der Strukturoptimierung resultierten in ADEP-Vertretern, für die MHK-Werten gegen *S. pneumoniae* und *E. faecalis* beschrieben wurden, die noch niedriger liegen als die von ADEP4 (Carney et al., 2014b).

Sieber und Böttcher publizierten in 2008 und 2009 mit dem β -Lacton D3 und weiter optimierten Analoga die ersten ClpP-Inhibitoren. Der mit diesen Substanzen erzielte chemische Knockout von ClpP führt zu einer verminderten Expression wichtiger Virulenzfaktoren in *S. aureus* (Böttcher and Sieber, 2008, 2009).

Des Weiteren wurden interessante Substanzen gefunden, die die Interaktion von ClpP mit den Clp-ATPasen verhindern. Cyclomarin A, ein zyklisches Heptapeptid, welches von einem marinen Streptomycceten-Stamm produziert wird, bindet spezifisch an ClpC1 von *M. tuberculosis* und entkoppelt die ATPase somit von der Proteolyse durch ClpP (Schmitt et al., 2011). Ecumicin, ein zyklisches Tridecapeptid aus einem *Nomonurea*-Stamm und Lassomycin, ein 16 Aminosäuren langes Peptid aus einer unkultivierbaren Spezies, entkoppeln beide ebenfalls durch Bindung an ClpC1 von *M. tuberculosis* die Interaktion mit ClpP, während die ATPase-Aktivität aber stark erhöht wird (Gao et al., 2015; Gavrish et al., 2014). Obwohl der Wirkmechanismus keiner dieser Substanzen bisher vollständig aufgeklärt ist, macht die niedrige Spontanresistenzrate und ihre Targetspezifität Hoffnung auf neue Wirkstoffe im Kampf gegen multiresistente *M. tuberculosis*-Stämme.

1.6 ClpP in Streptomycceten

Im Vergleich zur Clp-Protease in den typischen Gram-positiven und Gram-negativen Modellorganismen sind ClpP sowie seine zur Proteolyse notwendigen Partner in Streptomycceten wenig erforscht. Bereits erfolgte Studien weisen jedoch darauf hin, dass die Clp-Maschinerie hier wesentlich komplexer ist und dass mehrere ClpP-Homologen vorkommen, die sehr streng reguliert sind (**Abbildung 11**). Die ehemalige Arbeitsgruppe um Philippe Mazodier vom Institut Pasteur in Paris veröffentlichte zwischen 1999 und 2013 sieben Publikationen über ihre Arbeit

an ClpP in *Streptomyces lividans* und *Streptomyces coelicolor*, welche wichtige Informationen für diese Dissertation lieferten.

Die meisten bis heute sequenzierten Streptomyceten-Genome weisen fünf *clpP*-Gene auf. Für *S. coelicolor* und *S. lividans* wurde gezeigt, dass fünf *clpPs* in zwei bicistronischen (*clpP1clpP2* und *clpP3clpP4*) sowie einem monocistronischen Operon (*clpP5*) vorliegen (De Crécy-Lagard et al., 1999; Viala et al., 2000). Diese Anordnung von gekoppelt transkribierten *clpP*-Genen findet sich grundsätzlich in allen bisher veröffentlichten Streptomyceten-Genomen. Allerdings gibt es unter den bisher sequenzierten *Streptomyces*-Stämmen einige Ausnahmen (z. B. *S. griseus*, *S. pristinaespiralis*, *S. clavuligerus* und *S. roseosporus* (Gominet et al., 2011)), die kein zweites bicistronisches Operon aufweisen, so dass mit *clpP1clpP2* und *clpP5* lediglich drei *clpP*-Homologe vorliegen. Gominet et al. vermuten für diese Stämme den Verlust des *clpP3clpP4*-Operons eines gemeinsamen Vorfahrens, so dass es zu einer Co-Evolution von Streptomyceten mit drei bzw. fünf *clpP*-Homologen kommen konnte. Im Gegensatz zu *clpP* in den meisten anderen Gram-positiven Bakterien scheint in Streptomyceten zumindest ein *clpP*-Paar, entweder *clpP1clpP2* oder *clpP3clpP4*, essentiell zu sein (Viala et al., 2000). Beide Operons scheinen paralog (verwandt durch Genduplikation im selben Organismus) zu einander zu sein, da mit 50,2% zwischen ClpP1 und ClpP3 und 53,7% zwischen ClpP2 und ClpP4 die höchsten Ähnlichkeiten der ClpPs in *S. coelicolor* vorliegen. In ClpP1, ClpP2 und ClpP3 in *S. lividans* und *S. coelicolor* liegt die katalytische Triade streng konserviert vor, während in ClpP4 das His durch ein Glycin (Gly) ersetzt ist. Der katalytischen Triade fehlt somit die Base zur Erhöhung der Nukleophilie des Ser, wodurch ClpP4 vermutlich nicht proteolytisch aktiv ist (Viala et al., 2000).

Auf *clpP5* wird im Folgenden wenig eingegangen. Es wurde gezeigt, dass es in allen bereits sequenzierten Streptomyceten vorkommt, konstitutiv exprimiert wird und weder durch Hitzeschock induziert noch durch einen der Regulatoren der anderen *clpP*-Gene reguliert wird (Gominet et al., 2011). Zwischen Ser und His der katalytischen Triade ist der Abstand um eine Aminosäure verkürzt, allerdings ist nicht bekannt, ob dies die Funktion der Protease beeinflusst. Des Weiteren kann *clpP5* die Funktion von *clpP1clpP2* bzw. *clpP3clpP4* nicht ersetzen, da ein Doppel-Knockout der beiden Operons trotz intakten *clpP5s* nicht erzeugbar war, während sich ein *clpP5*-Single-Knockout problemlos erzeugen ließ (Gominet et al., 2011).

Im Genom von *S. coelicolor* wurden Gene für vier Clp-ATPasen identifiziert, *clpX* sowie drei *clpC* Homologe. Damit ist *Streptomyces* die erste Gattung, in der multiple *clpC*-Homologe nachgewiesen werden konnten (Bellier and Mazodier, 2004). Es wird vermutet, dass von diesen zumindest *clpC1* essentiell ist (Bellier and Mazodier, 2004). *ClpX* folgt direkt auf *clpP1clpP2* auf dem Chromosom, ist allerdings nicht in das Operon mit eingebunden und ist nicht essentiell (De Crécy-Lagard et al., 1999; Viala and Mazodier, 2002). Welche ClpPs mit welchen Clp-ATPasen interagieren ist bisher nicht bekannt. Es ist zu vermuten, dass durch Interaktion mit verschiedenen ATPasen, wie in anderen Organismen, unterschiedliche Substrate abgebaut werden können. In **Abbildung 11** ist die bisher bekannte, sehr komplexe *clpP*-Genregulation in *S. lividans* und *S. coelicolor* dargestellt.

In einem *S. lividans* Wildtyp-Stamm sind ClpP1 und ClpP2 dafür verantwortlich, die notwendigen proteolytischen Funktionen zu übernehmen, während ClpP3 und ClpP4 nicht exprimiert werden (Viala and Mazodier, 2002). Die Expression von *clpP1clpP2* wird dabei von mindestens drei verschiedenen Regulatoren kontrolliert.

Der *clp* and *lon* gene regulator (ClgR) wurde als Aktivator der *clpP1clpP2* Expression, sowie von *clpC1*, *lon* (codiert für die ATP-abhängige Protease Lon) und sich selbst identifiziert (Bellier and Mazodier, 2004). Interessanterweise wird ClgR von ClpP1ClpP2 abgebaut, so dass eine negative Feedback-Schleife vorliegt (Bellier et al., 2006). Für den Abbau durch ClpP1ClpP2 ist das Vorhandensein von zwei Alanin-Resten am C-Terminus von ClgR essentiell. Auch die Protease Lon weist zwei Alanin-Reste auf und konnte als Substrat von ClpP1ClpP2 identifiziert werden. Allerdings scheint dies nicht die einzige Erkennungssequenz für den Abbau durch ClpP1ClpP2 zu sein, da diese auch ClpC1 abbauen, welches keine C-terminalen Alanin-Reste aufweist (Bellier et al., 2006).

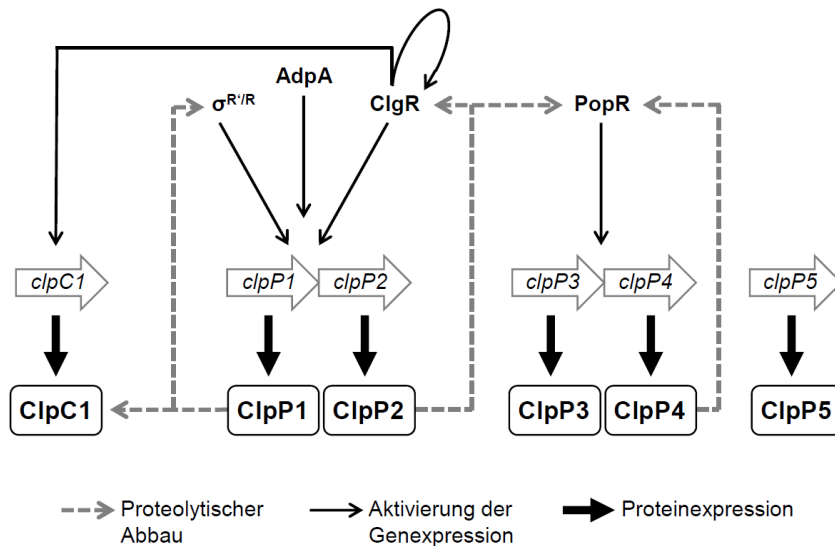


Abbildung 11: Regulation der *clpP*-Genexpression in *S. lividans* und *S. coelicolor* und die daraus resultierende Gen- und Proteinexpression. Diese hier zusammengetragenen Zusammenhänge gehen auf vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe von Philippe Mazodier zurück.

Ein weiterer Aktivator der ClpP1ClpP2-Expression ist AdpA, ein pleiotroper Regulator der AraC/XylS Familie. Es wurde gezeigt, dass AdpA in Streptomycceten-Stämmen mit einem *clpP3clpP4*-Operon gleichzeitig und unabhängig von ClgR die Expression von ClpP1ClpP2 aktivieren kann, allerdings nicht in Stämmen, die kein *clpP3clpP4*-Operon besitzen (Guyet et al., 2013).

ClpP1ClpP2 sind des Weiteren in die Zellantwort bei thiol-oxidativem Stress eingebunden. σ^R (sigmaR) ist der wichtigste Regulator bei Veränderung der reduktiven Bedingungen hinzu oxidativem Disulphit-Stress im Cytoplasma von Streptomycceten (Paget et al., 1998). In diesem Fall wird die Expression von zwei verschiedenen Isoformen (σ^R und $\sigma^{R'}$) sowie ihre Freisetzung vom zugehörigen Anti-sigma-Faktor RsrA aktiviert, wodurch wiederum die Expression von ClpP1ClpP2 sowie weiteren Proteasen und Thiol-reduzierenden Systemen induziert wird. In einer negativen Feedback-Schleife baut ClpP1ClpP2 die instabile Isoform $\sigma^{R'}$ wieder ab (Kim et al., 2009).

Wie bereits erwähnt, ist in einem *S. lividans* Wildtyp-Stamm kein ClpP3ClpP4 nachweisbar. Wird allerdings die Expression von ClpP1ClpP2 durch einen Knockout verhindert, wird die Expression von ClpP3ClpP4 als Paralog induziert und sichert dem Stamm das Überleben (Viala et al., 2000). Allerdings scheinen ClpP3ClpP4 nicht alle natürlichen Funktionen von ClpP1ClpP2 übernehmen zu können, da $\Delta clpP1clpP2$ -Stämme in ihrer Entwicklung eingeschränkt sind und z. B. auf

bestimmten Medien im Vergleich zum Wildtyp kein Luftmycel ausbilden können (De Crécy-Lagard et al., 1999).

Induziert wird die Expression von ClpP3ClpP4 vom *clpP3* operon regulator (PopR), einem DNA-Bindeprotein, dessen Gen downstream von *clpP4* in entgegengesetzter Orientierung codiert (Viala et al., 2000). Im Wildtyp wird, wie in der $\Delta clpP1clpP2$ -Mutante, zwar ein *popR*-Transkript gebildet und dieses auch translatiert, doch wird PopR hier von ClpP1ClpP2 abgebaut. Möglich machen dies, wie auch bei ClgR, zwei C-terminale Alanin-Reste. Eine Autoregulation von PopR wie bei ClgR konnte aber nicht nachgewiesen werden und ebenso keine Regulation anderer Gene als *clpP3clpP4*. ClpP3ClpP4 sind auch in der Lage PopR zu einem gewissen Grad abzubauen, so dass ClpP3ClpP4 ihre eigene Synthese in einem negativen Feedback-Loop kontrollieren (Viala and Mazodier, 2002).

Es wurde bisher nicht beschrieben, wie die ClpPs und Clp-ATPasen in Streptomycceten miteinander interagieren, um ihre proteolytischen Aufgaben in der Zelle zu leisten. Wie in Kapitel 1.4 beschrieben, sind heteromere ClpP-Komplexe in Mykobakterien bekannt und eine ähnliche Situation ist auch für Streptomycceten denkbar. Viala und Mazodier konnten zeigen, dass ClpP1 und ClpP2 in *S. lividans* prozessiert werden und sie vermuteten eine gegenseitige Prozessierung mit möglichem Einfluss auf die Aktivität der Proteine. Ebenso erfolgte der Abbau eines natürlichen Substrats in *in vivo*-Experimenten nur in Anwesenheit beider ClpP-Homologe (Viala and Mazodier, 2002). Somit liegt die Bildung von heteromeren ClpP-Komplexen auch in Streptomycceten nahe.

1.7 ADEP-Resistenz in Streptomycceten

Aufgrund der komplexen ClpP-Maschinerie stellt sich die Frage, welchen Einfluss ADEP auf Streptomycceten und die verschiedenen ClpP-Homologe hat. *S. hawaiiensis* ist als ADEP-Produzent intrinsisch resistent gegen sein eigenes Produkt, aber es ist bisher nicht bekannt, wie sich dieser Stamm gegen ADEP schützt. Dies sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

Gominet *et al.* untersuchten in Co-Kultivierungsexperimenten den Einfluss der von *S. hawaiiensis* sekretierten Produkte gegen *S. lividans* und konnten eine Sensitivität von ClpP1ClpP2 im Wildtyp sowie eine Resistenz von ClpP3ClpP4 in einem $\Delta clpP1clpP2$ -Stamm zeigen. Resistenz gegen den ADEP-Naturstoffkomplex wurde aber nicht allein durch die Anwesenheit von intrinsisch ADEP-resistentem ClpP3ClpP4 generiert, da die Überexpression von ClpP3ClpP4 im Wildtyp-Hintergrund nicht zu einer Resistenz führte (Gominet et al., 2011).

Bei der Untersuchung von spontan durch ADEP-Selektion resistent gewordenen *S. lividans*-Mutanten wurden Mutationen detektiert, die zur Expression von nicht funktionalem ClpP1 führten. Neben Frame-Shift-Mutanten mit Downstream-Effekt auf ClpP2 wurden auch Mutanten gefunden, für die die Expression von intaktem ClpP2 weiterhin möglich war, woraus sich die Hypothese ableiten lässt, dass ClpP2 vermutlich nicht ADEP-sensitiv ist und ADEP seine toxische Wirkung in *S. lividans* lediglich an ClpP1 entfaltet.

Bei ihrer Arbeit mit *S. lividans* SclAB Efflux-Pumpen-Mutanten wurde auch diese Pumpe als möglicher Resistenz-Faktor identifiziert. Eine Mutante, in der der ABC-Transporter durch Knockout des zugehörigen Repressors konstitutiv expremiert wurde, war resistent gegen den A54556-Extrakt bei der Co-Kultivierung mit *S. hawaiiensis*. Unter auf ADEP selektierten, spontan resistenten Mutanten mit $\Delta sclAB$ -Hintergrund wurden außerdem Stämme mit intaktem ClpP1

gefunden, so dass es noch weitere Mechanismen geben muss, die in *S. lividans* eine Resistenz gegen ADEP vermitteln können (Gominet et al., 2011).

1.8 Zielsetzung dieser Arbeit

Wie bereits ausführlich erläutert, stellen ADEPs eine interessante neue Antibiotikaklasse dar, die schon vielseitig beleuchtet wurde, ob strukturell in Derivatisierungsprogrammen, bezüglich ihres Wirkmechanismus in verschiedenen Bakterien oder als Werkzeug zur Erforschung von ClpP.

Dennoch wurde seit der ersten Charakterisierung von *S. hawaiiensis* und der Isolierung von ADEP1 (damals noch *factor A*) (Michel and Kastner, 1985) keine weitere Untersuchung des Produzentenstammes veröffentlicht. Bisher ist unbekannt, wie ADEP1 biosynthetisch von *S. hawaiiensis* produziert wird und durch welchen Resistenzmechanismus sich der Stamm gegen sein Produkt schützt.

Neben der Etablierung eines Aufreinigungsprotokolls für ADEP1 aus dem Kulturüberstand von *S. hawaiiensis* sollte in dieser Arbeit das ADEP-Biosynthesegencluster (BGC) identifiziert und analysiert werden. Bei der Annotierung der putativen Biosynthesegene wurde ein *clpP*-Gen (*clpP_{ADEP}*) in der Nähe des Genclusters gefunden, das durch heterologe Expression in *S. lividans* TK24 als ADEP-Resistenz vermittelndes Gen identifiziert werden konnte. *S. hawaiiensis* war in unseren Händen nicht genetisch modifizierbar, so dass geplante Arbeiten zur Funktionalität der Clp-Maschinerie stattdessen in *S. lividans* als Modellorganismus durchgeführt wurden. Durch heterologe Expression von *clpP_{ADEP}* in *S. lividans* TK24 sowie verschiedenen *clpP*-Knockout-Mutanten sollte aufgeklärt werden, wie das zusätzliche ClpP-Protein mit dem natürlichen ClpP-Regulon interagiert und so eine Resistenz gegen ADEPs ermöglicht.

2 Materialien

2.1 Geräte

Auf die Kennzeichnung von Marken als eingetragene Waren-oder Dienstleistungsmarke (®, ™) wurde im Folgenden verzichtet.

Analysewaage <i>XA105DU, Dual Range</i>	Mettler Toledo
Chemilumineszenz-Detektionsgerät <i>Molecular Imager ChemiDoc XRS System</i>	Bio-Rad Laboratories
Gefriertrocknung <i>LYOVAC GT2/RC6</i>	Steris GmbH
Geldokumentationssystem <i>GelDoc XR+ System</i>	Bio-Rad Laboratories
Geldokumentationssystem <i>Quantum ST5</i>	Vilber Lourmat GmbH
Gelelektrophorese-Apparatur <i>PerfectBlue Gel System</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH
Homogenisator zum Zellaufschluss <i>Precellys Evolution</i>	Bertin Technologies
HPLC <i>1100 Series</i>	Agilent Technologies
Inkubationsschrank <i>IN110/IN160</i>	Memmert
LCMS <i>1100 Series</i>	Agilent Technologies
Magnetrührer <i>C Mag HS7</i>	IKA
Metallblockthermostat <i>Epptherm Liebisch 52526101</i>	Liebisch Labortechnik
Metallblockthermostat <i>TB2 Thermoblock</i>	AnalytikJena
Mikrotiterplatten-Lesegerät <i>infinite M200Pro</i>	Tecan Group LTD
Mikrowelle	Siemens
Mikrozentrifuge <i>MiniStar silverline</i>	VWR International GmbH
Orbitalschüttler <i>Polymax 1040</i>	Heidolph Labortechnik
Phasenkontrast-Mikroskop <i>Axio Scope.A1</i>	Zeiss
pH-Messgerät <i>SevenMulti</i>	Mettler Toledo
Photometer <i>Biochrom WPA CO8000</i>	Biochrom GmbH
Real-Time-PCR-System <i>AriaMX</i>	Agilent Technologies
Reinstwassersystem <i>Milli-Q Advantage A10</i>	Merck Millipore
Rotations-Schüttelinkubator <i>Ecotron</i>	Infors HT GmbH
Rotations-Schüttelinkubator kühlbar <i>New Brunswick Innova 44</i>	Eppendorf
SDS-PAGE-Gelkammer <i>Mini Gel Tank</i>	life Technologies
SDS-PAGE-Gelkammer <i>Mini-PROTEAN Tetra Cell</i>	Bio-Rad Laboratories
Sicherheitswerkbank <i>Safe 2020</i>	Thermo Scientific
Spannungsgeber <i>peqPower E300</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH
Spannungsgeber <i>PowerPac Universal</i>	Bio-Rad Laboratories
Thermocycler <i>PeqSTAR 2x Gradient</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH
Tischzentrifuge, gekühlt <i>Eppendorf Centrifuge 5418R</i>	Eppendorf
Tischzentrifuge, ungekühlt <i>Eppendorf Centrifuge 5418</i>	Eppendorf
UV-Vis-Spektrophotometer <i>NanoDrop 2000c</i>	Thermo Scientific
Vakuum-Konzentrator <i>Uni Vapo 100H</i>	UniEquip GmbH
Vortex-Mischer <i>REAX 2000</i>	Heidolph
Waage <i>Laboratory LC 4200S</i>	Satorius
Wasserbad <i>Memmert WNB 14</i>	Memmert Vertriebs-GmbH
Western Blot Apparatur <i>PerfectBlue Semi-Dry Blotter, Sedec</i>	Peqlab
Zelldichte-Messgerät <i>CO 8000 cell density meter</i>	WPA biowave
Zentrifuge <i>Heraeus Multifuge X1R/X3R</i>	Thermo Scientific

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte.

2.2 Chemikalien, Antibiotika, Enzyme, Kits, Antikörper

2.2.1 Chemikalien

(2S,4R)-4-Methylprolin	Key Organics
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma-Aldrich

Agar-Agar	Carl Roth GmbH
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH
Amberlite XAD 2	Supelco
Ameisensäure, p.a.	Carl Roth GmbH
Amersham ECL Prime western blotting detection reagent	GE Healthcare
Amersham Hybond-ECL Nitrocellulose Blotting Membrane 0.45 µm	GE Healthcare
Amersham Protan Premium 0.45 µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat ((NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄)	Merck KgaA
Bradford Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories
Bovines Serum-Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Calciumcarbonat (CaCO ₃)	Merck KgaA
Calciumchlorid-Monohydrat (CaCl ₂ x H ₂ O)	Merck KgaA
Casaminoacids	BD Bacto
D(+)-Glucose-Monohydrat	Sigma-Aldrich
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat (K ₂ HPO ₄ x 3 H ₂ O)	Carl Roth GmbH
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dinatrium-Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Dihydrat	Merck KgaA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Carl Roth GmbH
D-Mannitol	AppliChem
Desoxy-Nukleotridtriphosphat (dNTP) Set 100 mM Solutions	Thermo Scientific
Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat (FeCl ₃ x 6 H ₂ O)	Merck KgaA
Essigsäure, 100% (Eisessig)	Sigma-Aldrich
Ethanol, p.a.	Sigma-Aldrich
Ethanol, vergällt	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid-Lösung, 1%ige Lösung in Wasser	Carl Roth GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
HisPur Ni-NTA Resin	Thermo Scientific
Hydroxylaminhydrochlorid, reinst.	ZCL Universität Tübingen
Imidazol	AppliChem
InstantBlue Protein Stain	Expedeon
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG), Dioxan-frei	Thermo Scientific
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KgaA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KgaA
Kaliumsulfat (K ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH
Kupferchlorid-Dihydrat (CuCl ₂ x 6 H ₂ O)	Merck KgaA
Lab Lemco Powder	Oxoid
L-Alanin	Sigma-Aldrich
L-Glycin	Sigma-Aldrich
L-Phenylalanin	Carl Roth GmbH
L-Pipecolinsäure	Sigma-Aldrich
L-Prolin	Sigma-Aldrich
L-Serin	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	Carl Roth GmbH
Magnesiumsulfat (Mg ₂ SO ₄)	Carl Roth GmbH
Maleinsäure	Merck KgaA
Malzextrakt	AppliChem
Mangan(II)-chlorid-Tetrahydrat (MnCl ₂ x 4 H ₂ O)	Merck KgaA
Methanol, HPLC-Qualität	VWR
Methanol, p.a.	Sigma-Aldrich
Milli-Q, Reinstwasser (aus Milli-Q-Reference System)	Merck KgaA
Müller Hinton Broth	Difco
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH

Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich
Natriumtetraborat-Decahydrat (Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O)	ZCL Universität Tübingen
Pepton, tryptisch verdaut	Thermo Scientific
RNAprotect Bacteria Reagent	Qiagen
RNase AWAY	Molecular Bioproducts
Salzsäure (HCl)	ZCL Universität Tübingen
SDS Pellets (Natriumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH
Silica Gel Orange	Carl Roth GmbH
Sojamehl, fettarm	W. Schoenberger GmbH
Soytone	BD Bacto
Sucrose	Carl Roth GmbH
Trichloressigsäure	Merck KgaA
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethan-HCl (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich
Tryptic Soy Broth (TSB)	Sigma-Aldrich
Trypton	Sigma-Aldrich
Tween 20	Carl Roth GmbH
Wasser, für Injektionszwecke	B. Braun
Wasser, HPLC-Qualität	Sigma-Aldrich
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Merck KgaA

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.

2.2.2 Antibiotika

Antibiotikum	Stock-Konzentration; Lösungsmittel	Hersteller
Ampicillin-Natrium	100 mg/ml; H ₂ O	Carl Roth GmbH
Apramycinsulfat	50 mg/ml; H ₂ O	AppliChem
Chloramphenicol	25 mg/ml; Ethanol	Sigma-Aldrich
Hygromycin B	100 mg/ml; H ₂ O	AppliChem
Kanamycinsulfat	50 mg/ml; H ₂ O	Carl Roth GmbH
Nalidixinsäure	25 mg/ml; 0,5 M NaOH	Carl Roth GmbH
Spectinomycin-Dihydrochlorid-pentahydrat	50 mg/ml; H ₂ O	Sigma-Aldrich
Streptomycinsulfat	50 mg/ml; H ₂ O	AppliChem
Thiostrepton	50 mg/ml; DMSO	AppliChem
Trimethoprim	25 mg/ml; DMSO	Sigma-Aldrich

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.

2.2.3 Enzyme, Kits und Antikörper

Restriktionsendonuklease	Hersteller
<i>Bam</i> HI-HF	NEB
<i>Hind</i> III-HF	NEB
<i>Kpn</i> I-HF	NEB
<i>Nco</i> I-HF	NEB
<i>Nde</i> I	NEB
<i>Not</i> I-HF	NEB
<i>Pac</i> I	NEB
<i>Xba</i> I	NEB
<i>Xho</i> I	NEB

Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.

Polymerasen	Hersteller
Dream Taq DNA Polymerase	Thermo Scientific
Phusion High-Fidelity DNA Polymerase	Thermo Scientific
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	NEB

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Polymerasen.

Enzym	Hersteller
Antarctic Phosphatase	NEB
cComplete Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DNase I RNase-frei	Thermo Scientific
Lysozym aus Hühnerei	Thermo Scientific
NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix	NEB
Proteinase K	Analytik Jena
RNase A	Thermo Scientific
RQ1 RNase-freie DNase	Promega
T4 DNA Ligase	NEB/Thermo Scientific

Tabelle 7: Weitere in dieser Arbeit verwendete Enzyme.

Kits	Hersteller
AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies
Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific
innuPREP Bacteria DNA Kit	Analytik Jena
innuPREP DNase I Digest Kit	Analytik Jena
innuPREP DOUBLEpure Kit	Analytik Jena
innuSPEED Bacteria/Fungi RNA Kit	Analytik Jena
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Kits.

Antikörper	Hersteller/Quelle
Rabbit anti- <i>Streptomyces</i> ClpP1 antibody, polyclonal	Philippe Mazodier
Rabbit anti- <i>Streptomyces</i> ClpP3 antibody, polyclonal	Philippe Mazodier
Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody, HRP-conjugate	Pierce
Mouse anti 6xHistidine mAB	IBA
Strep-MAB-classic	IBA
Rabbit anti-Mouse pAp HRP conjugated	IBA

Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.

2.3 Synthetische Oligonukleotide

Im Folgenden wird für synthetische Oligonukleotide als Startpunkte für Polymeraseamplifizierungen ausschließlich der englische Ausdruck „Primer“ verwendet. Die mit Klonierungsprimern amplifizierten Sequenzen und erzeugten Konstrukte sind in Kapitel 6.2 aufgeführt.

Primer	Sequenz (5'-3')	Experiment
MbtH_for-Nco	catgccatggtgactatcgtgtccaatccc	Expression zweier A-Domänen
MbtH_rev-Hind	cccaagcttctactgagttgccgtctggc	Expression zweier A-Domänen
A-domain_for-His	ggaattccatgatcatcatcatcatcatcatgatccggg tgtgcgggtcg	Expression zweier A-Domänen
A-Domain_rev1-Xho	ccgctcggtaaatcgaccctggaaactcccagg	Expression zweier A-Domänen (A3)
A-Domain_rev2-Xho	ccgctcagtagcaatcgaccgggacatcccaag	Expression zweier A-Domänen (A6)
links-Hind-for	ggaagcttatgattccgttgctgttcgctcagc	Knockout von <i>adeH</i> mit Thiostrepton-Marker (pA18)
links-Xba-rev	ggtctagaccagcaaccgcccagccgattcgc	Knockout von <i>adeH</i> mit Thiostrepton-Marker (pA18)
rechts-Kpn-for	aaggtaccagaacaagagcagacaagaaaaac	Knockout von <i>adeH</i> mit Thiostrepton-Marker (pA18)
rechts-Eco-rev	aagaattcaactgctgggagagataaggaagct	Knockout von <i>adeH</i> mit Thiostrepton-Marker (pA18)

links-Xba-for-pGUS	aatctagaatgattccgttgcgttcgctcagc	Knockout von <i>adeH</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
rechts-NdeI-rev-pGUS	aacatatgaactgctgggagagataaggaagct	Knockout von <i>adeH</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
links-BamHI-rev-pGUS	aaggatccccagcaaccgcccagccgattcgc	Knockout von <i>adeH</i> ohne Marker (pGUS-A21)
rechts-BamHI-for-pGUS	aaggatccgaacaagagcagacaagaaaaac	Knockout von <i>adeH</i> ohne Marker (pGUS-A21)
Phyt_links_for_XbaI	aaatctagatttttcgacaccggcgctgc	Knockout von <i>adeA</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
Phyt_links_rev_BamHI	aaaggatccctgatccagcagcgtttttg	Knockout von <i>adeA</i> ohne Marker (pGUS-A21)
Phyt_rechts_for_BamHI	aaaggatcctatctctgtggccgggac	Knockout von <i>adeA</i> ohne Marker (pGUS-A21)
Phyt_rechts_rev_NdeI	aaacatatggcttccccacacctcctagg	Knockout von <i>adeA</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
AlcoDe_links_for_XbaI	aaatctagagctgcaccttggctgaagtatg	Knockout von <i>adeB</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
AlcoDe_links_rev_BamHI	aaaggatccgaatccctcagtagaccgcc	Knockout von <i>adeB</i> ohne Marker (pGUS-A21)
AlcoDe_rechts_for_BamHI	aaaggatccgtcatcaaggccgtccttca	Knockout von <i>adeB</i> ohne Marker (pGUS-A21)
AlcoDe_rechts_rev_NdeI	aaacatatgtagttccccgagcgcaggc	Knockout von <i>adeB</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
MtbH_links_for_XbaI	aaatctagagcatacgcgtcgaactaggc	Knockout von <i>adel</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
MtbH_links_rev_BamHI	aaaggatccgtcctcaagggttggaca	Knockout von <i>adel</i> ohne Marker (pGUS-A21)
MtbH_rechts_for_BamHI	aaaggatccgtcacgcaggccacgacgg	Knockout von <i>adel</i> ohne Marker (pGUS-A21)
MtbH_rechts_rev_NdeI	aaacatatgaacgctaccccgatgccc	Knockout von <i>adel</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
PutProt_links_for_XbaI	aaatctagagcctcatcaaccgcatccagg	Knockout von <i>orfA</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
PutProt_links_rev_BamHI	aaaggatccaagccctcgtggctgacgt	Knockout von <i>orfA</i> ohne Marker (pGUS-A21)
PutProt_rechts_for_BamHI	aaaggatccatcgggcgctcgtgcttc	Knockout von <i>orfA</i> ohne Marker (pGUS-A21)
PutProt_rechts_rev_NdeI	aaacatatggccgtgctcgttgcgagg	Knockout von <i>orfA</i> ohne Marker (pGUS-A21, pGM-GUS-Xba)
SM-Xba-2-for	cccgcgccagtcgagctctagacggcgtttcacctggc	Ortsspezifische Mutagenese von pGUS-GM
SM-Xba-2-rev	gccaggtgaaaagcggctctagagctcgactgggcgcggg	Ortsspezifische Mutagenese von pGUS-GM
PROL_for_Gibs	gtcagagaaggagcggacatatgcagtggtggtggtggtggtgctgcatctcggcaggagaaaag	Knockdown von <i>adeA</i> mittels siRNA
PROL_rev_Gibs	ctcaggcatgcaagcttcatatgcagtggtggtggtggtgctgctgagtcagttatttcgattttcc	Knockdown von <i>adeA</i> mittels siRNA
NRPSneu Fwd	gtcaggaaggagcggacatatgcagtggtggtggtggtggtgctgcatgccacacttcgctgagc	Knockdown von <i>adeH</i> mittels siRNA

NRPSneu Rev	ctgcaggcatgcaagcttcatatgcagtggtggtggtg gtggtgcctgcagaccatctgaatgcgctgtc	Knockdown von <i>adeH</i> mittels siRNA
pIJtsr_Spe_for	ggactagtcggggatcgaccgcgcggtc	Einführen einer Thiostrepton- Kassette in pIJ10257
pIJtsr_Spe_rev	ggactagttatcggttgccgcgagattc	Einführen einer Thiostrepton- Kassette in pIJ10257
siNRPS_fdterm Fwd	gaggttgaaaaacgctcactgtcattactggaccgat c	Einführen von <i>PtipA</i> -siRNA in pIJtsr
siNRPS_fdterm Rev	gactctagttaattaatcactcgagagctgataaacg atacaattaaag	Einführen von <i>PtipA</i> -siRNA in pIJtsr
ClpPADEP_for	cggaatggctatctacgac	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpPADEP_rev	cgcttttgacacgaatgag	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP1_Sh_for	aagacgagcaggtggatacg	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i> / <i>S. lividans</i>
ClpP1_Sh_rev	gggctgttgatgtacaggt	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP2neu-for	gaccgtgacatctcggtgta	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP2neu-rev	ctgtacggctggtggatca	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i> / <i>S. lividans</i>
ClpP3_Sh_for	tcgcatctacgacacgat	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP3_Sh_rev	atggtccgcttggtgaact	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP4_Sh_for	gtacacgattccgaactca	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP4_Sh_rev	ccatgagcgaagtgaaggag	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP5_Sh_for	gatggatccgtactcgaagc	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
ClpP5_Sh_rev	taccgcatcgtgtcgtagag	qPCR, <i>S. hawaiiensis</i>
clpP1qPCRliv-rev	cgggctgttgatgtacagga	qPCR, <i>S. lividans</i>
clpP2qPCRliv-for	gaccgggacatctcggtcta	qPCR, <i>S. lividans</i>
clpP3for2	gccatctacgacacatgc	qPCR, <i>S. lividans</i>
livqPCRclpP3-rev2	gcttggtgaaatccaggttg	qPCR, <i>S. lividans</i>
livqPCRclpP4-for2	ggagctacacgattccgaac	qPCR, <i>S. lividans</i>
clpP4qPCRliv-rev	ccatcagcgcagtgaaacgag	qPCR, <i>S. lividans</i>
clpP5qPCRliv-for	gtcggaccctactccaa	qPCR, <i>S. lividans</i>
livqPCRclpP5-rev2	gtagcgcacgtgtcgtaga	qPCR, <i>S. lividans</i>
links-flank_fwd	ctgcagacgcgtgcagctcatatgacatcacggagctgaag	<i>clpP1</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
links-flank_rev	cgatcgtctgcacgtatccacctgctcg	<i>clpP1</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
rechts-flank_fwd	tggatacgtgcagacgatcgagcagatc	<i>clpP1</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
rechts-flank_rev	ccacggcgaatcggatccatagccagcaggaggatggtg g	<i>clpP1</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP2flank-links Fwd	tggctccaattgtacatcgatccatagcctcgagaagtac ctcgag	<i>clpP2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP2flank-links Rev	tggtgatgatctggtcgttcacgcggtcgtacag	<i>clpP2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP2flank-rechts Fwd	cgaccgcgtgaacgaccagatcatcaccaccc	<i>clpP2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP2flank-rechts Rev	agcttctgcagacgcgtgcagctcatatggaatccccgggg atcagc	<i>clpP2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP3flank-links Fwd	tggctccaattgtacatcgatccatagcgcgtcgcagtcg ccgac	<i>clpP3</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP3flank-links Rev	cgacctggtccacctcctcgccctgggcgt	<i>clpP3</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP3flank-rechts Fwd	cagggccgaggaggtggaccaggtcgtgcag	<i>clpP3</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
ClpP3flank-rechts Rev	agcttctgcagacgcgtgcagctcatatggaagaactggcg ggacaac	<i>clpP3</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta1.2_left_for	tggctccaattgtacatcgatccatagggacatcacggag ctgaag	<i>clpP1P2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta1.2_left_rev	tggtgatgatctggtccacgtatccacctgctcg	<i>clpP1P2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta1.2_right_for	aggtggatacgtggaccagatcatcaccaccc	<i>clpP1P2</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta3.4_left_rev	cgagcacctcgtcctcctcgccctgggcgt	<i>clpP3P4</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta3.4_right_for	cagggccgaggaggacgaggtgctcgcgcgg	<i>clpP3P4</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
delta3.4_right_rev	agcttctgcagacgcgtgcagctcatatgcgcctgggtggc ctctc	<i>clpP3P4</i> Knockout, <i>S. lividans</i>
Nde_livClpP1_long_for	ggaattccatagagacggcccggcgccgtcg	<i>clpP1lang</i> in pIJ12551
Nde_livClpP1_short_for	ggaattccatagacgaatctgatccctcag	<i>clpP1kurz</i> in pIJ12551

Not_livClpP1_rev	atagtttagcgccgctcaggcgcccggtgccgccc	<i>clpP1</i> in pIJ12551
Nde_livClpP2_long_for	ggaattccatagaacgacttccccggcagcg	<i>clpP2lang</i> in pIJ12551/pIJ10257
Nde_livClpP2_short_for	ggaattccatagcgcgcccctccaggggcc	<i>clpP2kurz</i> in pIJ12551/pIJ10257
Not_livClpP2_rev	atagtttagcgccgctcaggcgagaggagttgtc	<i>clpP2</i> in pIJ12551, <i>clpP1clpP2</i> in pIJ12551
liv-clpP2_rev_Hind	cccaagcttctagcggagagaggattgtc	<i>clpP2</i> in pIJ10257
liv-clpP2-His_rev_Hind	cccaagcttctaatgatgatgatgatggcggagagaggattgtc	<i>clpP2-His</i> in pIJ10257
Nde_clpPA_for	ggaattccatagaaggacattaaggaactgac	<i>clpPADEP</i> in pIJ12551 und pIJ10257
Not_clpPA_rev	atagtttagcgccgcttctcgtgccccgatattg	<i>clpPADEP</i> in pIJ12551 und pIJ10257
Nde_clpPA-short_for	ggaattccatagcatgcctcatggagcagcg	<i>clpPADEPkurz</i> in pIJ12551
Not_clpPA-His_rev	atagtttagcgccgcttctaatgatgatgatgatgac	<i>clpPADEP-His</i> in pIJ12551
Nde_His-clpPA_for	ggaattccatagcatcatcatcatcataag	<i>His-clpPADEP</i> in pIJ12551 und pIJ10257
pGM-HindIII	ttaagcttctacttcgctgccccgatatt	<i>clpPADEP</i> in pIJ10257
clpPADEP-His_rev_Hind	cccaagcttctaatgatgatgatgatgac	<i>clpPADEP-His</i> in pIJ10257
pSET-HindIII	ttaagcttgtaaggagttacagtgaagg	<i>clpPADEP</i> in pSET152ermE* Δ HindIII
pSET-BamHI	aaaggatccctacttcgctgccccgatattg	<i>clpPADEP</i> in pSET152ermE* Δ HindIII

Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Primer.

2.4 Plasmide

Plasmid	Funktion	Herkunft
pET-Duet	Co-Expression zweier Gene in <i>E. coli</i> , T7 Promotor, Lac Operator	Novagen
pET-Duet_Adel	Induzierbare Expression von Adel aus <i>S. hawaiiensis</i> , Vorkonstrukt für pET-Duet_Adel_HisA3 und HisA6	Diese Arbeit
pET-Duet_Adel_HisA3	Induzierbare Co-Expression von Adel und Adenylierungsdomäne A3 mit N-terminalem 6xHis-Tag aus <i>S. hawaiiensis</i>	Diese Arbeit
pET-Duet_Adel-HisA6	Induzierbare Co-Expression von Adel und Adenylierungsdomäne A6 mit N-terminalem 6xHis-Tag aus <i>S. hawaiiensis</i>	Diese Arbeit
pRM4.3	phiC31-integrativer Shuttle-Vektor für Streptomyceten, Expressionsplasmid mit <i>ermE*</i> -Promotor, pSET125-Abkömmling, <i>egfp</i>	Günther Muth, Tübingen Nicht veröffentlicht
pIJ6902	phiC31-integrativer Shuttle-Vektor für Streptomyceten, Expressionsplasmid mit induzierbarem <i>tipA</i> -Promotor	John Innes Center, Norwich (Huang et al., 2005)
pIJ6902clpPADEP	Induzierbare Expression von ClpPADEP	Diese Arbeit
pIJ6902clpPADEP-His	Induzierbare Expression von ClpPADEP mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pIJ6902PROL	Knockdown von <i>adeA</i>	Diese Arbeit
pIJ6902NRPS	Knockdown von <i>adeG</i>	Diese Arbeit
pSET152ermE* Δ HindIII	phiC31-integrativer Shuttle-Vektor für Streptomyceten, Expressionsplasmid mit <i>ermE*</i> -Promotor; durch Eliminierung einer HindIII-Schnittstelle kann die verbleibende zur Klonierung genutzt werden	Till Schäberle, Gießen (Stegmann et al., 2006)
pSET152clpPADEP	Konstitutive Expression von ClpPADEP	Diese Arbeit
pGusA21	Shuttle-Vektor für Streptomyceten, markerlose Knockouts durch Blau-Weiß-Selektion	Günther Muth, Tübingen Nicht veröffentlicht

	<i>aac(3)IV, oriT, P_{ermE}_gusA, ori_{pMB1}</i>	
pGusA21clpP1Gibson	Knockout von <i>clpP1</i> in <i>S. lividans</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGusA21-Leu_L	Vorkonstrukt für pGusA21-Leu_LR	Diese Arbeit
pGusA21-Leu_LR	Knockout von <i>adeA</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGusA21-AlcoDe_L	Vorkonstrukt für pGusA21-AlcoDe_LR	Diese Arbeit
pGusA21-AlcoDe_LR	Knockout von <i>adeB</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGusA21-NRPS2_L	Vorkonstrukt für pGusA21-NRPS2_LR	Diese Arbeit
pGusA21-NRPS2_LR	Knockout von <i>adeH</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGusA21-MbtH_L	Vorkonstrukt für pGusA21-MbtH_LR	Diese Arbeit
pGusA21-MbtH_LR	Knockout von <i>adel</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGusA21-PutProt_L	Vorkonstrukt für pGusA21-PutProt_LR	Diese Arbeit
pGusA21-PutProt_LR	Knockout von <i>orfA</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS	Temperatur-sensitiver Shuttle-Vektor für Streptomycceten, markerlose Knockouts durch Blau-Weiß-Selektion	Günther Muth, Tübingen Nicht veröffentlicht
pGM-GUS-Xba	Aus pGM-GUS entstanden, durch ortsspezifische Mutagenese Einführung einer XbaI-Schnittstelle	Diese Arbeit
pGM-GUS-clpP1	Knockout von <i>clpP1</i> in <i>S. lividans</i>	Diese Arbeit
pGM-GUS-clpP2	Knockout von <i>clpP2</i> in <i>S. lividans</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS-clpP3	Knockout von <i>clpP3</i> in <i>S. lividans</i>	Diese Arbeit
pGM-GUS-clpP1clpP2	Knockout von <i>clpP1clpP2</i> in <i>S. lividans</i>	Diese Arbeit
pGM-GUS-clpP3clpP4	Knockout von <i>clpP3clpP4</i> in <i>S. lividans</i>	Diese Arbeit
pGM-GUS-Xba-Leu	Knockout von <i>adeA</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS-Xba-AlcoDe	Knockout von <i>adeB</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS-Xba-NRPS2	Knockout von <i>adeH</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS-Xba-MbtH	Knockout von <i>adel</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pGM-GUS-Xba-PutProt	Knockout von <i>orfA</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pA18	Shuttle-Vektor für Streptomycceten zur Geninaktivierung, basierend auf pK18-mob	(Weber et al., 2008)
pA18-NRPS2_L	Vorkonstrukt für pA18-NRPS2_LRtsr	Diese Arbeit
pA18-NRPS2_LR	Vorkonstrukt für pA18-NRPS2_LRtsr	Diese Arbeit
pA18-NRPS2_LRtsr	Knockout von <i>adeH</i> in <i>S. hawaiiensis</i> (erfolglos)	Diese Arbeit
pIJ12551	phiC31-integrativer Shuttle-Vektor für Streptomycceten, Expressionsplasmid mit <i>ermE*</i> -Promotor	John Innes Center, Norwich (Sherwood et al., 2013)
pIJ12551clpP1kurz	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP1 vom zweiten Startcodon, 203 AS	Diese Arbeit
pIJ12551clpP1lang	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP1 vom ersten Startcodon, 219 AS	Diese Arbeit
pIJ12551clpP2kurz	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom zweiten Startcodon, 217 AS	Diese Arbeit
pIJ12551clpP2lang	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom ersten Startcodon, 235 AS	Diese Arbeit
pIJ12551clpP1clpP2	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP1ClpP2	Diese Arbeit
pIJ12551clpP3	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP3	Diese Arbeit
pIJ12551clpP3clpP4	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP3ClpP4	Diese Arbeit

pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	Konstitutive Expression einer N-terminal um 23 AS verkürzten Form von ClpP _{ADEP}	Diese Arbeit
pIJ12551clpP _{ADEP}	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP}	Diese Arbeit
pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP} mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pIJ12551His-clpP _{ADEP}	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP} mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pIJ10257	ΦBT1-integrativer Shuttle-Vektor für Streptomycceten, Expressionsplasmid mit <i>ermE*</i> -Promotor <i>rep</i> (pMB1) <i>oriT</i> , ΦBT1 <i>attP</i> , <i>int</i> , <i>ermE*</i> p, <i>hyg</i> (Hyg ^R)	John Innes Center, Norwich (Hong et al., 2005)
pIJ10257clpP2kurz	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom zweiten Startcodon, 217 AS	Diese Arbeit
pIJ10257clpP2kurz-His	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom zweiten Startcodon mit C-terminalem 6xHis-Tag	Diese Arbeit
pIJ10257clpP2lang	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom ersten Startcodon, 235 AS	Diese Arbeit
pIJ10257clpP2lang-His	Konstitutive Expression von <i>S. lividans</i> ClpP2 vom ersten Startcodon mit C-terminalem 6xHis-Tag	Diese Arbeit
pIJ10257clpP _{ADEP}	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP}	Diese Arbeit
pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP} mit C-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Konstitutive Expression von ClpP _{ADEP} mit N-terminalem His ₆ -Tag	Diese Arbeit
pIJ12551ShclpP1Hyp	Konstitutive Expression von <i>S. hawaiiensis</i> ClpP1 mit Mutationen der hydrophoben Taschen (Y62V, Y64V, Y84V)	Diese Arbeit
pIJ12551ShclpP1Cat	Konstitutive Expression von <i>S. hawaiiensis</i> ClpP1 mit einer Mutation der katalytischen Triade (S100A)	Diese Arbeit
pIJtsr	Vorkonstrukt, Einführung einer Thiostrepton-Resistenzkassette in pIJ10257	Diese Arbeit
pIJtsr_si-adeA	Knockdown von <i>adeA</i>	Diese Arbeit
pIJtsr_si-adeG	Knockdown von <i>adeG</i>	Diese Arbeit

Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.

2.5 Bakterienstämme

Wildtyp-Stämme, Klonierungsstämme, Expressionsstämme und Teststämme

Stamm	Genotyp	Stammherkunft	Referenzen
<i>Bacillus subtilis</i> 168 trpC2	<i>trpC2</i>	Ulf Gerth, Greifswald	(Anagnostopoulos and Spizizen, 1961)
<i>Bacillus subtilis</i> 168 <i>ΔclpP</i>	<i>trpC2, ΔclpP::spc</i>	Ulf Gerth, Greifswald	(Msadek et al., 1998)
<i>Bacillus subtilis</i> BKE01020	<i>trpC2, ΔrplK::ermE</i>	Bacillus Genetic Stock Center	(Koo et al., 2017)
<i>Escherichia coli</i> XL1- Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac pr B laclqΔM15 Tn10 (Tetr)</i>	Agilent GmbH	
<i>Escherichia coli</i> JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB+ Δ(lac- proAB) e14- [F' traD36 proAB+ laclq lacZΔM15] hsdR17(rK-mK+)</i>	AiCuris GmbH & Co. KG	(Yanisch-Perron et al., 1985)

<i>Escherichia coli</i> DH5α	$\Delta(argF-lac)169$, $\phi80dlacZ58(M15)$, $\Delta phoA8$, $glnX44(AS)$, λ^- , $deoR481$, $rfbC1$, $gyrA96(NalR)$, $recA1$, $endA1$, $thiE1$, $hsdR17$	Thermo Fisher Scientific	
<i>Escherichia coli</i> NiCo21 (DE3)	$can::CBD fhuA2 [lon] ompT$ $gal (\lambda DE3) [dcm] arnA::CBD$ $slyD::CBD glmS6Ala \Delta hsdS \lambda$ $DE3 = \lambda sBamHI \Delta EcoRI-B$ $int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1)$ $i21 \Delta nin5$	New England Biolabs	(Bolanos-Garcia and Davies, 2006; Robichon et al., 2011)
<i>Escherichia coli</i> ET12567 pUB307	$F-dam-13::Tn9 dcm-6 hsdM$ $hsdR zjj-202::Tn10 recF143$ $galk2 galT22 ara-14 lacY1$ $xyl-5 leuB6 thi-1 tonA31$ $rpsL136 hisG4 tsx-78 mtl-1$ $glnV44$; harbours conjugative plasmid $pUB307$; Cm^R , Kan^R	Till Schäberle, Gießen	(Bennett et al., 1977; Flett et al., 1997)
<i>Escherichia coli</i> S17-1	$recA pro hsdR RP4-2-TC::Mu-$ $Km::Tn7$; tmp^R , spc^R , str^R	Günther Muth, Tübingen	(Simon et al., 1983)
<i>Streptomyces</i> <i>hawaiiensis</i> NRRL 15010		Eric Cheng, Wisconsin	(Michel and Kastner, 1985)
<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)		Günther Muth, Tübingen	(Kieser et al., 1992)
<i>Streptomyces lividans</i> TK24	$str-6$; $SLP2^-$, $SLP3^-$	Günther Muth, Tübingen	(Hopwood et al., 1983)
<i>Streptomyces griseus</i> Waksman		Günther Muth, Tübingen	(Waksman et al., 1948)

Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stämme, Klonierungsstämme, Expressionsstämme und Teststämme.

Stämme für Knockout- und Knockdown-Studien in *S. hawaiiensis*

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-Leu_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-Leu_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-Leu_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-Leu_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-AlcoDe_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-AlcoDe_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-AlcoDe_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-AlcoDe_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-NRPS2_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-NRPS2_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-NRPS2_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-NRPS2_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-MbtH_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-MbtH_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-MbtH_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-MbtH_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-PutProt_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-PutProt_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGusA21-PutProt_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGusA21-PutProt_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGusA21-Leu_LR	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGusA21-Leu_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGusA21-AlcoDe_LR	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGusA21-AlcoDe_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGusA21-NRPS2_LR	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGusA21-NRPS2_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGusA21-MbtH_LR	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGusA21-MbtH_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGusA21-PutProt_LR	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGusA21-PutProt_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pA18-NRPS2_L	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pA18-NRPS2_L	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pA18-NRPS2_LR	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pA18-NRPS2_LR	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pA18-NRPS2_LRtsr	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pA18-NRPS2_LRtsr	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pA18-NRPS2_LRtsr	<i>s. E. coli</i> S17-1; pA18-NRPS2_LRtsr	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-Leu	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-Leu	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-AlcoDe	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-AlcoDe	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-NRPS2	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-NRPS2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-MbtH	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-MbtH	Diese Arbeit

<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-PutProt	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-PutProt	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGM-GUS-Xba-Leu	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGM-GUS-Xba-Leu	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGM-GUS-Xba-AlcoDe	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGM-GUS-Xba-AlcoDe	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGM-GUS-Xba-NRPS2	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGM-GUS-Xba-NRPS2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGM-GUS-Xba-MbtH	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGM-GUS-Xba-MbtH	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pGM-GUS-Xba-PutProt	<i>s. E. coli</i> S17-1; pGM-GUS-Xba-PutProt	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ6902PROL	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ6902PROL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pIJ6902PROL	<i>s. E. coli</i> S17-1; pIJ6902PROL	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ6902NRPS	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ6902NRPS	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pIJ6902NRPS	<i>s. E. coli</i> S17-1; pIJ6902NRPS	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJ6902PROL Klone 1-5	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJ6902PROL	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJ6902NRPS Klone 1-5	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJ6902NRPS	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJ6902	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJ6902	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJtsr	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJtsr	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pIJtsr	<i>s. E. coli</i> S17-1; pIJtsr	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJtsr_si-adeA	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJtsr_si-adeA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pIJtsr_si-adeA	<i>s. E. coli</i> S17-1; pIJtsr_si-adeA	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJtsr_si-adeG	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJtsr_si-adeG	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> S17-1 pIJtsr_si-adeG	<i>s. E. coli</i> S17-1; pIJtsr_si-adeG	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJtsr	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJtsr	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJtsr_si-adeA Klone 1.1, 1.2, 6.1, 6.2	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJtsr_si-adeA	Diese Arbeit
<i>S. hawaiiensis</i> pIJtsr_si-adeG Klone 1.1, 1.2, 6.1, 6.2	<i>s. S. hawaiiensis</i> NRRL 15010; pIJtsr_si-adeG	Diese Arbeit

Tabelle 13: In dieser Arbeit erzeugte Stämme für Knockout- und Knockdown-Studien in *S. hawaiiensis*.

***E. coli*-Stämme zur heterologen Expression zweier Adenylierungsdomänen**

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> DH5α pET-Duet_Adel	<i>s. E. coli</i> DH5α; pET-Duet_Adel	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α pET-Duet_Adel_HisA3	<i>s. E. coli</i> DH5α; pET-Duet_Adel_HisA3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> NiCo21 pET-Duet_Adel_HisA3	<i>s. E. coli</i> NiCo21; pET-Duet_Adel_HisA3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> DH5α pET-Duet_Adel_HisA6	<i>s. E. coli</i> DH5α; pET-Duet_Adel_HisA6	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> NiCo21 pET-Duet_Adel_HisA6	<i>s. E. coli</i> NiCo21; pET-Duet_Adel_HisA6	Diese Arbeit

Tabelle 14: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur heterologen Expression zweier Adenylierungsdomänen.

Stämme für Knockouts verschiedener *clpP*-Gene in *S. lividans*

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-clpP1Gibson	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-clpP1Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pGM-GUS-Xba-clpP1Gibson	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pGM-GUS-Xba-clpP1Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-clpP2Gibson	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-clpP2Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pGM-GUS-Xba-clpP2Gibson	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pGM-GUS-Xba-clpP2Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-clpP3Gibson	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-clpP3Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pGM-GUS-Xba-clpP3Gibson	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pGM-GUS-Xba-clpP3Gibson	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-clpP1clpP2	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-clpP1clpP2	Diese Arbeit

<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pGM-GUS-Xba-clpP1clpP2	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pGM-GUS-Xba-clpP1clpP2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pGM-GUS-Xba-clpP3clpP4	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pGM-GUS-Xba-clpP3clpP4	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pGM-GUS-Xba-clpP3clpP4	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pGM-GUS-Xba-clpP3clpP4	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1	<i>str-6</i> ; SLP2, SLP3 Δ clpP1	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP3	<i>str-6</i> ; SLP2, SLP3 Δ clpP3	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2	<i>str-6</i> ; SLP2, SLP3 Δ clpP1clpP2	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP3P4	<i>str-6</i> ; SLP2, SLP3 Δ clpP3clpP4	Diese Arbeit

Tabelle 15: In dieser Arbeit erzeugte Stämme für Knockouts verschiedener *clpP*-Gene in *S. lividans*.

Stämme zur Konjugation und anschließender Expression verschiedener ClpP-Proteine in *S. lividans*
Wildtyp und Knockout-Stämmen

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551His-clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551His-clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP1kurz	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP1kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP1kurz	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP1kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP1lang	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP1lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP1lang	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP1lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP2kurz	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP2kurz	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP2lang	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP2lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP2lang	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP2lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ12551clpP3	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ12551clpP3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP3	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP3	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ12551clpP1clpP2	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ12551clpP1clpP2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ12551clpP1clpP2	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ12551clpP1clpP2	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> XL1 pIJ10257	<i>s. E. coli</i> XL1-Blue; pIJ10257	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257His-clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit

<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257His-clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257clpP2kurz	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257clpP2kurz	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257clpP2lang	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257clpP2lang	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ10257clpP2kurz-His	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ10257clpP2kurz-His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ10257clpP2kurz-His	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ10257clpP2kurz-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pIJ12551	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> P _{ADEP} kurz	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> His-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ12551His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pIJ10257	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ10257	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 pIJ12551	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 P1kurz	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551clpP1kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 P1lang	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551clpP1lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 P _{ADEP} kurz	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551clpP _{ADEP} kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1;; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 His-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ12551His-ClpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 pIJ10257	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ10257	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 pIJ12551	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P1kurz	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP1kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P1lang	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP1lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P2kurz	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P2lang	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP2lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P1P2-Operon	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP1clpP2	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 His-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ12551His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 pIJ10257	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 BT1-P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 BT1-His-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 BT1-P2kurz	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257clpP2kurz	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 BT1-P2lang	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit

<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ BT1-P2kurz-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ10257clpP2kurz-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ BT1-P2lang-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ10257clpP2lang-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1kurz BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1kurz, pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1lang BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1lang, pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2kurz BT1-clpP _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2kurz, pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2lang BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2lang, pIJ10257clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2kurz BT1-P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2kurz, pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2kurz BT1-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2kurz, pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2lang BT1-P _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2lang, pIJ10257clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P2lang BT1-His-P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP2lang-His, pIJ10257His-clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P _{ADEP} BT1-P2kurz-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP _{ADEP} , pIJ10257clpP2kurz-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P _{ADEP} BT1-P2lang-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP _{ADEP} , pIJ10257clpP2lang-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1kurz BT1-P2kurz	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1short, pIJ10257clpP2short	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1kurz BT1-P2kurz-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1kurz, pIJ10257clpP2kurz-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1kurz BT1-P2lang	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1kurz, pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ P1kurz BT1-P2lang-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551clpP1kurz, pIJ10257clpP2lang-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP3$ pIJ12551	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP3$; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP3$ P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP3$; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP3P4$ pIJ12551	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP3clpP4$; pIJ12551	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP3P4$ P _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP3clpP4$; pIJ12551clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Hyp	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Hyp	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Hyp BT1-P2lang	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Hyp, pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Hyp BT1-P2lang-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Hyp, pIJ10257clpP2lang-His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Cat	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Cat	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Cat BT1-P2lang	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Cat, pIJ10257clpP2lang	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ ShP1Cat BT1-P2lang-His	<i>s. S. lividans</i> $\Delta clpP1clpP2$; pIJ12551ShclpP1Cat, pIJ10257clpP2lang-His	Diese Arbeit

Tabelle 16: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur Konjugation und anschließenden Expression verschiedener Clp-Proteine in *S. lividans* Wildtyp und Knockout-Stämmen. BT1 im Namen verschiedener Mutanten weist auf das verwendete Plasmid pIJ10257 (mit

einer Φ BT1-Integrase) hin, im Gegensatz zu pIJ12551 (mit einer Φ C31-Integrase) ohne Namenszusatz, um differenzieren zu können, welches Vektorsystem genutzt wurde, um das jeweilige *clpP*-Homolog in den jeweiligen Stamm einzubringen.

Stämme zur Konjugation und anschließenden Expression von Clp_{ADEP} in verschiedenen Streptomyces-Spezies

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> JM109 SET152ermE* Δ HindIII	<i>s. E. coli</i> JM109; pSET152ermE* Δ HindIII	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pSET152ermE*HindIII	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pSET152ermE* Δ HindIII	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pSET152clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> JM109; pSET152clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pSET152clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pSET152clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pSETermE*	<i>s. S. lividans</i> TK24; pSET152ermE* Δ HindIII	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pSETclpP _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> TK24; pSETclpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> pSETermE*	<i>s. S. coelicolor</i> A3(2); pSET152ermE* Δ HindIII	Diese Arbeit
<i>S. coelicolor</i> pSETclpP _{ADEP}	<i>s. S. coelicolor</i> A3(2); pSETclpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. griseus</i> pSETermE*	<i>s. S. griseus</i> Waksman; pSET152ermE* Δ HindIII	Diese Arbeit
<i>S. griseus</i> pSETclpP _{ADEP}	pSETclpP _{ADEP}	Diese Arbeit

Tabelle 17: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur Konjugation und anschließenden Expression von Clp_{ADEP} in verschiedenen *Streptomyces*-Spezies.

Stämme zur Konjugation und anschließenden induzierbaren Expression von Clp_{ADEP} in *S. lividans* Wildtyp und Knockout-Stämmen

Stamm	Genotyp	Stammherkunft
<i>E. coli</i> XL1 pIJ6902	<i>s. E. coli</i> XL1; pIJ6902	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ6902clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ6902clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ6902clpP _{ADEP}	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ6902clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> JM109 pIJ6902clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> JM109; pIJ6902clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>E. coli</i> ET12567 pUB307 pIJ6902clpP _{ADEP} -His	<i>s. E. coli</i> ET12567 pUB307; pIJ6902clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pIJ6902	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ6902	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pIJ6902clpP _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ6902clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> pIJ6902clpP _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> TK24; pIJ6902clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 pIJ6902	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ6902	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 pIJ6902clpP _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ6902clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1 pIJ6902clpP _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1; pIJ6902clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 pIJ6902	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ6902	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 pIJ6902clpP _{ADEP}	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ6902clpP _{ADEP}	Diese Arbeit
<i>S. lividans</i> Δ clpP1P2 pIJ6902clpP _{ADEP} -His	<i>s. S. lividans</i> Δ clpP1clpP2; pIJ6902clpP _{ADEP} -His	Diese Arbeit

Tabelle 18: Stämme zur Konjugation und anschließenden induzierbaren Expression von Clp_{ADEP} in *S. lividans* Wildtyp und Knockout-Stämmen.

2.6 Medien

Medien zur Anzucht von Bakterien wurden nach den folgenden Rezepten hergestellt und, wenn nicht anders angegeben, durch Autoklavieren sterilisiert.

2.6.1 Flüssigmedien

LB-Medium (Lysogeny Broth) (Bertani, 1951, 2004)

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 L Milli-Q
pH 7,3 eingestellt mit 1N oder 6N NaOH

TSB-Medium (Tryptic Soy Broth)

30 g Tryptic Soy Broth
ad 1 L Milli-Q

YM-Medium (Yeast Malt)

4 g Hefeextrakt
10 g Malzextrakt
4 g Glucose
ad 1 L Milli-Q (YM-MilliQ-Medium) oder Leitungswasser (YM-Tap-Medium)
pH 7,3 eingestellt mit 1 N oder 6 N NaOH

Müller-Hinton-Medium

21 g Müller Hinton Broth
ad 1 L Milli-Q

2xYT-Medium (2xYeast-Tryptone)

32 g Trypton
20 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 L Milli-Q
pH 7,0 eingestellt mit 1 N oder 6 N NaOH

TYM-Medium (Tryptone-Yeast-Magnesium)

20 g Trypton
5 g Hefeextrakt
5,84 g NaCl
2,46 g Magnesiumsulfat
ad 1 L Milli-Q

SAM-Medium (Streptomyces Antibiotic Medium)

15 g Soytone
15 g Glucose
5 g NaCl
1 g CaCO₃
25 g Glycerin
ad 1 L Milli-Q
pH 7 eingestellt mit 1 N oder 6 N NaOH

2.6.2 Festmedien

Für Festmedien wurden zunächst die bei Raumtemperatur (RT) löslichen Bestandteile in Wasser gelöst und wenn nötig der pH-Wert eingestellt. Die bei RT nicht löslichen Bestandteile wurden in Schottflaschen eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen des Mediums aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

LB-Agar

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
10 g NaCl
ad 1 L Milli-Q
pH 7,3 eingestellt mit 1 N oder 6 N NaOH
Einwaage von 5 g Agar/333 ml Medium in eine 500 ml Schottflasche

Müller-Hinton-Softagar

21 g Müller Hinton Broth
ad 1 L Milli-Q
Einwaage von 2,5 g Agar/333 ml Medium in eine 500 ml Schottflasche

Müller-Hinton-Agar

21 g Müller Hinton Broth
ad 1 L Milli-Q
Einwaage von 5 g Agar/333 ml Medium in eine 500 ml Schottflasche

MS-Agar (Mannitol-Sojamehl/Cullum-Agar)

20 g Mannitol
ad 1 L Leitungswasser
Einwaage von je 5 g Agar und 5 g Sojamehl/250 ml Medium in eine 500 ml Schottflasche

NE-Agar (Nutrient extract) (Murakami et al., 1989)

10 g Glucose
2 g Hefeextrakt
2 g Casaminoacids
1 g Lab Lemco Powder
ad 1 L Milli-Q
pH 7,0 eingestellt mit 1 N oder 6 N NaOH
Einwaage von 5 g Agar/333 ml Medium in eine 500 ml Schottflasche

2.7 Puffer, Lösungen, Größenstandards

Wenn nicht anders angegeben, wurden folgende Puffer und Lösungen mit Milli-Q hergestellt.

TFBI-Puffer zur Herstellung chemo-kompetenter Zellen

0,3 ml 5 M Kaliumacetat
495 mg MnCl_2
2,5 ml 2 M KCl
0,5 ml 1 M CaCl_2
7,5 ml Glycerol
ad 50 ml Milli-Q

TFBII-Puffer zur Herstellung chemo-kompetenter Zellen

2,5 ml 2M MOPS, pH 7,0 eingestellt mit 5 M KOH
3,7 ml 1 M CaCl₂
250 µl 2 M KCl
7,5 ml Glycerol
ad 50 ml Milli-Q

10x PBS-Puffer

80 g NaCl
2 g KCl
14,4 g Na₂HPO₄
2,4 g KH₂PO₄
ad 1 L Milli-Q

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt und der Puffer zur Sterilisation autoklaviert. Zum Gebrauch wurde der Puffer im Verhältnis 1:9 mit Milli-Q verdünnt.

PBST-Puffer

1 ml Tween 20
ad 1 L 1x PBS

Blocking-Puffer

2,5 g Magermilchpulver
ad 50 ml PBST-Puffer

50x TAE-Puffer für die Elektrophorese

121,14 g Tris
9,31 g EDTA-Dinatrium
27 ml Eisessig
ad 500 ml Milli-Q

Der pH-Wert wurde auf 8 eingestellt und der Puffer vor Gebrauch im Verhältnis 1:49 mit Milli-Q verdünnt.

Lysepuffer für Streptomyceten-Protein-Rohextrakte (Gominet *et al.* 2011, modifiziert)

20 mM Tris (2,42 g/L)
5 mM EDTA-Dinatrium (1,86 g/L)

Kurz vor Gebrauch wurden 1 mM 2-Mercaptoethanol (0,087 ml/L) sowie eine Protease-Inhibitor-Tablette pro 10 ml Puffer zugegeben und durch Schütteln gemischt bzw. gelöst.

Transferpuffer für Western Blots mit Nitrocellulose-Membranen

3 g Tris
14,4 g Glycin
150 ml Methanol
500 µl SDS-Lösung 20%
ad 1 L Milli-Q

Lysepuffer für die Protein-Aufreinigung über ein His₆-Tag

20 mM Tris-HCl (3,15 g/L)
200 mM NaCl (11,69 g/L)
10% Glycerin [V/V] (100ml/L)

Zunächst wurde Tris-HCl in 1 L Milli-Q gelöst und mit 1 N oder 6 N NaOH auf pH 7,8 eingestellt. Dann wurden NaCl und Glycerin eingewogen/abgemessen und mit dem Tris-HCl Puffer auf 1 L aufgefüllt und der Puffer anschließend autoklaviert.

Waschpuffer 1 für die Protein-Aufreinigung über ein His₆-Tag

1 L Lyse-Puffer
10 mM Imidazol (0,68 g/L)

Das Imidazol wurde im autoklavierten Lysepuffer gelöst.

Waschpuffer 2 für die Protein-Aufreinigung über ein His₆-Tag

1 L Lyse-Puffer
20 mM Imidazol (1,36 g/L)

Das Imidazol wurde im autoklavierten Lysepuffer gelöst.

Elutionspuffer für die Protein-Aufreinigung über ein His₆-Tag

1 L Lyse-Puffer
500 mM Imidazol (34 g/L)

Das Imidazol wurde im autoklavierten Lysepuffer gelöst.

Lagerpuffer für Proteine

50 mM Tris-HCl (7,88 g/L)
50 mM NaCl (2,92 g/L)
10% Glycerin [V/V] (100ml/L)

Zunächst wurde Tris-HCl in 1L Milli-Q gelöst und mit 1 N oder 6 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Dann wurden NaCl und Glycerin eingewogen/abgemessen und mit dem Tris-HCl Puffer auf 1 L aufgefüllt und der Puffer anschließend autoklaviert.

Puffer für die Protoplasten-Herstellung

Alle benötigten Lösungen, Puffer und Medien wurden durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert (Tabelle 19).

Puffer/Lösung/Medien	Bemerkung zur Herstellung
10,3% Sucrose-Lösung (103 g/L)	
0,5% KH ₂ PO ₄ -Lösung (5 g/L)	
3,68% CaCl ₂ -Dihydrat-Lösung (36,8 g/L)	
5 M CaCl ₂ -Dihydrat-Lösung (735 g/L)	
5,73% TES-Puffer, pH 7,2 (57,3 g/L)	
10% Hefeextrakt-Lösung (100 g/L)	
20% L-Prolin-Lösung (200 g/L)	
2,5% K ₂ SO ₄ -Lösung (25 g/L)	
1 M Tris-Maleinsäure-Puffer (121,1 g/L)	pH 8 einstellen mit Maleinsäure
1 M Tris-HCl-Lösung, pH 8 (157,6 g/L)	
1 M Na-EDTA-Lösung, pH 8 (372,2 g/L)	
Lysozym-Lösung	0,5 mg/ml Lysozym in P-Puffer, kurz vor Gebrauch herstellen
TE-Puffer	10 ml 1 M Tris-HCl-Lösung, 1 ml 1 M Na-EDTA-Lösung, ad 1 L Milli-Q
T-Puffer	A) 5 ml 10,3% Sucrose-Lösung, 15 ml Milli-Q, 40 µl Spurenelement-Lösung, 200 µl 2,5% K ₂ SO ₄ -Lösung B) 9,3 ml A), 0,2 ml CaCl ₂ -Lösung 5 M, 0,5 ml Tris-Maleinsäure-Puffer fertigen Puffer mischen aus 9 ml B) und 3 ml geschmolzenem PEG 1000
P-Puffer	Teil 1: 103 g Sucrose, 0,25 g K ₂ SO ₄ , 2,02 g MgCl ₂ -Hexahydrat, 2 ml Spurenelement-Lösung, ad 800 ml Milli-Q; fertiger Puffer: 80 ml Teil 1, 1 ml 0,5% KH ₂ PO ₄ -Lösung, 10 ml 3,68% CaCl ₂ -Dihydrat-Lösung, 10 ml 5,73% TES-Puffer

Spurenelement-Lösung

40 mg ZnCl₂, 200 mg FeCl₃-Hexahydrat, 10 mg CuCl₂-Dihydrat, 10 mg MnCl₂-Tetrahydrat, 10 mg Na₂B₄O₇-Decahydrat, 10 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄-Tetrahydrat ad 1 L Milli-Q

S-Medium

Teil 1: 2 g Pepton, 2 g Hefeextrakt, 2 g K₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 5 g Glycin, ad 400 ml Milli-Q
Teil 2: 5 g Glucose, 0,25 g MgSO₄, ad 100 ml Milli-Q
nach dem Autoklavieren vereinen

R2-Agar

Teil 1: 103 g Sucrose, 0,25 g K₂SO₄, 10,12 g MgCl₂-Hexahydrat, 10 g Glucose, 0,1 g Casaminoacids ad 800 ml Milli-Q. Es wurden je 200 ml mit 5,55 g Agar autoklaviert.

Fertiges Medium: 200 ml verflüssigter Teil 1, 2,5 ml 0,5% KH₂PO₄-Lösung, 20 ml 3,68% CaCl₂-Dihydrat-Lösung, 3,75 ml 20% L-Prolin-Lösung, 25 ml 5,73% TES-Puffer, 0,5 ml Spurenelement-Lösung, 1,25 ml 1 N NaOH, 10 ml 10% Hefeextrakt-Lösung

Tabelle 19: Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastenherstellung.

Lösungen und Puffer für Substratspezifitäts-Assays

Alle Lösungen und Puffer wurden durch Autoklavieren oder Filtrieren sterilisiert (Tabelle 20).

Puffer/Lösungen	Bemerkung zur Herstellung
50 mM Tris-HCl, pH8 (3,94 g/L)	
25 mM Tris-HCl, pH8 (1,97 g/L)	
300 mM MgCl ₂ (61 g/L MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	gepuffert in 25 mM Tris-HCl, pH8
2 M Hydroxylaminhydrochlorid (140 g/L) in 3,5 M NaOH (140 g/L), pH 8	pH 8 einstellen mit konz. HCl
30 mM ATP (16,5 g/L)	
150 mM Aminosäurelösungen in 25 mM Tris-HCl	11,26 g/L Glycin; 17,27 g/L L-Prolin; 13,36 g/L L-Alanin; 24,78 g/L L-Phenylalanin; 15,76 g/L L-Serin; 19,37 g/L L-Pipecolinsäure; 24,84 g/L (2S,4R)-4-Methylprolin
Stop-Lösung	100 g/L FeCl ₃ x 6 H ₂ O, 33 g/L Trichloressigsäure in 0,7 M HCl

Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Substratspezifitäts-Assays.

DNA-Größenstandards

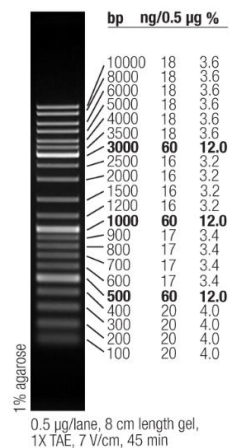


Abbildung 12: Bandenprofil des O'GeneRuler Ladder Mix, ready to use, auf einem 1% Agarose-TAE-Gel.

Protein-Größenstandards, ungefärbt

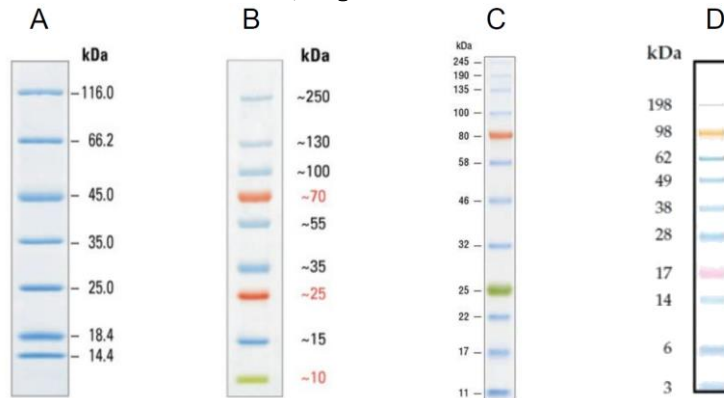


Abbildung 13: SDS-PAGE Bandenprofile verschiedener Protein-Größenstandards. A) Pierce Unstained Protein MW Marker auf einem 12% Tris-Glycin-Gel nach Färbung mit Coomassie Blue, B) PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa) auf einem 4-20% Tris-Glycin-Gel, C) NEB Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa) auf einem 10-20% Tris-Glycin-Gel, D) SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (3-198 kDa) auf einem NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel mit MES-Puffer.

2.8 Software und Internetanwendungen

Programm/Tool	Anwendung	Hersteller/Internetseite
antiSMASH 3.0	Analyse von BGCs	http://antismash.secondarymetabolites.org
AriaMx Real-Time PCR Software	qPCR	Agilent Technologies
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool; Vergleich von biologischen Sequenzen mit Datenbanken	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
Chem Station	HPLC Auswertung	Agilent Technologies
Chromas lite	Auswertung von Chromatogrammen nach der DNA-Sequenzierung	Technelysium
Clustal Omega	Abgleich von DNA- und Protein-Sequenzen	http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo
ExpAsy Translate	Übersetzung von Nucleotidsequenzen in Proteinsequenzen	http://web.expasy.org/translate
Image Lab 3.0.1	Geldokumentation	Bio-Rad
NCBI	Datenbank für biotechnologische Informationen	https://www.ncbi.nlm.nih.gov
Nucleic Acid Sequence Massager	Bereinigung von DNA- und Proteinsequenzen	http://www.cybertory.org/resources/sequenceTools/seqMassager.htm
Protein Molecular Weight Calculator	Berechnung des Molekulargewichts von Proteinen	http://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm
Quantity One	Detektion und Dokumentation von Western Blots	Bio-Rad
RNAfold	Vorhersage von Sekundärstrukturen von einzelsträngiger RNA und DNA	http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi
SnapGene Viewer	Erstellen von Vektorkarten; Auswertung von Chromatogrammen nach der DNA-Sequenzierung	GSL Biotech
Vision Capt	Geldokumentation	Vilber
Xcalibur V6.0	LCMS-Auswertung	Thermo Scientific
NEB Tm Calculator	Ermittlung von Anlagerungstemperaturen für Primer während der PCR	http://tmcalculator.neb.com
NEBuilder	Primer-Design für Gibson-Assembly	

NEBioCalculator	Berechnung molarer Verhältnisse für die Ligation	
ChemBioDraw Ultra 13.0	Zeichnen chemischer Strukturformeln	PerkinElmer

Tabelle 21: In dieser Arbeit verwendete Software-Tools und Internetanwendungen.

3 Methoden

3.1 Mikrobiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

E. coli-Stämme wurden in LB-Flüssigmedium oder auf LB-Agar, je nach Bedarf mit den zur Selektion notwendigen Antibiotika, bei 37 °C kultiviert.

Zur Stammhaltung wurden Glycerin-Kulturen hergestellt. 750 µl einer Übernachtskultur wurden mit 750 µl sterilem Glycerin 50% in einer Kryoröhre gemischt und bei -80 °C tiefgefroren.

Streptomycceten-Stämme wurden auf MS-Agar mit 2,5 mM MgCl₂, je nach Bedarf mit den zur Selektion notwendigen Antibiotika, bis zur Sporulation bei 30 °C kultiviert (4-10 Tage).

Zur Stammhaltung wurden Sporensuspensionen hergestellt. Dazu wurde der jeweilige Stamm auf MS-Agarplatten, wie oben beschrieben, kultiviert. Nach Zugabe von 2 ml sterilem Wasser pro Platte wurden die Sporen vorsichtig mit einer Impföse abgelöst. Die Suspension wurde in eine 50 ml Röhre überführt und ca. 1 min stark mit dem Vortexer gemischt um Sporenketten aufzutrennen. Anschließend wurde sie durch sterile Watte in einer 20 ml Luer-Spritze in eine frische 50 ml Röhre filtriert. Nach Zentrifugation mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Sporenpellet in 500 µl sterilem Glycerin 20% resuspendiert und aliquotiert. Die Lagerung erfolgte zum Gebrauch bei -20 °C, zur Stammhaltung bei -80 °C.

3.1.2 Messung des Wachstums von Bakterien

3.1.2.1 Messung des Wachstums mittels optischer Dichte

Das Wachstum von dispers wachsenden Bakterienstämmen, wie *E. coli* und *B. subtilis*, erfolgte mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀). Dazu wurden Bakteriensuspensionen in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen.

3.1.2.2 Messung von Wachstumskurven

Wachstumskurven für Streptomycceten-Stämme wurden durch Ermittlung der trockenen Zellmasse von Proben zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Dazu wurden mit Hilfe einer serologischen Pipette Proben von 5-10 ml aus einer Flüssigkultur entnommen und durch gewogene Filtrierpapiere der Firma Macherey-Nagel mit einem Durchmesser von 70 mm filtriert. Das Filtrat wurde verworfen und der Filter mit der zurückgehaltener Zellmasse einmal mit Milli-Q gewaschen. Nach vollständigem Abfließen der Flüssigkeit wurden die Proben in Petrischalen bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren. Nach Beendigung der Probennahme wurden alle Proben aufgetaut und bei 60 °C bis zur Massenkonstanz getrocknet. Aus der Differenz des Gewichts der Filter vor und nach der Probennahme wurde die Trockenmasse ermittelt und graphisch gegen die Zeit der Probennahme aufgetragen.

3.1.3 Bioassays

Zum Testen der Sensitivität von Bakterienstämmen gegen verschiedene Antibiotika oder zum Test auf das Vorhandensein antibiotisch wirksamer Substanzen in Kulturen wurden Bioassays durchgeführt. Dazu wurden entweder Filterplättchen mit den Testsubstanzen bestückt und auf Agarplatten mit den entsprechenden Stämmen aufgebracht oder Löcher in die Agarplatten gestanzt und diese mit Kulturüberständen gefüllt. Nach Inkubation konnten anhand der

Hemmhofgröße Rückschlüsse auf Antibiotikagehalt, Aktivität der Substanz bzw. Sensitivität des Teststammes gezogen werden.

3.1.3.1 Bioassays mit Filterplättchen

Um die Aktivität von bzw. die Sensitivität verschiedener Stämme gegen konzentrierte Antibiotikallösungen zu testen, wurden diese in der gewünschten Menge auf Filterplättchen aufgebracht und diese unter Lichtschutz bis zum Verdampfen des Lösungsmittels aufbewahrt. Lösungsmittelkontrollen wurden ebenso erzeugt.

In der Zwischenzeit wurden Agarplatten mit den zu testenden Stämmen vorbereitet. Dispers wachsende Bakterien verteilen sich durch Mischen gleichmäßig im Medium. Für diese Stämme, hier *B. subtilis* 168 und *B. subtilis* 168 $\Delta clpP$, wurden je nach verwendeter Petrischale 20 bzw. 50 ml Müller-Hinton-Softagar bis zum vollständigen Lösen des Agars erwärmt und auf 45 °C im Wasserbad abgekühlt. Eine Übernachtskultur des Teststammes wurde mit Müller-Hinton-Flüssigmedium auf eine OD₆₀₀ von 0,1 eingestellt und 200 bzw. 500 µl dieser Suspension mit 20 bzw. 50 ml des abgekühlten Softagars vermischt und sofort in die Petrischale gegossen. Nach dem Aushärten des Agars wurden die Antibiotika-haltigen Filterplättchen auf dem Agar platziert, die Platte eine Stunde zur Diffusion des Antibiotikums im Kühlschrank gelagert und anschließend bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Bei nicht dispers wachsenden Bakterien, wie Streptomycceten, wurden NE- oder Müller-Hinton-Agarplatten verwendet, die mit Sporensuspensionen (5-20 µl in 700 µl Milli-Q) überschichtet wurden. Nach dem Trocknen wurden die Antibiotika-haltigen Filterplättchen platziert und die Platten bei 30 °C für zwei bis drei Tage inkubiert.

3.1.3.2 Bioassays mit Kulturüberständen

Bakterienkulturüberstände können auf ähnliche Weise auf ihren Gehalt an antibiotisch wirksamen Substanzen getestet werden. Hierzu wurden Müller-Hinton-Softagarplatten mit Teststämmen wie oben beschrieben hergestellt. Mit einem Metallstempel wurden Löcher in der gewünschten Größe in den Agar gestanzt und die zu testende Menge an Kulturüberstand in die Löcher pipettiert. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

3.1.3.3 ADEP-Bioassay mit *S. hawaiiensis*

Um sowohl die ADEP-Produktion von *S. hawaiiensis* zu visualisieren, als auch verschiedene Stämme auf ihre ADEP-Sensitivität zu testen, wurden 5-10 µl einer Sporensuspension des ADEP-Produzentenstamms auf NE- oder MH-Agar balkenförmig ausgestrichen und für drei Tage bei 30 °C inkubiert. Dann wurden 2-5 µl einer Sporensuspension der gewünschten Teststämmen im rechten Winkel zu *S. hawaiiensis* ebenfalls balkenförmig ausgestrichen und ihr Wachstum über drei Tage verfolgt und dokumentiert (Gominet et al., 2011).

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Aufreinigung von DNA

3.2.1.1 Genomische DNA

Die Isolation von genomischer DNA aus Streptomycceten-Stämmen erfolgte aus 2 ml einer ca. 48 h alten Kultur mit dem *innuPrep Bacterial DNA Kit* nach Angaben des Herstellers. Abweichend wurden 10 µl Lysozym (50 mg/ml) eingesetzt und die Suspension schüttelnd mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert, bis das Mycel deutlich sichtbar lysiert war. Während des Proteinase K-Verdau

wurde ergänzend ein RNase-Verdau durchgeführt, indem 1 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt wurde.

3.2.1.2 Plasmid-DNA

Die Isolation von Plasmiden aus *E. coli*-Stämmen erfolgte aus 4 ml einer Übernachtskultur mit dem *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* nach Angaben des Herstellers.

3.2.1.3 PCR-Produkte

PCR-Produkte wurden mit dem *innuPREP DOUBLEpure Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Zum Konzentrieren und Reinigen wurde das Protokoll „*Purification and concentration of PCR products*“ genutzt, während PCR-Produkte, die über ein Gel aufgetrennt wurden, nach dem Protokoll „*DNA extraction from agarose gel slices*“ aufgereinigt wurden.

3.2.1.4 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentration von gelöster DNA und RNA wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm, dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren, mit dem *NanoDrop 2000c* bestimmt. Das Gerät wurde dazu zunächst mit 1 µl Lösungsmittel kalibriert und anschließend wurde 1 µl Probe vermessen. Dabei entspricht eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml sowie einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml.

3.2.2 Aufreinigung von RNA

Die Aufreinigung von RNA aus Streptomycceten-Stämmen erfolgte je nach Wachstumsphase aus 2-10 ml Kultur mit dem *innuSPEED Bacteria/Fungi RNA Kit* nach Angaben des Herstellers mit folgenden Abweichungen.

Beim Nehmen der Proben wurden diese mit dem doppelten Volumen des Reagenzes *RNAprotect* in einer 15 oder 50 ml Röhre vermischt, für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 4.000 rpm durch Zentrifugation in der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Isolation der RNA wurden die Proben langsam auf Eis aufgetaut und mit 200 µl Lysispuffer LR versetzt. Mit Hilfe einer Impföse wurde das Zellmaterial in ein Lysis-Röhrchen transferiert und der verbleibende Puffer wurde mit einer Pipette ebenfalls in das Lysis-Röhrchen überführt.

Der Zellaufschluss erfolgte mit dem *Precellys Evolution* (3 x 23 s bei 6.500 rpm, je 10 s Pause, drei Wiederholungen). Anschließend wurden weitere 250 µl LR zugegeben und die Proben laut Protokoll inkubiert und weiter bearbeitet. Nach dem Binden der RNA an die Säule wurde mit dem *innuPREP DNase I Digest Kit* ein zusätzlicher DNase-Verdau laut Herstellerangaben durchgeführt. Am Ende wurde die RNA in 2 x 20 µl RNase-freiem Wasser eluiert, ihre Konzentration mittels *NanoDrop* bestimmt und bei -20 °C gelagert.

3.2.3 Enzymatische *in vitro*-Reaktionen von DNA

3.2.3.1 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die unter anderem in Bakterien der Phagenabwehr dienen, in dem sie doppelsträngige Fremd-DNA z. B. am Methylierungsmuster erkennen und dann spezifisch hydrolysieren können.

Restriktionsenzyme, die in dieser Arbeit genutzt wurden, gehören alle dem Typ 2 von insgesamt vier an, der sich dadurch auszeichnet, dass weder ATP benötigt wird, noch eine

Methyltransferase-Aktivität vorhanden ist und die Hydrolyse der DNA unmittelbar in oder an der palindromischen Erkennungssequenz erfolgt.

Restriktionsverdau wurden mit Plasmiden oder PCR-Produkten, denen durch Primer die entsprechenden Restriktionsschnittstellen angehängt wurden, zu Klonierungszwecken oder zur Überprüfung von fertigen DNA-Konstrukten in der Regel über Nacht, mindestens jedoch für 3 h, bei 37 °C durchgeführt (Tabelle 22). Bei Plasmiden für Klonierungszwecke erfolgte der Restriktionsverdau in Anwesenheit einer Phosphatase, da die Dephosphorylierung der 5'-Enden der DNA-Stränge die Re-Ligation der Plasmidenden verhindert und somit den Klonierungserfolg erhöht.

Bestandteil	PCR-Produkte zur Klonierung	Plasmid zur Klonierung	Plasmid Überprüfung
DNA	1 µg	1 µg	< 1 µg
10x CutSmart Buffer	5 µl	5 µl	2 µl
Enzym 1	1 µl	1 µl	0,5 µl
Enzym 2	1 µl	1 µl	Bei Bedarf 0,5 µl
10x Antarctic Phosphatase Reaction Buffer	-	5 µl	-
Antarctic Phosphatase	-	1 µl	-
Milli-Q	ad 50 µl	ad 50 µl	ad 20 µl

Tabelle 22: Bestandteile verschiedener Ansätze für Verdau mit Restriktionsendonukleasen.

Nach Ende des Verdau wurden die Ansätze mit dem *innuPREP DOUBLEpure Kit* nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Entstanden beim Verdau Nebenprodukte von < 30 bp, wurde das Protokoll „*Purification and concentration of PCR products*“ genutzt, während bei Nebenprodukten von > 30 bp nach Auftrennung über ein Agarosegel nach dem Protokoll „*DNA extraction from agarose gel slices*“ aufgereinigt wurde. Verdau von Plasmiden wurden grundsätzlich über ein Gel und nach dem Protokoll „*DNA extraction from agarose gel slices*“ aufgereinigt.

3.2.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Die T4 DNA-Ligase katalysiert die Knüpfung von kovalenten Phosphodiester-Bindungen zwischen den 5'-Phosphaten und 3'-Hydroxygruppen von benachbarten Nukleotiden.

Diese Eigenschaft wurde genutzt um nach erfolgreichem Restriktionsverdau DNA-Fragmente in Vektoren einzubringen. Für diese Arbeit wurde die T4 DNA Ligase von NEB oder von Thermo Scientific genutzt. Ligationsansätze wurden nach Herstellerangaben angesetzt und über Nacht bei RT (maximal 25 °C) oder im PCR-Cycler bei 16 °C (NEB)/22 °C (Thermo Scientific) inkubiert (Tabelle 23).

Bestandteil	Eingesetzte Menge
10x T4 Ligase Reaction Buffer	2 µl
Plasmid nach Restriktionsverdau	bis zu 150 ng
Insert nach Restriktionsverdau	bis zu 300 ng
T4 DNA Ligase	1 µl (NEB)/0,2 µl (Thermo Scientific)
Milli-Q	ad 20 µl

Tabelle 23: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

3.2.4 PCR-Methoden

Die PCR, kurz für Polymerase-Kettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*) (Mullis et al., 1986), dient der Vervielfältigung von ausgewählten DNA-Abschnitten. Indem man sich einer hitzestabilen DNA-Polymerase aus einem thermophilen Bakterium bedient, können durch ein Temperatur-Zyklen-Programm bis zu Millionen Kopien des gewünschten Gens hergestellt werden.

3.2.4.1 Amplifizierung von DNA mit Proof Reading Polymerasen

Proof Reading Polymerasen weisen neben ihrer 5' → 3' Polymerase-Aktivität auch eine 3' → 5' Exonuklease-Aktivität auf, wodurch inkorrekt eingebaute Nukleotide während der PCR wieder herausgeschnitten und ausgetauscht werden können. Dies ist insbesondere bei Klonierungen und Sequenzierungen wichtig. In dieser Arbeit wurden die *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* und die *Q5 High-Fidelity DNA Polymerase* für Proof Reading-Anwendungen benutzt. PCR-Ansätze und PCR-Programme wurden nach Herstellerangaben erstellt (Tabelle 24, Tabelle 25). Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden mit Hilfe des *NEB Tm Calculators* oder durch einen Temperaturgradienten bestimmt.

Bestandteil Phusion/Q5	Volumen	Endkonzentration
5x Phusion HF oder GC Puffer/5x Q5 Reaction Buffer	10 µl	1x
10 mM dNTPs	1µl	200 µM
10 µM Vorwärts Primer	2,5 µl	0,5 µM
10 µM Rückwärts Primer	2,5 µl	0,5 µM
Template DNA	Je nach Konzentration	Bis zu 100 ng
DMSO/5x Q5 High GC Enhancer	1,5-5 µl/10 µl	3-10%/20%
Phusion DNA Polymerase/Q5 DNA Polymerase	0,5 µl	1 U
Milli-Q	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 24: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Proof Reading Polymerasen.

Reaktionsschritt	Temperatur Phusion/Q5	Dauer Phusion/Q5	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s - 3 min	1
Denaturierung	98 °C	10 s	
Anlagerung	Nach Bedarf	30 s	30-35
Verlängerung	72 °C	20-30 s/kb	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min/2 min	1

Tabelle 25: Cycler-Programm für PCRs mit Proof Reading Polymerasen.

3.2.4.2 Analytische PCR

Für rein analytische Zwecke wurde die *DreamTaq DNA Polymerase* verwendet, die zuverlässig amplifiziert, allerdings nicht mit der Genauigkeit einer Proof Reading Polymerase, da sie keine Exonuklease-Aktivität besitzt. PCR-Ansätze und PCR-Programme wurden nach Herstellerangaben erstellt (Tabelle 26, Tabelle 27). Die Anlagerungstemperaturen der Primer wurden mit Hilfe des *NEB Tm Calculators* oder durch einen Temperatur-Gradienten bestimmt.

Bestandteil	Volumen	Endkonzentration
10x DreamTaq Puffer	5 µl	1x
10 mM dNTPs	1µl	200 µM
10 µM Vorwärts Primer	1,25 µl	0,25 µM
10 µM Rückwärts Primer	1,25 µl	0,25 µM
Template DNA	Je nach Konzentration	Bis zu 100 ng
DMSO	1,5-5 µl	3-10%
DreamTaq DNA Polymerase	0,25 µl	1,25 U
Milli-Q	ad 50 µl	ad 50 µl

Tabelle 26: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für analytische Zwecke.

Reaktionsschritt	Temperatur	Dauer	Zyklusanzahl
Initiale Denaturierung	95 °C	1-3 min	1
Denaturierung	95 °C	30 s	
Anlagerung	Nach Bedarf	30 s	30-35
Verlängerung	72 °C	1 min/kb	
Finale Verlängerung	72 °C	10 min	1

Tabelle 27: Cycler-Programm für PCRs für analytische Zwecke.

3.2.4.3 Kolonie-PCR

Um Transformanten und Transkonjuganten auf erfolgreiche Plasmidaufnahme bzw. -integration zu testen wurden analytische PCRs durchgeführt, bei denen als Template anstelle von aufgereinigter DNA direkt die gewünschte Kolonie genutzt wurde.

Dazu wurde die jeweilige Kolonie in 10-30 µl Milli-Q in einem 0,2 ml-Reaktionsgefäß resuspendiert und bei 100 °C für 5-45 min aufgeköcht. Von der abgekühlten Suspension wurden 1-5 µl in einen Reaktionsansatz eingesetzt. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes entsprach dem einer analytischen PCR (3.2.4.2), allerdings mit einem Gesamtvolumen von 25 µl.

3.2.4.4 Genexpressionsanalysen mittels qPCR

Um die Expression ausgewählter Gene zu analysieren, bedient man sich dem Enzym Reverse Transkriptase, um die grundsätzlich wesentlich instabilere RNA in stabile, einzelsträngige cDNA umzuschreiben. Diese kann dann als Template in eine quantitative Real Time-PCR (qPCR) eingesetzt werden, wo durch einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff in Echtzeit die Entstehung von DNA-Doppelsträngen verfolgt werden kann. Durch die Annahme, dass die Entstehung von doppelsträngiger DNA während der PCR exponentiell abläuft, kann auf die Kopienanzahl des zu analysierenden Gens im eingesetzten Volumen des Templates und so auch in der isolierten RNA rückgeschlossen werden.

Nach Isolation der RNA (3.2.2) wurden 1.000 ng in einen DNase-Verdau eingesetzt, um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen. Für den Verdau wurde die RNase-freie DNase der Firma Promega nach Protokoll des Herstellers angewendet.

5 µl eines solchen Verdau konnten direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt werden. Hierfür wurde das *AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit* der Firma Agilent Technologies nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Ausschluss von Verunreinigungen jeglicher Bestandteile wurde stets auch eine noRT-Kontrolle (keine Reverse Transkriptase) durchgeführt, da in dieser Kontrollprobe Signale während der qPCR nicht von vervielfältigter cDNA herrühren können und auf Fremd-DNA oder gDNA-Kontaminationen hinweisen.

Die erfolgreiche Produktion von cDNA wurde zum Vergleich mit der noRT-Kontrolle sowie der isolierten RNA vor und nach dem zusätzlichen DNase-Verdau mittels analytischer PCR überprüft und nach einem positiven Ergebnis für die qPCR verwendet.

Die qPCR wurde mit dem *Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mix* von Agilent Technologies sowie dem zugehörigen Protokoll durchgeführt. Für die zu untersuchenden Gene wurden Primer gelegt, die, wenn mit gDNA als Template getestet, ein spezifisches 150-250 bp großes Produkt amplifizierten. Beide im Ansatz benötigten Primer wurden bereits vorher vereint und gemischt, um Fehler durch das Pipettieren von kleinen Volumina zu vermeiden.

Die Ansätze wurden in speziellen 96-well-Platten für die qPCR mit Deckeln (*Aria 96 Well Plates, Skirted, LP; Optical Cap, 8x Strip*; beide von Agilent Technologies) zusammen pipettiert. Es wurde immer 1 µl des Primer-Mixes vorgelegt, gefolgt von 2 µl des jeweiligen Templates (cDNA, noRT-Kontrolle oder Wasser für eine Kontrolle ohne Template (NTC)). Anschließend wurden 17 µl eines Master-Mixes aus allen weiteren Komponenten hinzugefügt. Durch kurze Zentrifugation mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* wurde sichergestellt, dass sich das komplette Volumen des Ansatzes blasenfrei am Boden der 96-well-Platte befand. Die Amplifikation wurde mit folgendem Programm durchgeführt und im Anschluss durch eine Dissoziationskurve auf Kontaminationen überprüft (Tabelle 28).

Reaktionsschritt	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
qPCR	180 sec	98 °C	1
	5 sec	98 °C	40
	10 sec	60 °C	
Dissoziation	30 sec	95 °C	1
	30 sec	45 °C	1
	30 sec	95 °C	1

Tabelle 28: Cycler-Programm für die qPCR.

Die Auswertung erfolgte über die C_t -Werte durch Normalisierung auf das Referenzgen *hrdB* (ΔC_t) und das anschließende Auftragen der $2^{-\Delta C_t}$ Werte, also der logarithmischen Expressionslevel, die die relative Menge des exprimierten Gens im Vergleich zum Referenzgen (*hrdB*) darstellen, in Balkendiagrammen.

3.2.5 Techniken zur Klonierung

3.2.5.1 Klassische Klonierung

Zur Klonierung eines DNA-Fragments in einen Vektor wurde dieses zunächst mittels PCR mit einer Proof Reading Polymerase amplifiziert (3.2.4.1), bei der durch entsprechende Primer die gewünschten Restriktionsschnittstellen angehängt wurden. Durch Restriktionsverdau von Insert und Vektor (3.2.3.1) wurden komplementäre Enden generiert, so dass das PCR-Produkt schließlich durch Ligation in den Vektor eingebracht werden konnte (3.2.3.2). 5-10 µl des Ligationsansatzes wurden dann zur chemischen Transformation eines Klonierungsstammes mit reduzierter Endonuklease- und Rekombinationsaktivität eingesetzt (*E. coli* XL1-Blue, *E. coli* JM109 oder *E. coli* DH5α) (3.2.5.3). Zur Überprüfung von Transformanten wurden Flüssigkulturen angezogen, um diese, nach Isolation der Plasmide, anhand ihres Laufverhaltens auf einem Agarose-Gel (3.3.1) im Vergleich zum Ausgangsplasmid oder durch Restriktionsverdau auf das Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe zu überprüfen. Abschließend wurde ein vielversprechendes Plasmid durch die Firma LGC Genomics sequenziert und bei Fehlerfreiheit in den gewünschten Expressionsstamm oder Konjugationsstamm transformiert.

3.2.5.2 Klonierung mittels Gibson Assembly

Die von Daniel G. Gibson entwickelte Methode ermöglicht die Klonierung von einem oder mehreren Fragmenten in einen Vektor in einem Schritt unter isothermalen Bedingungen. Es wurde der *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* nach Angaben des Herstellers mit geringen Abweichungen verwendet. Mittels PCR mit einer Proof Reading Polymerase (3.2.4.1) und den entsprechenden Primern wurden die zur Klonierung gewünschten DNA-Fragmente mit 15-20 bp langen, zu den im fertigen Konstrukt angrenzenden DNA-Bereichen komplementären Überhängen erzeugt. Ihre Konzentration wurde so eingestellt, dass ein möglichst geringes

Volumen eingesetzt werden musste, um ein molares Verhältnis von 1:2 zwischen Vektor und Inserts zu erreichen. Die Konzentration des linearisierten Vektors wurde auf 30-100 ng/µl eingestellt, so dass lediglich 1 µl eingesetzt werden musste. Vektor und Inserts wurden mit dem doppelten Volumen des 2x *NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix* vermischt und für 1 h bei 50 °C inkubiert. Dabei werden durch die enthaltene 5' Exonuclease zunächst einzelsträngige Überhänge an allen Fragmenten erzeugt, die sich zusammenlagern, so dass eine Proof Reading Polymerase die vorhandenen Lücken auffüllen kann. Eine T4 DNA Ligase erzeugt schließlich die fehlenden Bindungen. Nach der Inkubation wurde der komplette Ansatz zur chemischen Transformation eines Klonierungsstammes eingesetzt (3.2.5.3) und wie bei der klassischen Klonierung weiter gearbeitet (3.2.5.1).

3.2.5.3 Chemische Transformation von *E. coli*

Um chemo-kompetente *E. coli*-Zellen zu transformieren, wurde zunächst ein 50 µl Aliquot auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1-3 µl Plasmid oder 5-10 µl Ligationsansatz vermischt. Nach Inkubation auf Eis für 30 min erfolgte ein Hitzeschock bei 42 °C für 90 s. Danach wurden die Zellen umgehend auf Eis für 3 min abgekühlt und dann in 1 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium überführt. Nach Regenerierung bei 37 °C im Schüttelinkubator für 1 h wurden die Zellen bei 10.000 rpm für 1 min pelletiert und das Medium durch Ausgießen abgetrennt. Das Pellet wurde im verbleibenden Medienrest resuspendiert und die erhaltene Suspension wurde auf LB-Agarplatten mit den zur Selektion benötigten Antibiotika plattiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde eine Auswahl von Transformanten (1-10 Stück) entweder durch Kolonie-PCR (3.2.4.3) oder Plasmidisolierung (3.2.1.2) und anschließendem Restriktionsverdau (3.2.3.1) auf Vorhandensein des Inserts überprüft und anschließend für einen Klon mittels Sequenzierung bestätigt.

3.2.5.4 Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Zellen nach Standardprotokoll

50 ml TYM-Medium wurden mit 500 µl einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* bei 4.000 rpm für 10 min bei 4 °C in 50 ml Röhren pelletiert und im weiteren Verlauf permanent auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem TFBI-Medium resuspendiert und erneut durch Zentrifugation pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 2,5 ml kaltem TFBII-Medium resuspendiert und die erhaltene Suspension zu 50 µl in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.5.5 Herstellung chemo-kompetenter *E. coli*-Zellen nach der Calciumchlorid-Methode

100 ml LB-Medium wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des gewünschten *E. coli*-Stammes angeimpft und bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 angezogen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in 50 ml Röhren pelletiert und im weiteren Verlauf permanent auf Eis gekühlt. Das Zellpellet wurde in 25 ml einer kalten 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* bei 4.000 rpm für 10 min bei 4 °C pelletiert und in 1 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung resuspendiert. Es wurden 300 µl 50% Glycerol hinzugefügt und die Zellen zu 100 µl in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.5.6 Konjugation von Streptomycceten

Eine der gängigsten Methoden des DNA-Transfers in Streptomycceten ist der intergenerische Transfer von Plasmiden durch *E. coli*. Neben replizierenden Plasmiden können auch nicht replizierende Plasmide, die sequenzspezifisch oder über homologe Rekombination in das Genom integrieren, durch Konjugation in Streptomycceten eingebracht werden, wenn sie den wenig Rezipienten-spezifischen oriT (engl. *origin of transfer*) des Plasmids RP4 besitzen (Mazodier et al., 1989). Als Konjugationsstamm empfiehlt sich ein methylierungsdefizienter *E. coli*-Stamm wie *E. coli* ET 12567 (Flett et al., 1997), der zudem Mobilisierungsfaktoren *in trans* auf dem Plasmid pUB307 (Bennett et al., 1977) zur Verfügung stellt. Im nicht-methylierungsdefizienten *E. coli* S17-1 (Simon et al., 1983) liegt ein RP4-Derivat im Genom integriert vor. Konjugationen wurden durchgeführt wie zuvor beschrieben (Kieser et al., 2000) und die Platten nach 15-20 Stunden zunächst mit 0,5 mg Nalidixinsäure in 700 µl Milli-Q überschichtet und nach vollständigem Trocknen je nach Bedarf mit 1 mg Apramycin und/oder 1 mg Hygromycin B in 700 µl Milli-Q erneut überschichtet. Nach dem Trocknen wurden die Platten weitere 48-120 Stunden bis zur beginnenden Sporulation der Transkonjuganten bei 30 °C inkubiert. Diese wurden dann wiederholt auf MS-Agarplatten oder in TSB-Flüssigmedium, je mit 50 µg/ml Apramycin und 25 µg/ml Nalidixinsäure, passagiert, bis Kontaminationen mit dem *E. coli*-Konjugationsstamm auszuschließen waren. Die erhaltenen Transkonjuganten wurden dann mittels Kolonie-PCR überprüft und Sporensuspensionen zur Stammhaltung hergestellt.

3.2.5.7 Protoplasten-Transformation von Streptomycceten

Protoplasten sind plasmatische Zellen, deren Zellwand durch Behandlung mit Enzymen entfernt wurde, so dass sie wesentlich leichter DNA aufnehmen können. Die Protoplasten-Transformation stellt eine weitere Methode dar, um DNA in Streptomycceten einzubringen. Ein Protoplasten-Aliquot von 50 µl wurde schnell in warmem Wasser aufgetaut und mit 1 ml P-Puffer sowie 5 µl des gewünschten Plasmids in TE-Puffer versetzt. Anschließend wurden 4 ml T-Puffer hinzugefügt und viermal durch Pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde auf zwei R2YE-Agarplatten aufgeteilt und durch Schwenken verteilt. Die Platten wurden bei 30 °C für 14-20 h inkubiert und anschließend, beginnend mit Überschichten mit Antibiotika, wie Konjugationsplatten (3.2.5.6) weiterbehandelt.

3.2.5.8 Herstellung von Protoplasten aus Streptomycceten-Mycel

Die optimale Wachstumsphase beim Start der Protoplastierung ist abhängig von der verwendeten *Streptomycces*-Spezies und kann stark variieren. Daher wurden je 15 ml S-Medium mit verschiedenen Mengen an Sporen beimpft (5-50 µl) und für zwei Tage bei 30 °C und 180 rpm inkubiert, um unterschiedlich dichte Kulturen zu erhalten. Das Mycel wurde durch Zentrifugation in der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* in einer 50 ml Röhre bei 4 °C und 4000 rpm für 10 min abgetrennt und in 15 ml 10,3% Sucrose-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml P-Puffer mit 0,5 mg/ml Lysozym (vor Gebrauch sterilfiltriert) aufgenommen. Es erfolgte ein Inkubationsschritt bei 30 °C mit gelegentlichem Invertieren. Die Protoplasten-Formation wurde beginnend nach 15 min immer wieder unter dem *Axio Scope.A1* überprüft, bis sie weitestgehend vollständig abgeschlossen war. Die Suspension wurde mit einer 5 ml Pipette einmal vorsichtig auf- und abpipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Dann wurden 5 ml eiskalter P-Puffer hinzugefügt, wieder einmal vorsichtig auf- und abpipettiert und der Ansatz für 15 min auf Eis abgekühlt. Die Suspension wurde wie bei der Sporenerstellung (3.1.1) durch sterile Watte filtriert. Die gewonnenen Protoplasten wurden

für 7 min bei 2.140 rpm sedimentiert, der Überstand verworfen und das lockere Pellet in 1 ml P-Puffer durch leichtes Schwenken aufgenommen. In Aliquots von 50 µl wurden die Protoplasten langsam erst bei -20 °C und dann bei -80 °C eingefroren. Späteres Auftauen sollte hingegen schnell in warmem Wasser erfolgen.

3.2.5.9 Konstruktion von Knockout-Mutanten in *Streptomyces*

Knockout-Konstrukte für Gene von *Streptomyces* wurden alle mittels Gibson Assembly kloniert. Die Gene wurden grundsätzlich das Leseraster erhaltend deletiert und Start- und Stop-Codon wurden ebenfalls erhalten, um Downstream-Effekte zu vermeiden. Mittels PCR (3.2.4.1) wurden zwei das Gen einrahmende DNA-Flanken von 1,5 kb Größe amplifiziert und in die Knockout-Plasmide pA18, pGusA21 oder pGM-GUS-Xba kloniert (Vektorkarten in Kapitel 6.2.6, 6.2.7.1 und 6.2.9).

Bei der Konjugation in *Streptomyces* wird durch Selektion auf Apramycin eine Integration des Plasmids ins Genom durch homologe Rekombination erzwungen, da das Knockout-Konstrukt nicht replizierbar ist. Transkonjuganten wurden wie bereits für die Konjugation beschrieben (3.2.5.6) auf MS-Agar mit 50 µg/ml Apramycin und 25 µg/ml Nalidixinsäure überstocht. Bei beginnender Sporulation wurden diese in TSB-Medium, ebenso mit Antibiotika versetzt, überführt und für zwei Tage bei 30 °C und 190 rpm inkubiert. Das Mycel wurde homogenisiert und auf MS-Agar ohne Antibiotika ausplattiert. Um Druck für die doppelt-homologe Rekombination, also den Verlust des Plasmids, anzulegen, wurde nun für zwei Tage bei 39 °C bis zur beginnenden Sporulation inkubiert. Die Sporen einer halben Platte wurden unter Zugabe von 500 µl Milli-Q mit einer Impföse abgekratzt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde eine 1:100.000-Verdünnung hergestellt und 100 µl auf eine LB-Agarplatte ausplattiert. Diese wurde zwei Tage bei 30 °C inkubiert bis die Kolonien deutlich und vereinzelt sichtbar waren. Die Platte wurde mit 1 ml X-Gluc-Lösung (1mg/ml) überschichtet, für 3 h im Kühlschrank gelagert und dann über Nacht bei 30 °C inkubiert. Weiße Kolonien wurden mit Hilfe eines Skalpells halbiert und je eine Hälfte auf eine MS-Agarplatte ohne Antibiotika und die andere auf eine MS-Agarplatte mit 50 µg/ml Apramycin übertragen. Dieser Schritt erwies sich als hilfreich, um auf falsch positive Kolonien zu testen. Klone, die Apramycin-sensitiv waren, wurden mittels Kolonie-PCR (3.2.4.3) auf den Verlust des Gens getestet und durch Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigt.

3.3 Elektrophoretische Methoden

3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten in einer Gelmatrix anhand ihrer Größe und Ladung durch das Anlegen einer Spannung. Dazu wurden aus Agarose und TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle eine 1% Lösung hergestellt, die in einer Gelkammer beim Abkühlen zu einem festen Gel aushärtet. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE-Puffer. DNA-Proben wurden mit dem *Gel Loading Dye (6x)* (NEB) oder dem *6x DNA Loading Dye* (Thermo Scientific) im Verhältnis 1:3 bis 1:5 vermischt und in die Taschen des Gels geladen, gesäumt vom *O'GeneRuler DNA Ladder Mix* als Größenstandard. Für 1-3 h wurde eine Spannung von 100-130 V angelegt um die DNA aufzutrennen. Das Gel wurde für 10-20 min in ein Ethidiumbromid-Bad (0,01% [m/V]) gelegt und der interkalierende Farbstoff anschließend mittels UV-Licht im *GelDoc XR+ System* angeregt und mit der Software *Image Lab 3.0.1* dokumentiert.

3.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine bzw. proteinhaltige Zellextrakte wurden mittels SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) anhand ihrer Größe aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit dem *Bolt LDS Sample Buffer (4x)* gemischt und bei 70 °C für 10 min erhitzt. Anschließend wurden sie in die Taschen eines gebrauchsfertigen *Bolt 12%* oder *12-14% Bis-Tris Plus Gels* von Invitrogen geladen und mit *Bolt MOPS SDS Running Buffer* bei 150 V gelelektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenstandards wurden der *Pierce Unstained Protein MW Marker*, die *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder*, der *NEB Color Prestained Protein Standard* oder der *SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard* genutzt. Anschließend wurde das Gel für bis zu 3 h in 10 ml *InstantBlue Protein Stain* der Firma Expedeon gefärbt, mit Wasser gewaschen und mit dem *GelDoc XR+ System* und der Software *Image Lab 3.0.1* dokumentiert. Wurde das Gel für Semidry Western Blots (3.4.2) benötigt, wurde es ungefärbt weiter verwendet.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Gewinnung von Protein-Zellextrakten aus Streptomycceten

Um mittels Western Blots Informationen über die Expression verschiedener Proteine in Streptomycceten-Stämmen zu erhalten, wurden Zellextrakte dieser Stämme hergestellt.

Die Stämme wurden in TSB-Medium, bei Bedarf unter antibiotischer Selektion, für 40-48 h bei 30 °C und 190 rpm inkubiert. Das Mycel wurde durch Zentrifugation abgetrennt, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 400 µl Lysispuffer resuspendiert. Die grobe Suspension wurde in ein 2 ml-Lysisröhrchen mit ca. 1 g Glaskügelchen (1:1-Gemisch mit 0,1 mm und 0,5 mm Durchmesser) überführt und die Zellen im Precellys (3 x 23 s bei 6.500 rpm, je 10 s Pause, drei Wiederholungen) aufgeschlossen. Durch Zentrifugation für 10 min bei 14.000 rpm und 4 °C mit der *Eppendorf Centrifuge 5418R* wurden Zellbestandteile und Glaskügelchen abgetrennt und der Überstand wurde in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Restliche unlösliche Bestandteile wurden durch erneute Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4 °C für 30 min abgetrennt. Anschließend wurde der Protein-Zellextrakt in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und nach Konzentrationsbestimmung mittels *NanoDrop* auf 5 oder 10 mg/ml eingestellt, mit einem Viertel des Volumens an *Bolt LDS Sample Buffer (4x)* versetzt, bei 70 °C für 10 min aufgeköcht und verwendet.

3.4.2 Semidry Western Blot

Die Methode des Semidry Western Blots nach Towbin (Towbin et al., 1979) macht die Identifizierung von Proteinen anhand ihrer spezifischen Interaktion mit Antikörpern möglich.

Proteine oder Proteingemische wurden zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen. Dazu wurde der *PerfectBlue Semi-Dry Blotter* genutzt, eine horizontale Apparatur mit Plattenelektroden zwischen die ein „Sandwich“ aus zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren, der für 10 min in Transferpuffer equilibrierten Nitrocellulose-Membran (*Amersham Hybond-ECL Nitrocellulose Blotting Membrane 0,45 µm* oder *Amersham Protan Premium 0,45 µm NC Nitrocellulose Blotting Membrane*, GE Healthcare), dem für 15 min in Transferpuffer equilibrierten SDS-PAGE-Gel (3.3.2) und weiteren zwei in Transferpuffer getränkten Whatman-Filterpapieren gelegt wurde. Durch Anlegen einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Gelfläche für 1-1,5 h wanderten die durch

gebundenes SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel Richtung Anode und wurden so auf die Membran übertragen.

Anschließend wurde die Membran für mindestens 2 h oder über Nacht in Blocking-Puffer inkubiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Danach wurde der Primär-Antikörper (polyklonale Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper, polyklonale Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper oder polyklonale Maus-anti-6xHistidin-Antikörper) in Blocking-Puffer im Verhältnis 1:1.000 verdünnt, auf die Membran gegeben und diese dann für 1 h schwenkend inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran drei Mal für 10 min mit PBST-Puffer gewaschen. Der Sekundär-Antikörper wurde im Verhältnis 1:5.000 (Sekundärer Ziegen-anti-Hase IgG, HRP-konjugiert) bzw. 1:2.000 (Sekundärer Hase-anti-Maus pAp, HRP-konjugiert) in Blocking-Puffer verdünnt, auf die Membran gegeben und diese erneut für 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 10 min mit PBST-Puffer wurde die Membran durch Ablaufenlassen vom PBST-Puffer befreit. 1-1,5 ml des *Amersham ECL Prime western blotting detection reagent* wurden auf die Membran pipettiert und diese für 5 min inkubiert. In dieser Zeit oxidiert die an den sekundären Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase (HRP, engl. *horseradish peroxidase*) das im Reagenz enthaltene Luminol, wodurch dieses durch Chemolumineszenz nachweisbar wird. Nach Ablaufenlassen des Reagenzes wurden Chemolumineszenzsignale mit dem *Molecular Imager ChemiDoc XRS System* angeregt und detektiert.

3.4.3 Proteinexpression

Zur Expression eines Proteins wurde zunächst das für dieses Protein codierende Gen in ein Expressionplasmid kloniert (3.2.5.1). Das fertige Konstrukt wurde in einen *E. coli*-Expressionsstamm (*E. coli* NiCo21) transformiert und mit den erhaltenen Transformanten wurde eine Übernachtskultur angeimpft, welche am nächsten Tag als Saatkultur für die eigentliche Expressionskultur (1 L LB-Medium mit den zur Selektion notwendigen Antibiotika in einem 5 L-Erlenmeyerkolben, angeimpft im Verhältnis 1:100) diente. Die Kultur wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 angezogen und mit 200 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 18 °C über Nacht für 18-20 h. Die Zellen wurden bei 4.700 rpm und 4 °C mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* pelletiert und bei -20 °C für mindestens 1 h oder über Nacht eingefroren, um die spätere Lyse zu erleichtern.

3.4.4 Aufreinigung von Proteinen mittels Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography

Zur Aufreinigung der exprimierten Proteine wurden die eingefrorenen Zellen zunächst auf Eis aufgetaut und in der nötigen Menge Lysispuffer resuspendiert. Die Suspension wurde in 15 ml-Aufschlussröhren mit ca. 5 g Glaskügelchen (1:1-Gemisch mit 0,1 mm und 0,5 mm Durchmesser) überführt und die Zellen mit dem *Precellys Evolution* aufgeschlossen (3 x 20 s bei 6.300 rpm, je 10 s Pause, vier Wiederholungen). Das Gemisch wurde in 50 ml-Röhren transferiert und 20 min bei 4.700 rpm und 4 °C mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* zentrifugiert, um Glaskügelchen und grobe Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wurde in eine neue 50 ml-Röhre überführt und 1 h bei 10.000 rpm und 4 °C mit der *Heraeus Multifuge X1R/X3R* zentrifugiert. Das Lysat wurde dann durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert und mit 200 µl einer Nickel-Nitrilotriessigsäure-Matrix (Ni-NTA) versetzt und über Nacht bei 4 °C leicht schwenkend inkubiert, um eine Komplexbildung zwischen Nickel-Ionen und den His₆-Tags der Proteine zu ermöglichen. Das Lysat-Matrix-Gemisch wurde dann in eine Polypropylensäule gefüllt, so dass

sich ein gleichmäßiges Bett aus Protein-geladener Ni-NTA-Matrix bilden konnte, während der Durchfluss aufgefangen wurde. Nach zwei Waschschrritten mit je 10 ml Waschpuffer 1 und 2 wurde mit 11-16 x 250-500 µl Elutionspuffer das exprimierte Protein von der Säule gewaschen. Von allen Fraktionen wurden Proben vorbereitet und über eine SDS-PAGE aufgetrennt (3.3.2), um den Reinigungserfolg zu überprüfen. Die Elutionsfraktionen mit dem Wunschprotein wurden vereint und mittels *Amicon Ultra-4* Zentrifugenfiltern mit einem Cutoff von 30 kDa (Merck) in Lagerpuffer umgepuffert und ihr Volumen eingengt bis auf ca. 200 µl. Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des *NanoDrops* mit der Methode nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Anschließend wurde das aufgereinigte Protein aliquotiert, mit Flüssigstickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.4.5 Substratspezifitäts-Assay für Adenylierungsdomänen

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, bestehen NRPS aus verschiedenen Modulen, wobei jedes Modul für den Einbau einer bestimmten Aminosäure verantwortlich ist und die Reihenfolge der Aminosäuren im Produkt abhängig von der Reihenfolge der Module ist. Jedes Modul besteht aus wenigstens drei Domänen: einer A-Domäne zur Substraterkennung, die die Aminosäure unter ATP-Verbrauch zu Aminoacyl-Adenylat aktiviert und diese kovalent als Thioester an den Co-Faktor 4'-Phosphopanthethin der PCP-Domäne bindet und schließlich eine C-Domäne, die die gebundenen Aminoacyl-Substrate an zwei benachbarten PCP-Domänen mit einer Peptidbindung verknüpft.

Liegt eine A-Domäne isoliert *in vitro* vor, kann die Substratspezifität in einem Assay getestet werden. Dabei kommt es zunächst zur Aktivierung einer spezifischen Aminosäure, bei der die A-Domäne unter Abspaltung von Diphosphat AMP aus ATP an die Aminosäure bindet. In der Zelle kann diese aktivierte Aminosäure nun an die PCP-Domäne gebunden werden. Im Assay greift stattdessen Hydroxylamin nukleophil an und unter Abspaltung von AMP bildet sich eine Hydroxamsäure, die durch Zugabe von Fe³⁺-Ionen einen farbigen Komplex bildet, dessen Absorption bei 540 nm mit einem UV-Vis-Spektrophotometer gemessen werden kann (Abbildung 14).

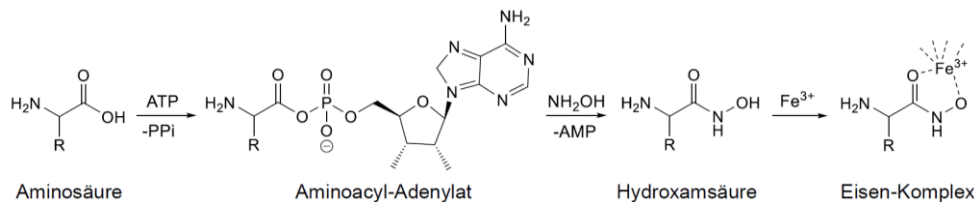


Abbildung 14: Beispielhafter Reaktionsverlauf der Umsetzung einer Aminosäure durch eine isolierte A-Domäne im Substratspezifitäts-Assay.

Es wurden 50 µl Ansätze mit einer Auswahl an Aminosäuren als Substrat, jeder Ansatz als Duplikat, pipettiert und für 15-25 h bei 30 °C im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle wurden Ansätze mit für 10 min bei 100 °C inaktiviertem Protein sowie ohne Substrat verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen sind in **Tabelle 29** gelistet.

Zum Beenden der Reaktion wurden je Ansatz 50 µl Stop-Lösung hinzugefügt und dann kurz mit dem Vortexer gemischt. Die Ansätze wurden bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert, um präzipitiertes Protein abzutrennen und in eine 96-Well-Platte überführt. Die Absorption bei 540 nm wurde dann sofort mit dem *infinite M200Pro* Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Bei der Auswertung wurde die relative Absorption bezogen auf die Kontrollreaktion mit inaktiviertem

Protein berechnet, und dann der höchste gemessene Wert als 100% angenommen. Die erhaltenen Werte wurden in einem Balkendiagramm dargestellt.

Bestandteil	Pipettiertes Volumen/Endkonzentration
50 mM Tris-HCl Puffer, pH 8	variierend/25 mM
300 mM MgCl ₂ in 25 mM Tris-HCl Puffer, pH 8	2,5 µl/15 mM
30 mM ATP in H ₂ O	3,75 µl/2,25 mM
2 M Hydroxylamin-HCl in 3,5 M NaOH, pH 8	3,75 µl/150 mM
150 mM Aminosäure in 25 mM Tris-HCl Puffer, pH 8	1,67 µl/5 mM
Milli-Q	variierend
Aufgereinigte A-Domäne in Lagerpuffer	variierend/40 µM

Tabelle 29: Volumina aller Bestandteile im Substratspezifitäts-Assay und die sich daraus ergebenden Endkonzentrationen.

3.5 Chromatographische Methoden

3.5.1 Adsorptionschromatographie zur Fraktionierung von Kulturüberständen

Zur Aufreinigung von ADEP1 aus dem Kulturüberstand einer *S. hawaiiensis*-Kultur wurde zunächst eine grobe Fraktionierung mittels Adsorptionschromatographie durchgeführt. Als stationäre Phase diente das polymere Adsorberharz *Amberlite XAD-2*, vorbereitet wie vom Hersteller beschrieben, in einer Chromatographiesäule mit Auslasshahn mit den Maßen 500 x 6 cm und einer Fritte der Porengröße Nr. 3. Nach dem Packen der Säule und dem Absetzen des Harzes wurde mit drei Säulenvolumina VE-Wasser gewaschen und die Säule bis zur weiteren Verwendung mit Aluminiumfolie abgedeckt.

Die Chromatographie wurde mit einer Flussgeschwindigkeit von ca. 1 L/h durchgeführt und pro Fraktion 500 ml Lösungsmittel verwendet. Zunächst wurde der filtrierte Kulturüberstand auf die Säule geladen und anschließend durch Elution mit einem Wasser-Methanol-Gradienten (100% H₂O, 20% MeOH, 50% MeOH, 100% MeOH) fraktioniert. Die Fraktionen wurden aufgefangen, die ADEP1 enthaltende Fraktion mit einem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und bis zur weiteren Verwendung bei 2-8 °C gelagert.

3.5.2 Semipräparative Aufreinigung von ADEP1

Um reines ADEP1 aus dem durch Adsorptionschromatographie erhaltenen Rohextrakt zu gewinnen, wurde dieser im kleinstmöglichen Volumen Methanol mit HPLC-Qualität gelöst (ca. 3 ml), Schwebstoffe bei 14.000 rpm für 10 min in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen mit der *Eppendorf Centrifuge 5418R* abzentrifugiert und der gelöste Rohextrakt in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt.

Zur semipräparativen Aufreinigung mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurde in Düsseldorf eine HPLC der *1100 Series* der Firma Agilent mit einer Nucleodur C18 HTec Umkehrphasen-Octadecylsilan-Säule (5 µm, 250 x 10 mm) (Macherey-Nagel) verwendet sowie ein Wasser (A)/Methanol (B)-Gradient, wobei beide Lösungsmittel mit 0,1% Ameisensäure versetzt wurden (0-5 min 0-75% B, 5-35 min 75-100% B, 35-37 min 100% B, 37-40 min 100-0% B, 40-42 min 0% B). Die Flussrate betrug 3,5 ml/min, das Injektionsvolumen 300 µl und die Detektion erfolgte mit einem Dioden-Array-Detektor (DAD) bei 266 und 298 nm.

In Tübingen wurde eine Reprosil-Pur Basic C18-Säule (10 µm, 250 x 20 mm) (Dr. Maisch GmbH) verwendet sowie der folgende Gradient: 0-20 min, 70-100% Methanol. Die Flussrate betrug 24 ml/min, das Injektionsvolumen 1,5 ml und die Detektion erfolgte mit einem P314 2-Kanal UV-Vis-Detektor (VWR) sowie einem Abimed BD40 2-Kanal Flachbrettschreiber bei 266 und 298 nm.

Der gewünschte Peak aus mehreren Läufen wurde in einer 15 ml-Röhre gesammelt und 10 µl zur Überprüfung mittels LCMS entnommen. Der Rest wurde mittels Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingengt und im kleinstmöglichen Volumen Methanol mit HPLC-Qualität gelöst. In lyophilisierte und gewogene 2 ml-Reaktionsgefäße wurden Aliquots von 500 µl pipettiert und diese entweder lyophilisiert oder im *Uni Vapo 100H* Vakuum-Konzentrator bis zur Trockene im Vakuum bei 40 °C eingengt. Durch erneutes Wiegen konnte aus der Differenz der Gewichte der Reaktionsgefäße die Masse des aufgereinigten ADEP1 bestimmt werden. Die Reaktionsgefäße wurden mit Parafilm verschlossen sowie mit Aluminiumfolie umwickelt, in 50 ml-Reaktionsgefäßen mit Silica Gel Orange verpackt und bei -80 °C gelagert.

3.5.3 LCMS-Analyse von ADEP1

Identität und Reinheit von ADEP1 wurden mittels analytischer HPLC und LCMS-Analysen bestätigt. HPLC-Analysen wurden in Düsseldorf mit einem *Dionex P580 System* gekoppelt mit einem Photodioden-Array-Detektor (UVD340S) routinemäßig bei 235, 254, 280 und 340 nm durchgeführt. Es wurde eine *Eurosphere-10 C18* Trennsäule (125 x 4 mm) der Firma Knauer und der folgende Gradient aus Wasser mit 0,1% Ameisensäure (A) und Methanol (B) genutzt: 0-5 min 10% B, 5-35 min 10-100% B, 35-45 min 100% B. Massenspektren wurden mit einer *LCMS HPP1100 Agilent Finnigan LCQ Deca XP Thermoquest* aufgenommen, wobei die Ionisierung der Proben über Elektrospray-Ionisation (ESI) erfolgte. Die Massen der gewünschten Peaks wurden in negativer und positiver Ionisierung ausgewertet und dies mit dem Programm *Symix* dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von *Streptomyces hawaiiensis* NRRL 15010

4.1.1 Allgemeine Beobachtungen

S. hawaiiensis NRRL 15010 wurde bereits 1985 als Produzent einer Reihe bioaktiver Acyldepsipeptid-Verbindungen beschrieben (Michel and Kastner, 1985) und ist seit Auslaufen des Patents frei über die ARS Culture Collection (NRRL) zugänglich. Der Stamm produziert auf verschiedenen Agar- und Flüssigmedien ein braunes, melanoides Pigment und bildet auf MS-Agar eine dichte, weiße Sporenschicht (**Abbildung 15**). Er wurde bei seiner ersten Veröffentlichung aufgrund des ähnlichen Phänotyps zu *S. hawaiiensis* ATCC 12236 der selben Spezies zugeordnet, allerdings wurde dies nie phylogenetisch überprüft.

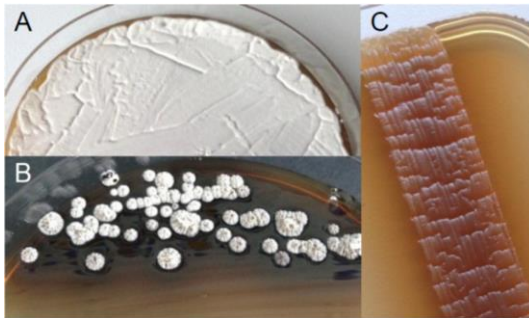


Abbildung 15: A) Sporulation von *S. hawaiiensis* auf MS-Agar nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C; B) Einzelkolonien und Pigmentproduktion auf LB-Agar; C) Pigmentproduktion auf MH-Agar nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C.

S. hawaiiensis ist, wie bereits erwähnt, Produzent von mindestens sechs verschiedenen ADEP-Derivaten. Die Fähigkeit zur ADEP-Produktion in verschiedenen Medien wurde getestet, indem je 10 ml des jeweiligen Mediums mit 5 µl einer dichten Sporensuspension von *S. hawaiiensis* beimpft und Kulturüberstände nach 40 h in Bioassays gegen *B. subtilis* 168 trpC2 Wildtyp und eine ADEP-resistente $\Delta clpP$ -Mutante getestet wurden (**3.1.3.2**). Wie in **Abbildung 16** ersichtlich wird, produzierte *S. hawaiiensis* in allen mit dieser Methode getesteten Medien deutlich detektierbare ADEP-Konzentrationen.

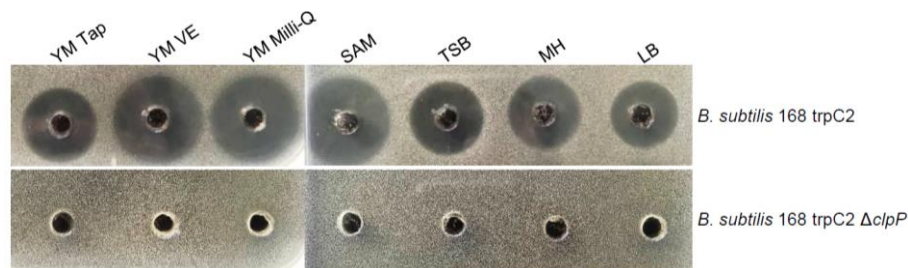


Abbildung 16: Bioassay mit *S. hawaiiensis*-Kulturüberständen mit verschiedenen Medien, getestet gegen *B. subtilis* 168 trpC2 und eine ADEP-resistente $\Delta clpP$ -Mutante. Je 50 µl des Überstandes wurden in Löcher in MH-Softagarplatten mit dem jeweiligen Indikatorstamm pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

4.1.2 Wachstumskurven und Charakterisierung der ADEP-Produktion

Um die ADEP-Produktion in Relation zum Wachstum zu charakterisieren, wurden zwei 5-Liter-Erlenmeyer-Kolben mit je 1 L YM-Milli-Q-Medium im Abstand von 12 Stunden mit 5×10^7 Sporen beimpft. Über einen Zeitraum von 7 Tagen wurden Proben zur Bestimmung der Trockenmasse gezogen, wie in Kapitel **3.1.2.2** beschrieben. Außerdem wurde zu jedem Zeitpunkt eine Probe des Kulturüberstands eingefroren und nach Beenden der Probennahme je 70 µl gegen *B. subtilis* im Bioassay getestet (**3.1.3.2**). Die Hemmhofdurchmesser dienten als Maß für den ADEP-Gehalt.

Für Proben ohne sichtbaren Hemmhof wurde der Durchmesser des gestanzten Lochs von 0,6 mm angegeben (Abbildung 17 und Abbildung 18).

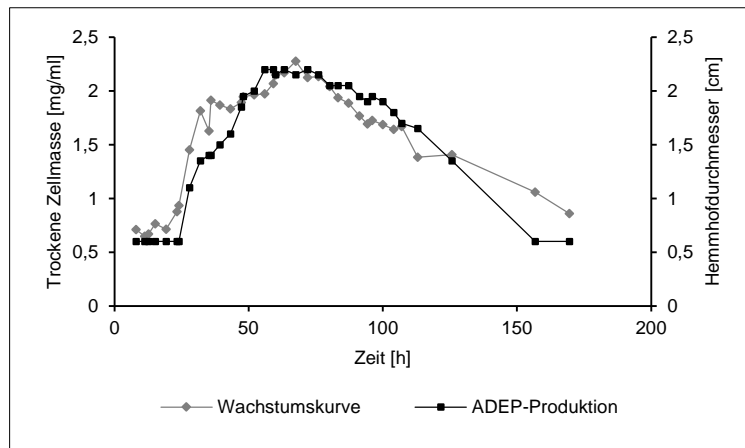


Abbildung 17: Wachstumskurve von *S. hawaiiensis* in YM-Milli-Q-Medium, ermittelt durch die Bestimmung der trockenen Zellmasse in 10 ml Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten. Die ADEP-Produktion an den entsprechenden Zeitpunkten wurde mittels eines Bioassays anhand der Wachstumsinhibierung von *B. subtilis* 168 durch ADEPs im Kulturüberstand ermittelt (Abbildung 18). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei biologischen Replikaten.

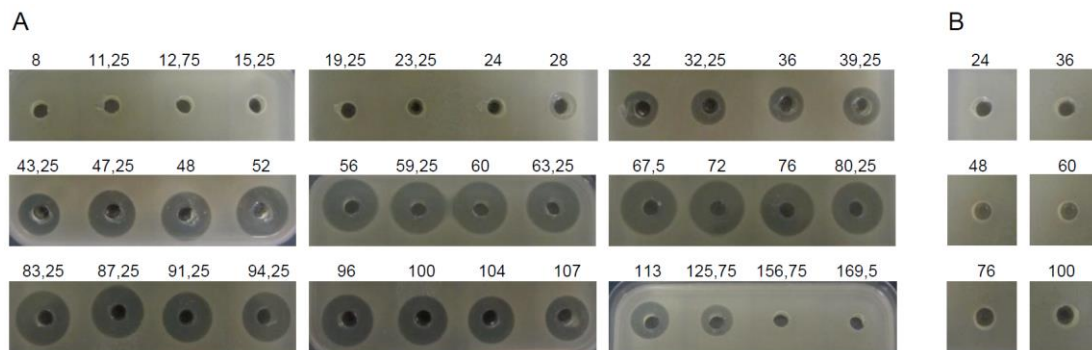


Abbildung 18: Bioassay mit *S. hawaiiensis*-Kulturüberständen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums (Angaben in h) gegen A) *B. subtilis* 168 trpC2 und B) *B. subtilis* 168 trpC2 Δ clpP als ADEP-insensitive Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei biologischen Replikaten.

Detektierbare Mengen ADEP wurden unter den gegebenen Bedingungen erstmals in der exponentiellen Wachstumsphase produziert (28 h). Zwischen 50 und 80 h, also im Bereich der stationären Phase (Abbildung 17), war der ADEP-Gehalt im Kulturüberstand maximal, so dass Kulturen für die ADEP-Aufreinigung basierend auf diesem Ergebnis nach 55-75 h Wachstum abgeerntet wurden.

Während der laufenden Arbeiten für diese Dissertation wurden aufgrund eines Umzugs die Laborräume gewechselt. In den neuen Laboren in Tübingen wurde daher getestet, ob die veränderte Umgebung Einfluss auf die ADEP-Produktion hat. Um in den neuen Laboren einen möglichst vergleichbaren Verlauf der ADEP-Produktion zu erzielen, wurden verschiedene Bedingungen getestet. Neben YM-Milli-Q-Medium im normalen Erlenmeyer-Kolben wurden außerdem YM-Tap-Medium im normalen sowie im Schikane-Erlenmeyer-Kolben getestet. Alle weiteren Parameter wurden gleich gehalten wie zuvor in Düsseldorf.

Der ADEP-Gehalt der Proben mit YM-Tap-Medium war im Bioassay, bezogen auf die Hemmhofgröße zum jeweiligen Zeitpunkt, denen aus Düsseldorf am ähnlichsten (vergleiche Abbildung 18 und Abbildung 19), so dass diese Bedingungen für die ADEP-Produktion in Tübingen als Standardbedingungen ausgewählt wurden.

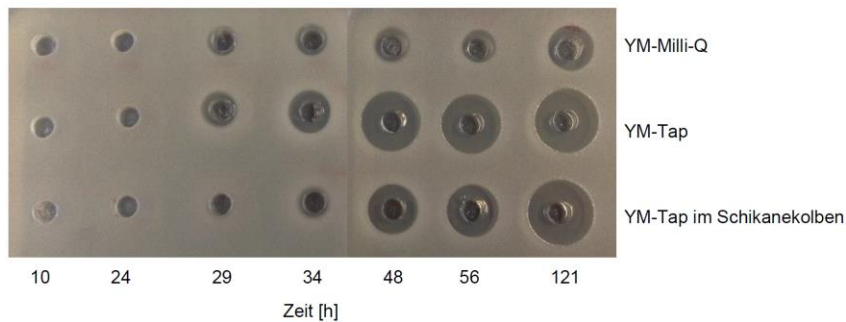


Abbildung 19: Bioassay mit *S. hawaiiensis*-Kulturüberständen nach Anzucht in verschiedenen Medien zu verschiedenen Zeitpunkten, getestet gegen *B. subtilis* 168 trpC2.

4.1.3 DNA-Transfer in *S. hawaiiensis*

Im Verlauf dieser Doktorarbeit stellte sich heraus, dass *S. hawaiiensis* im Vergleich zu anderen *Streptomyces*-Stämmen sehr schlecht zugänglich für genetische Modifizierungen ist. Es wurden unterschiedliche Methoden und Bedingungen getestet, die im Folgenden erläutert werden.

4.1.3.1 Konjugation

Zunächst wurde die Konjugation des integrativen Testplasmids pRM4.3 in *S. hawaiiensis* mittels *E. coli* ET12567 pUB307 unter Standardbedingungen getestet (3.2.5.6), die jedoch nicht erfolgreich war.

Mit dem Konjugationsstamm *E. coli* S17-1 konnten schließlich einzelne Transkonjuganten generiert werden. Durch Verwenden von 20 μ l einer dichten Sporensuspension (im Vergleich zu 2-5 μ l bei der Konjugation von *S. lividans* TK 24) konnte der Transformationserfolg bereits wesentlich verbessert werden. Um die Effizienz weiter zu steigern, wurden mehrere Parameter variiert. Da Mg^{2+} -Ionen einen positiven Einfluss auf den Konjugationserfolg haben können (Du et al., 2012), wurden verschiedene Konzentrationen getestet. Die $MgCl_2$ -Konzentration im MS-Medium wurde zwischen 0 und 10 mM variiert. Zwar unterschied sich die Effizienz der Konjugation nicht deutlich, jedoch war das Wachstum der Kolonien ohne $MgCl_2$ stark verlangsamt und mit 10 mM $MgCl_2$ etwas verlangsamt. So wurden 2,5 mM $MgCl_2$ als Standardkonzentration für die Konjugation von *S. hawaiiensis* mit *E. coli* S17-1 ausgewählt (Abbildung 20).

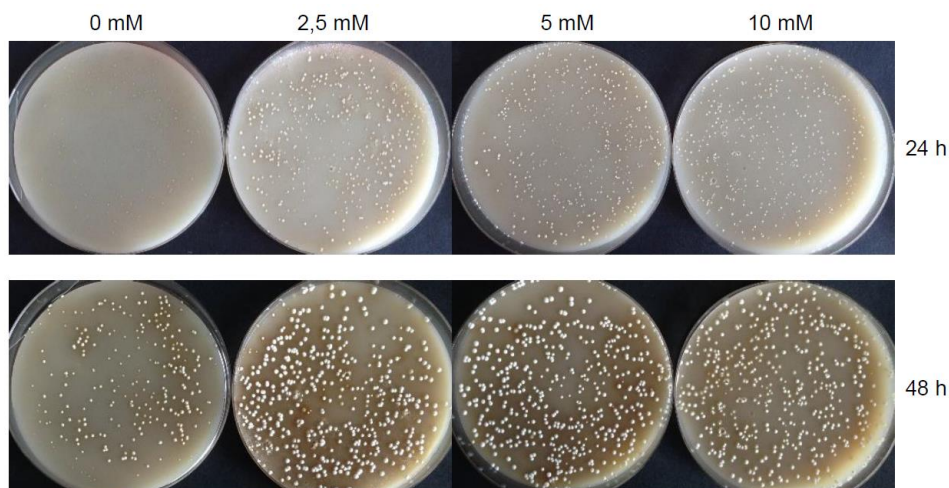


Abbildung 20: Testkonjugation zwischen *E. coli* S17-1 pRM4.3 und *S. hawaiiensis* auf MS-Agar mit verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen, wie in der Abbildung angegeben. Die Platten wurden nach 24 h (oben) bzw. 48 h (unten) nach Überschichten bezüglich des Konjugationserfolgs bewertet.

Des Weiteren wurde die Zeit zwischen Hitzeschock und Ausplattieren variiert. Es zeigte sich, dass eine verlängerte Inkubation der *S. hawaiiensis*-Sporen bei RT nach dem Hitzeschock zu einer erhöhten Effizienz führt. So wurde diese in späteren Versuchen mindestens für 3 h durchgeführt. Außerdem wurde das Protokoll zur Herstellung chemo-kompetenter Zellen des Konjugations-Stammes *E. coli* S17-1 variiert. Die Zellen wurden sowohl nach dem Standardprotokoll (3.2.5.4) als auch mittels der Calciumchlorid-Methode (3.2.5.5) kompetent gemacht. Hier zeigte sich, dass die Anzahl der Transkonjuganten bei Konjugation mit Zellen, die mittels Standardprotokoll kompetent wurden, höher war, obwohl die zur Konjugation eingesetzten *E. coli*-Suspensionen beide auf die gleiche OD₆₀₀ eingestellt wurden (Abbildung 21).

Auf diesen Ergebnissen aufbauend wurde im Rahmen verschiedener Experimentreihen versucht, verschiedene Plasmide in *S. hawaiiensis* zu konjugieren. Die Plasmide pRM4.3 (Abbildung 20 und Abbildung 21), pIJ6902 und pIJ10257 (4.4.2) wurden erfolgreich eingebracht, wobei alle ins Genom integrieren (Φ C31 *attP* bei pRM4.3 und pIJ6902, Φ BT1 *attP* bei pIJ10257). Während die Integration über die Φ BT1 *attP*-Stelle den Phänotyp nicht veränderte, wirkte sich die Integration über die Φ C31 *attP*-Stelle negativ auf Sporulation und Wachstum aus (Abbildung 22). Daher sind die gängigsten integrativen Streptomyceten-Plasmide für *S. hawaiiensis* ungeeignet.

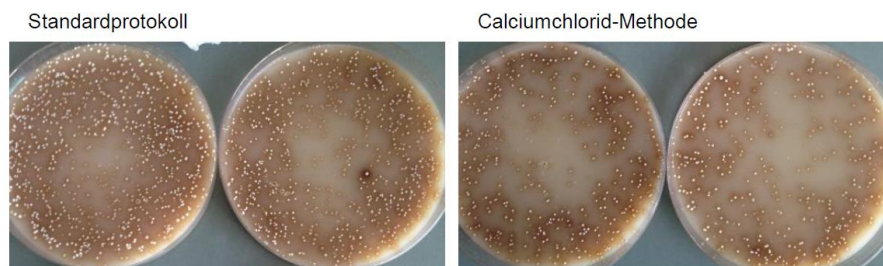


Abbildung 21: Testkonjugation zwischen *S. hawaiiensis* und zwei verschiedenen *E. coli* S17-1 pRM4.3-Klonen, die mittels Standardprotokoll oder durch die Calciumchlorid-Methode chemo-kompetent wurden. Gezeigt sind jeweils zwei biologische Replikate.

Neben integrativen Plasmiden wurde auch versucht, nicht-integrative Plasmide bzw. Plasmide für Gen-Knockouts mit homologen Flanken in *S. hawaiiensis* einzubringen. So wurden das nicht integrative Plasmid pA18 mittels *E. coli* S17-1 konjugiert, wie auch verschiedenste Konstrukte zur homologen Rekombination basierend auf pGusA21 und pGM-GUS-Xba (4.4.2; Vektorkarten in 6.2.6 und 6.2.8). In keinem Fall wurden Transkonjuganten erhalten.

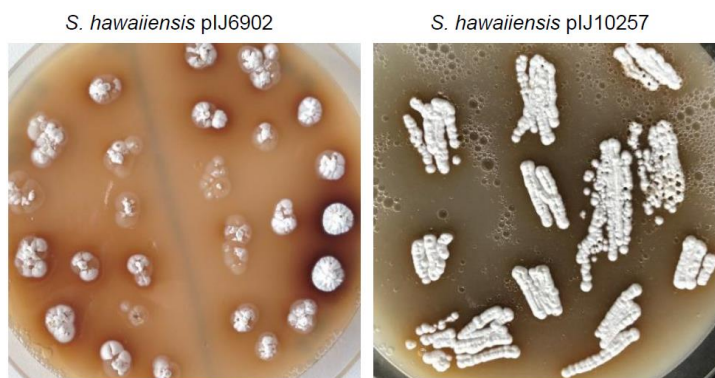


Abbildung 22: Phänotyp verschiedener *S. hawaiiensis*-Mutanten nach der Konjugation und Integration verschiedener Plasmide. Bei *S. hawaiiensis* pIJ6902 verursacht die Integration des Plasmids einen unregelmäßigen Phänotyp mit Sporulations- und Wachstumsdefizit. *S. hawaiiensis* pIJ10257 zeigt durch die Integration des Plasmids keine Veränderung des Phänotyps.

4.1.3.2 Protoplasten-Transformation

In der Hoffnung auch nicht integrative Plasmide transformieren zu können, wurde versucht, parallel mit *S. lividans* TK24 als Kontrolle, das integrative Plasmid pRM4.3 und das nicht-integrative Plasmid pA18 über eine Protoplasten-Transformation in *S. hawaiiensis* einzubringen (3.2.5.7). Während für *S. lividans* TK24 für beide Plasmide Klone erhalten wurden (mit wesentlich geringerer Effizienz als bei der Konjugation), war die Transformation für *S. hawaiiensis* nicht erfolgreich. Demnach konnten in *S. hawaiiensis* mit den getesteten Methoden im Rahmen dieser Arbeit keine Knockouts erzeugt werden.

4.2 Aufreinigung von ADEP1 aus dem Kulturüberstand

Um ADEP1 als Reinsubstanz für verschiedenste Experimente zur Verfügung zu haben, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein robustes Aufreinigungsverfahren entwickelt werden.

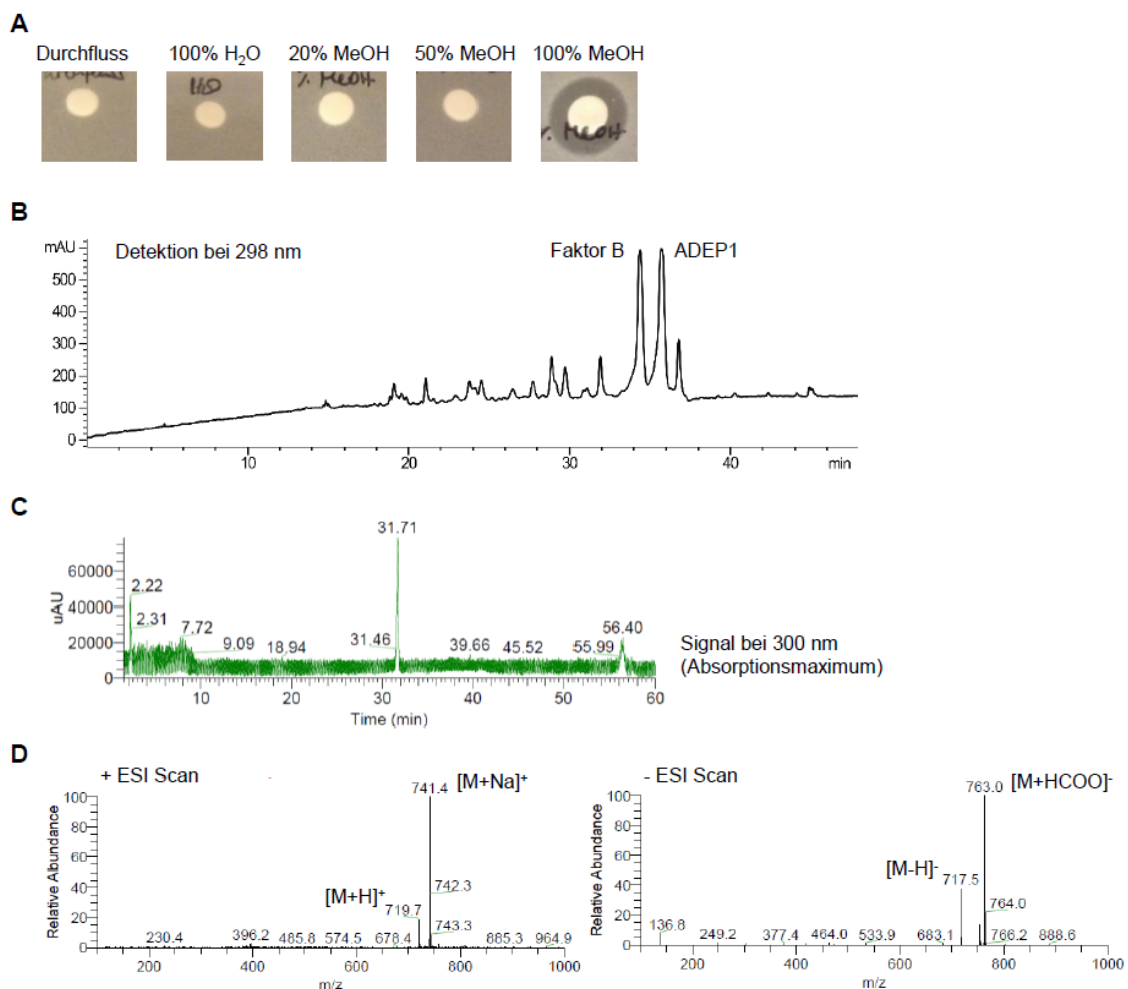


Abbildung 23: Aufreinigung von ADEP1 aus dem Kulturüberstand von *S. hawaiiensis* A) Überprüfung der nach der Adsorptionschromatographie erhaltenen Fraktionen auf ihren ADEP-Gehalt. Bioassay zum Test von je 20 μ l der einzelnen Fraktionen (Wasser, 20% MeOH, 50% MeOH, 100% MeOH) gegen *B. subtilis* 168. B) Analytische HPLC des gelösten ADEP-haltigen Rohextrakts mit deutlichen Signalen für Faktor B und ADEP1 bei 298 nm. Überprüfung des aufgereinigten ADEP1 auf Reinheit mittels einer LCMS-Analyse: C) Detektion mit einem Diodenarray-Detektor zeigte einen präzisen Peak bei 300 nm und D) ESI-Scans bestätigten das m/z-Verhältnis von ADEP1 (718,84) im positiven (links) wie negativen Ionisierungsmodus (rechts).

Dazu wurde *S. hawaiiensis* in drei 5 L-Erlenmeyerkolben mit je 1 L YM-Tap-Medium und einem Inokulum von mindestens 5×10^7 Sporen bei 30 °C und 180 rpm angezogen. Abgeleitet aus der ADEP-Produktionskurve (4.1.2) wurde die Inkubation zum Zeitpunkt des höchsten ADEP-Gehalts nach 55-75 h beendet. Die ADEP1-Konzentration in der Kultur wurde nach 56 h mittels HPLC-

Analyse und durch Bezug auf einen ADEP1-Standard aus der *Area under the Curve* (AUC), also der Fläche des Peaks, ermittelt und betrug zwischen 9 und 10 mg/L. Die Kulturen wurden durch Filterpapiere MN 615 der Firma Macherey-Nagel filtriert, um das Mycel abzutrennen und der Kulturüberstand wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben mittels Adsorptionschromatographie fraktioniert. Alle Fraktionen wurden auf ihren ADEP-Gehalt in einem Bioassay (3.1.3.1) (Abbildung 23A) getestet und die ADEP-enhaltende Fraktion (Elution mit 100% Methanol) wurde mit dem Rotationsverdampfer bis zur Trockene eingeeengt und bei -20 °C gelagert. Zur weiteren Aufreinigung wurde der Rohextrakt bei RT aufgetaut und anschließend wie in Kapitel 3.5.2 beschrieben gelöst. Mittels analytischer HPLC mit 100 µl dieser Lösung konnten bei 298 nm (Absorptionsmaximum von ADEP1) zwei starke Signale detektiert werden (Abbildung 23B), welche bei einer LCMS-Analyse ADEP1 und Faktor B zugeordnet werden konnten. Die semipräparative Aufreinigung wurde wie bereits beschrieben durchgeführt (3.5.2) und per LCMS überprüft (3.5.3) (Abbildung 23C und D). Aus 3 L Kultur konnten rund 10 mg reines ADEP1 aufgereinigt werden, so dass rund ein Drittel des im Kulturüberstand enthaltenen ADEP1 isoliert werden konnte.

4.3 Sensitivität von Streptomyceten gegen verschiedene ADEP-Derivate

Das Protokoll zur Aufreinigung von ADEP1 bot des Weiteren die Möglichkeit auch die zweite Hauptkomponente des A54556-Extrakts, Faktor B, mit aufzureinigen. So standen im Rahmen dieser Arbeit die natürlichen ADEP-Derivate ADEP1 und Faktor B, sowie die synthetischen Derivate ADEP2, ADEP4 und ADEP7 für Sensitivitätstests zur Verfügung.

In verschiedenen Studien wurde für ADEP4 eine besonders hohe Potenz gegen verschiedene Gram-positive Bakterien einschließlich *S. aureus* gezeigt (Brötz-Oesterhelt et al., 2005; Conlon et al., 2013). Gegen die ebenfalls Gram-positiven Mykobakterien war ADEP2 das aktivste ADEP-Derivat (Famulla et al., 2016; Ollinger et al., 2012). Deshalb sollten alle zur Verfügung stehenden ADEP-Derivate gegen *S. lividans* TK24 und auch den ADEP-resistenten Produzentenstamm *S. hawaiiensis* getestet werden.

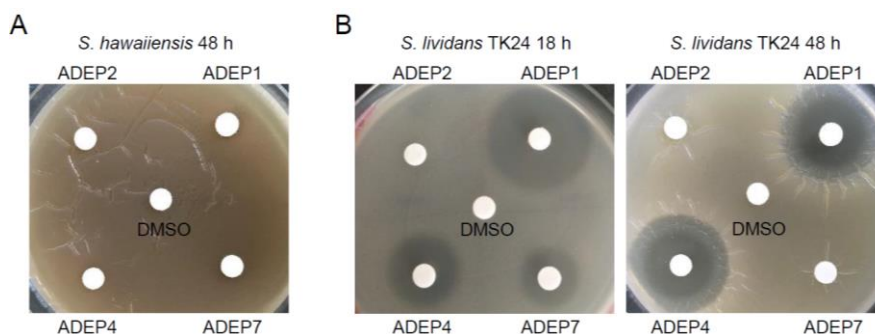


Abbildung 24: Bioassay zum Test der antibiotischen Potenz von je 20 µg ADEP1, ADEP2, ADEP4 und ADEP7 gegen *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24.

In Bioassays mit 20 µg der verschiedenen ADEPs war *S. hawaiiensis* gegen alle ADEP-Derivate in der getesteten Konzentration resistent (Abbildung 24A). Gegen *S. lividans* TK24 war der Naturstoff ADEP1 das potenteste Derivat (Abbildung 24B). ADEP4 war das aktivste synthetische Derivat, wohingegen die eingesetzte Menge von ADEP2 keinerlei Aktivität gegen *S. lividans* TK24 aufwies. Für ADEP7 war nach den ersten 24 h ein kleiner Hemmhof sichtbar, der aber während der weiteren Inkubation vollständig zuwuchs. Somit scheint die Pipecolinsäureeinheit, welche sowohl in ADEP2 als auch in ADEP4 vorkommt, toleriert zu werden, wohingegen die

Cyclohexylseitenkette in ADEP2 die antibakterielle Potenz gegen *Streptomyces* stark reduziert. Die Angleichung des Effekts von ADEP1 und ADEP4 nach 48 h kann möglicherweise auf die größere Hydrolyseempfindlichkeit von ADEP1 im Vergleich zu ADEP4 zurückgeführt werden. In bisherigen Publikationen war ADEP1 den synthetischen Derivaten nur in Gram-negativen Bakterien, wie in Wolbachien, überlegen (Schiefer et al., 2013). Außerdem aktivierte ADEP1 *E. coli* ClpP *in vitro* am stärksten zum FITC-Casein-Abbau (Nadine Silber, persönliche Mitteilung). Für Faktor B wurde, abhängig vom getesteten Organismus, eine vier- bis achtfach geringere Aktivität im MHK als für ADEP1 publiziert (Goodreid et al., 2014; Hinzen et al., 2006). Diese wesentlich geringere Potenz konnte auch im Bioassay gegen *S. lividans* TK24 detektiert werden. Mit 20 µg Faktor B wurde lediglich eine minimale Inhibierung sichtbar, während die Hemmhofgröße bei ADEP1 mit 20 µg bereits durch die Diffusion limitiert war (**Abbildung 25**). Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für alle weiteren ADEP-Experimente mit Streptomyceten ADEP1 verwendet.

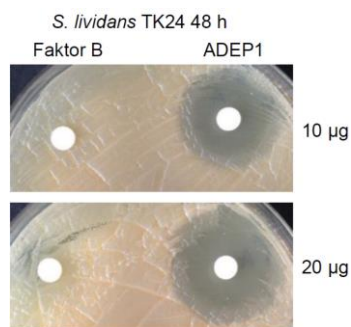


Abbildung 25: Bioassay zum Test der antibiotischen Potenz von je 10 und 20 µg Faktor B und ADEP1 gegen *S. lividans* TK24.

4.4 Das ADEP-Biosynthesegencluster

Das bisher unbekannte Biosynthesegencluster für ADEP (ADEP-BGC) sollte im Produzentenstamm *S. hawaiiensis* im Rahmen dieser Arbeit identifiziert und analysiert werden. Abgeleitet von der ADEP1-Primärstruktur wurde ein Cluster mit drei verschiedenen Enzymgruppen erwartet: einer NRPS zur Synthese des peptidischen Rückgrats, einer PKS zur Synthese der C8-Trienseitenkette sowie Enzyme zur Bereitstellung der nicht-proteinogenen Aminosäure (2*S*,4*R*)-4-Methylprolin (MePro).

4.4.1 *In silico*-Analyse der Gencluster-Sequenz

Eine vorläufige Gencluster-Sequenz wurde von Yi-Qiang Cheng (Texas) bereitgestellt und nach erneuter Genomsequenzierung überprüft und berichtigt.

Durch die Sequenzanalyse mittels der Software Tools antiSMASH (Weber et al., 2015) und BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) konnte ein potentielles Acyldepsipeptid (*ade*)-BGC mit 12 offenen Leserahmen (ORFs von engl. *open reading frames*) annotiert werden (**Tabelle 30, Abbildung 26A**) und durch die bekannte ADEP1-Primärstruktur auf das Vorhandensein der notwendigen Biosyntheseeinheiten für die Produktion dieses Sekundärmetabolits überprüft werden.

Das Cluster weist zwei NRPS-Gene (*adeG* und *adeH*) mit vier bzw. zwei Modulen zum Einbau von Aminosäuren und höchstwahrscheinlich der Synthese des ADEP-Peptidrückgrats auf. Auf diese folgt *adel*, welches für ein MbtH-ähnliches Protein codiert.

ORF	Gen in bp (Start-Stop)	Protein in AS	Putative Funktion	Bester BLAST Hit	GeneBank Nummer	Ähnlichstes Homolog in	e-Value	Identität/Ähnlichkeit (%)
<i>orf1</i>	1167 (1167-1)	388	Regulatorische Komponente	Hypothetisches Protein	WP_051437315.1	<i>Streptomyces</i> sp. CNR698	2e-133	57/68
<i>orf2</i>	522 (1675-1154)	173	Regulatorische Komponente	Regulatorische Komponente	AKJ14862.1	<i>Streptomyces incarnatus</i>	1e-61	60/76
<i>orf3</i>	507 (2421-1915)	168	XRE family-Transkriptions-Regulator	XRE family-Transkriptions-Regulator	WP_063777586.1	<i>Streptomyces</i> sp. 769	1e-65	67/79
<i>adeA</i>	825 (3097-3921)	274	Leucin-Hydroxylase	Leucine-Hydroxylase	AKC91859.1	<i>Streptomyces muensis</i>	1e-110	57/73
<i>adeB</i>	1116 (3918-5033)	371	Alkohol-Dehydrogenase	Alkohol-Dehydrogenase	AKC91860.1	<i>Streptomyces muensis</i>	0.0	69/81
<i>adeC</i>	261 (5320-5922)	87	Acyl-Carrier-Protein	Acyl-Carrier-Protein	WP_069777941.1	<i>Streptomyces puniscabiei</i>	7e-30	68/84
<i>adeD</i>	1263 (5962-7224)	420	Ketosynthase α	3-Oxoacyl-ACP-Synthase	WP_030008531.1	<i>Streptomyces lavandulae</i>	0.0	74/86
<i>adeE</i>	1122 (7221-8342)	373	Ketosynthase β	3-Oxoacyl-ACP-Synthase	WP_093663356.1	<i>Streptomyces radiopugnans</i>	3e-119	53/68
<i>adeF</i>	786 (8339-9124)	261	Ketoreduktase	3-Oxoacyl-ACP-Reduktase	WP_069171846.1	<i>Streptomyces griseus</i>	7e-119	69/81
<i>adeG</i>	14010 (9160-23169)	4669	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase	WP_100570125.1	<i>Streptomyces</i> sp. CB01373	0.0	51/62
<i>adeH</i>	7143 (23166-30308)	2380	Nicht-ribosomale Peptidsynthetase	Zyklisches Nukleotid-Bindeprotein	BAM86977.1	<i>Bradyrhizobium oligotrophicum</i> S58	0.0	54/68
<i>adel</i>	237 (30339-30575)	78	Mbth-ähnliches Protein	Mbth-ähnliches Protein	WP_07376855.1	<i>Streptomyces</i> sp. CB02923	5e-29	62/82
<i>orfA</i>	687 (30694-31380)	228	Transposase	Transposase	KUJ67759.1	<i>Streptomyces albus</i> subsp. <i>albus</i>	8e-61	87/93
<i>orfB</i>	270 (31511-31780)	89	Hypothetisches Protein	Keine Ähnlichkeit gefunden				
<i>orfC</i>	579 (32446-31868)	192	Transposase	ISL3 family-Transposase	WP_0594141923.1	<i>Streptomyces azureus</i>	8e-102	85/86
<i>orfD</i>	516 (32816-33331)	171	Transposase	Transposase	WP_093459809.1	<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	2e-68	94/95
<i>orfE</i>	306 (33842-34147)	101	Transposase	Transposase	WP_093459809.1	<i>Streptomyces melanosporofaciens</i>	9e-39	70/71
<i>orfF</i>	606 (34773-34168)	201	Hypothetical protein	Keine Ähnlichkeit gefunden				
<i>clp_{ADEP}</i>	621 (35417-36037)	206	ATP-abhängige Clp Protease Proteolytische Untereinheit	ATP-abhängige Clp Protease Proteolytische Untereinheit	WP_046088935.1	<i>Streptomyces antioxidans</i>	2e-84	74/83

Tabelle 30: Abgeleitete Funktionen der putativen ORFs im *ade*-BGC.

Mbth-ähnliche Proteine sind häufig mit NRPS assoziiert, da sie chaperonartig an NRPS-Proteine binden und die Adenylierungsreaktion stimulieren, so dass die Synthese von Sekundärmetaboliten optimal ablaufen kann (Baltz, 2011; Felnagle et al., 2010; Herbst et al., 2013). Upstream der NRPS-Gene befinden sich vier Gene für ein Acyl-Carrier-Protein (*adeC*), zwei

Ketosynthase-Untereinheiten α (*adeD*) und β (*adeE*) sowie eine Ketoreduktase (*adeF*), die eine putative Typ-II-PKS bilden, welche wahrscheinlich für die Biosynthese der Trienseitenkette verantwortlich ist. Des Weiteren liegen eine Leucin-Hydroxylase (*adeA*) und eine Alkohol-Dehydrogenase (*adeB*) vor, die für die Bereitstellung von MePro notwendig sein könnten. Bei *orf1* und *orf2* handelt es sich möglicherweise um regulatorische Komponenten, die in einem bicistronischen Operon upstream der Biosynthesegene liegen. *Orf3* zeigte höchste Ähnlichkeit mit Transkriptionsregulatoren der Xenobiotic response element (XRE)-Familie.

Das Cluster ist umgeben von Insertions-Sequenz-(IS)-Element-Fragmenten. Solche Regionen beweglicher Elemente sind üblicherweise Bereiche, die die Einführung von BGCs durch horizontalen Gentransfer anzeigen. In der Regel liegen die Biosynthesegene dazu vollständig geclustert inklusive eines Resistenzfaktors vor (Keller et al., 2010; Mousa and Raizada, 2015). Letzteres ist beim *ade*-BGC nicht der Fall. Allerdings wurde 4,8 kb downstream, abgetrennt durch Transposasen und hypothetische Proteine (*orfA-orfF*), ein *clpP*-Gen gefunden (*clpP_{ADEP}*), das im Rahmen dieser Arbeit auf seine Fähigkeiten als Resistenzfaktor untersucht werden sollte (4.5.3).

4.4.1.1 Biosynthese des Depsipeptidrings durch zwei NRPS

Die Biosynthese des Depsipeptidrings mit den sechs Aminosäuren L-Phenylalanin (Phe), L-Serin (Ser), L-Prolin (Pro), L-Alanin (Ala), Ala und entweder MePro in ADEP1 oder Pro in Faktor B wird höchstwahrscheinlich durch die beiden von *adeG* und *adeH* codierten NRPS katalysiert (Abbildung 26).

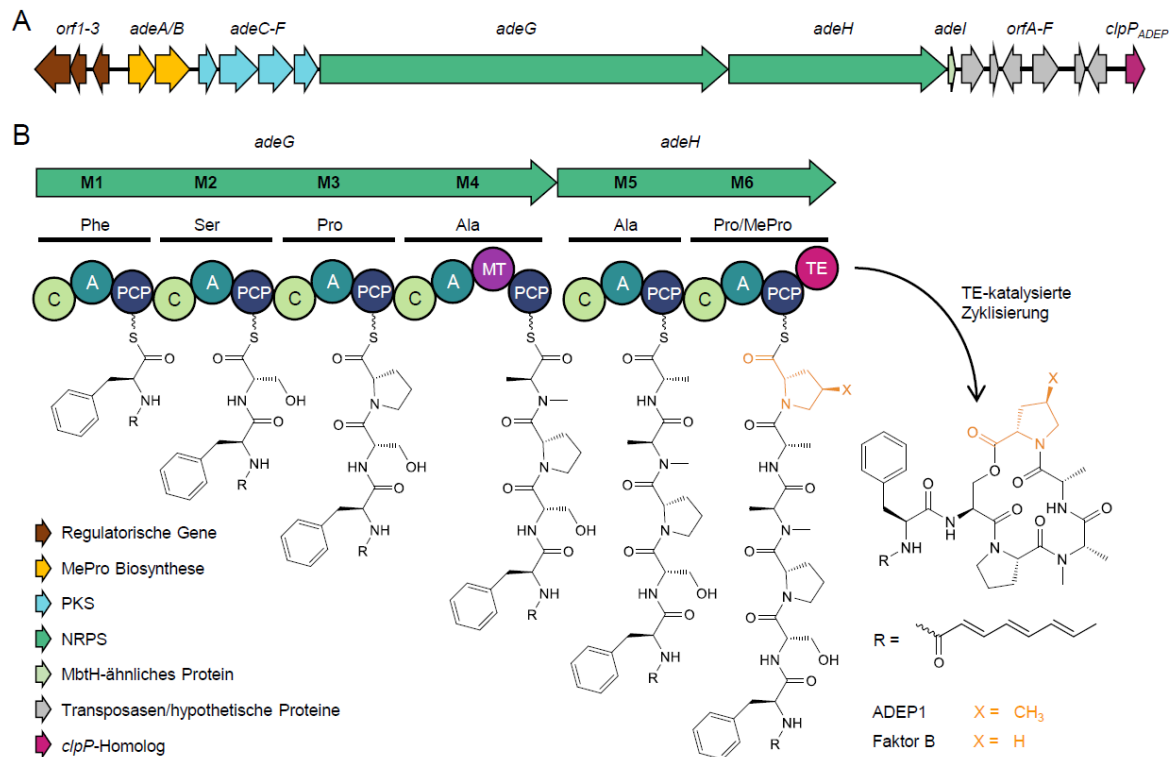


Abbildung 26: A) Das *ade*-BGC mit 12 ORFs. B) Die *ade*-NRPS-Maschinerie mit Modulen M1-M6 und spezifischen Substraten (Pro/MePro eingebaut durch M6 in orange). Die Domänen sind beschriftet wie folgt: C = Kondensationsdomäne, A = Adenylierungsdomäne, PCR = Peptidyl-Carrier-Protein, MT = Methyltransferase, TE = Thioesterase.

Die Substratspezifitäten der Adenylierungsdomänen in den sechs Modulen wurden *in silico* sowohl mit antiSMASH (Weber et al., 2015) als auch durch das strukturbasierte Vorhersagemodell von Challis *et al.* (Challis et al., 2000) korrekt vorhergesagt (Tabelle 31, Abbildung 27). Die

einzige Ausnahme stellte die multispezifische A6-Domäne des M6-Moduls dar, da statt einer Spezifität für Pro und MePro der Einbau von Pro und L-Pipecolinsäure (Pip) prognostiziert wurde.

A-Domäne	Vorhergesagtes Substrat	Aktiviertes Substrat	Aminosäureposition ^c							
			235	236	239	278	299	301	322	330
A1	Phe ^{a,b}	Phe ^d	D	A	W	T	V	A	A	V
A2	Ser ^{a,b}	Ser ^d	D	V	W	H	I	S	L	V
A3	Pro ^{a,b}	Pro ^{d,e}	D	V	Q	Y	G	A	H	V
A4	Ala ^{a,b}	Ala ^d	D	V	F	A	V	A	I	V
A5	Ala ^{a,b}	Ala ^d	D	V	F	A	V	A	I	V
A6	Pip ^a /Pro ^{a,b}	Pro ^{d,e} /MePro ^{d,e}	D	V	Q	Y	G	G	H	L

^aVorhergesagtes L-Aminosäuresubstrat basierend auf dem strukturbasierten Vorhersagemodell von Challis *et al.* 2000.

^bVorhergesagtes L-Aminosäuresubstrat basierend auf antiSMASH 4.1.0.

^cWichtige Aminosäurepositionen für die Substratauswahl. Die Nummerierung bezieht sich auf die Phe-aktivierende A-Domäne der Gramacidin-S-Synthetase (Challis *et al.*, 2000).

^dAnhand der ADEP-Primärstruktur abgeleitete Substrate.

^eDurch isolierte A-Domänen *in vitro* aktivierte Aminosäure (Abbildung 28).

Tabelle 31: Vergleich der auf Basis der Aminosäuren der Substratbindetaschen vorhergesagten Substrate und den tatsächlich von den A-Domänen des *ade*-BGC eingebauten Aminosäuren.

Um die Substratspezifität von A6 zu definieren, wurde ein Hydroxamat-Formierungs-Assay (Kadi and Challis, 2009) (3.4.5) mit der isolierten Domäne A6 sowie A3 des Moduls M3 als Kontrolle durchgeführt (Abbildung 28). A3 war spezifisch für Pro in Übereinstimmung mit den Primärstrukturen aller bekannten ADEP-Derivate, die in Position 3 Pro besitzen. Im Gegensatz dazu war A6 in der Lage sowohl Pro als auch MePro zu aktivieren, passend zur Variation von Pro und MePro in Position 6 bei ADEP1 und Faktor B. Insgesamt zeigte A6 eine erweiterte Substratspezifität im *in vitro*-Assay, da außerdem eine Aktivierung von Ser beobachtet werden konnte, die deutlich über dem durch A3 aktivierten Anteil von Ser, sowie der relativen Absorption der Kontrolle ohne Substrat lag. Allerdings sind keine ADEP-Derivate mit Ser in dieser Position im A54556-Komplex beschrieben.

	235/236	239	278
GrsA	GQFASISFDASVWEMFMALLTGASLYIILKDTINDFVKFEQYIN----		QKEITVITLPPPT
Shaw_A1	LQFASPSFDAMFWEWCMALLTGAALVLDNQR LAPG----		PALAEAEHRVTHATIPPA
Shaw_A2	LQKTPSSFDVSVWEFFWPLIAGAGLVIARPGGHKDP----		AYLADLINEQQVTTAHFVPS
Shaw_A4	LAATSLSFDVSVFELFAPLVSGGSVEVVRDVLALLG----		RPWSGSLI-----SAVPSA
Shaw_A5	LAATSLSFDVSVFELFAPLVSGGSVEVVRDVLALLG----		RPWSGSLI-----SAVPSA
Shaw_A3	AQFTAISFDVSAQEILETLGSGKRLVVPDADVRRDAARFVRWLEE----		YRITELYAPNV
Shaw_A6	AQFTAISFDVSAQEILETLGSGKRLVVPDADVRRDAARFVRWLEE----		YRITELYAPNV
Smue_A2	AQFTTISFDVSAQEILSALVFGKELWVPGEEVRRSGEGLARWLQEHA----		VEELFAPAL
Smue_A5	AQFTTISFDVSAQEILSALVFGKELWVPGEEVRRSGEGLARWLQEHA----		VEELFAPAL
Smue_A8	AQFTTISFDVSAQEILSALVFGKELWVPGEEVRRSGEGLARWLQEHA----		VEELFAPAL

	299	301	330	322
GrsA	YVVHL-----	DPERILSIQTLITAGSATSPSL----	VNKWKEKVTYINAYGPTETTICA	
Shaw_A1	A-LA-----	IMAPDSLPMVTTLVVAGEASS-AALVSD---	WAPGRMTMINAYGPTESTVCA	
Shaw_A2	MLRAFLSRP--	AAATCTSLRQVICSGEALT--	ADLAQAFHTTLSIPLHNLYGPTEASVDV	
Shaw_A4	LAQV-----	VGQPD LAVKAQTVVLAGEALS-	AQVVADIRAAMPGCQVANLYGPTEATVYA	
Shaw_A5	LAQV-----	VGQPD LAVKAQTVVLAGEALS-	AQVVADIRAAMPGCQVANLYGPTEATVYA	
Shaw_A3	MVEAVCEAALEQHR	TLPALHHI	GQGEALRLSSAVQDFFSASSDRRMHNHYGPAETHVVT	
Shaw_A6	MVEAVCEAALEQHR	TLPALHHI	GQGEALGLTPAVREFITAEPRRLHNYGPSETHLVT	
Smue_A2	VIDAVAQAAGELGLVLPALRHVA	QGG	EALVPGAAMRRFFRERPHIRLHNYGPTETHAVT	
Smue_A5	VIDAVAQAAGELGLVLPALRHVA	QGG	EALVPGAAMRRFFRERPHIRLHNYGPTETHAVT	
Smue_A8	VIDAVAQAAGELGLVLPALRHVA	QGG	EALVPGAAMRRFFRERPHIRLHNYGPAETHVVT	

Abbildung 27: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der A-Domänenbereiche mit wichtigen Aminosäuren für die Substratspezifität nach Stachelhaus *et al.* 1999 und Challis *et al.* 2000. A-Domänen des *ade*-BGC: Shaw_A1-A6; Pro/MePro-spezifische A-Domänen des Giselimycin-BGC: Smue_A2, A5, A8; Phenylalanin-spezifische A-Domäne der Gramacidin-S-Synthetase: GrsA. Die Positionen der für die Spezifität essentiellen Aminosäuren sind nummeriert mit Bezug auf GrsA. Aktivierte Substrate für die gezeigten A-Domänen: Shaw_A1-Phe, Shaw_A2-Ser, Shaw_A3-Pro, Shaw_A4-Ala, Shaw_A5-Ala, Shaw_A6-Pro/MePro, Smue_A2-MePro, Smue_A5-MePro, Smue_A8-Pro/MePro.

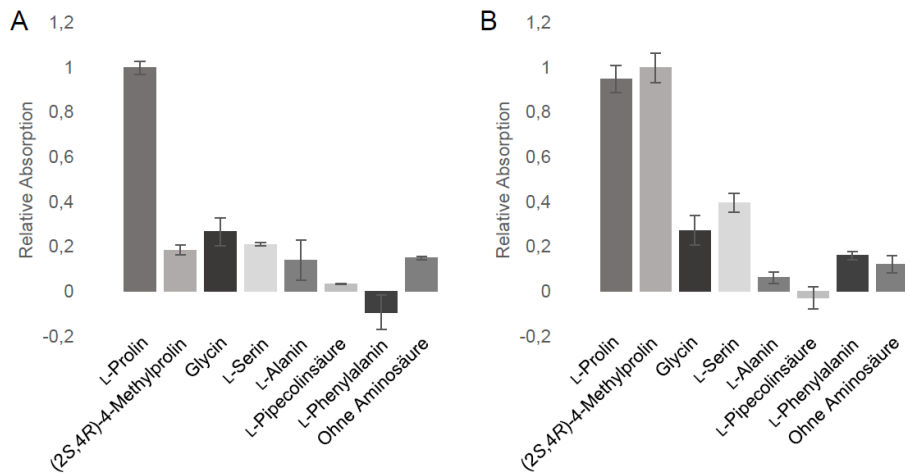


Abbildung 28: Relative Substratspezifitäten von A-Domänen ermittelt in einem Hydroxamat-Formierungs-Assay (Kadi and Challis, 2009). Die Spezifitäten von A3 (A) und A6 (B) wurden durch das Testen einer Auswahl von Aminosäuren und einer Kontrolle ohne Aminosäure bestimmt. Normalisierte Absorptionswerte der Assay-Ansätze minus der Absorptions-Werte einer Kontrollreaktion mit gekochtem Protein werden gezeigt für ein repräsentatives aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.

4.4.1.2 (2S,4R)-4-Methylprolin-Biosynthese

4-Methylprolin ist eine nicht-proteinogene Aminosäure, deren Vorkommen bisher nur in wenigen Naturstoffen beschrieben wurde. Bislang wurden Biosynthesewege zum (2S,2R)- und (2S,4R)-Diastereomer veröffentlicht (Hibi et al., 2013; Luesch et al., 2003; Lukat et al., 2017). Für die Bereitstellung des (2S,4R)-4-Methylprolins in ADEP1 wurden auch im *ade*-BGC homologe Enzyme erwartet.

Mittels BLAST- und antiSMASH-Analysen (Weber et al., 2015) konnten zwei Gene, *adeA* und *adeB*, als putative Leucin-Hydroxylase (AdeA) sowie putative Alkohol-Dehydrogenase (AdeB) annotiert werden. Ihre Aminosäuresequenzen zeigten hohe Identitäten/Ähnlichkeiten (ermittelt mit Clustal Omega) mit der kürzlich beschriebenen Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängigen Hydroxylase GriE (57%/73%) und der Zink-abhängigen Dehydrogenase GriF (68%/80%) des Griselimycin-BGC aus *Streptomyces* DSM 40835 (Kling et al., 2015; Lukat et al., 2017) (Alignments in Kapitel 6.3.1 und 6.3.2). GriE wurde in Ganzzell- und *in vitro*-Experimenten beschrieben, die Hydroxylierung von L-Leucin zu (2S,4R)-5-Hydroxyleucin zu katalysieren. GriF ist höchstwahrscheinlich an einem weiteren Oxidationsschritt beteiligt, direkt gefolgt von einer spontanen, nicht-enzymatischen Zyklisierung, resultierend in (3R,5S)-3-Methyl- Δ 1-pyrrolin-5-carboxylsäure (Lukat et al., 2017). Phylogenetische Analysen zeigten eine hohe Ähnlichkeit und enge Verwandtschaft von AdeA und GriE sowie AdeB und GriF, wodurch die Hypothese unterstützt wird, dass AdeA und AdeB für die Bereitstellung von MePro im Rahmen der ADEP-Biosynthese verantwortlich sind (Martina Adamek, Nadine Ziemert; unveröffentlicht) (Abbildung 29). Um schlussendlich MePro zu erhalten ist ein finaler Reduktionsschritt notwendig, der in *Streptomyces* DSM 40835 entweder durch GriH, eine F420-abhängige Oxidoreduktase des Griselimycin-Genclusters, oder durch ProC, eine Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase des Primärmetabolismus, durchgeführt wird. Da im *ade*-BGC kein Enzym mit dieser Funktion zu finden ist, gehen wir davon aus, dass hier auf eine Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase des Primärstoffwechsels zurückgegriffen wird (Abbildung 29, Alignment in Kapitel 6.3.3).

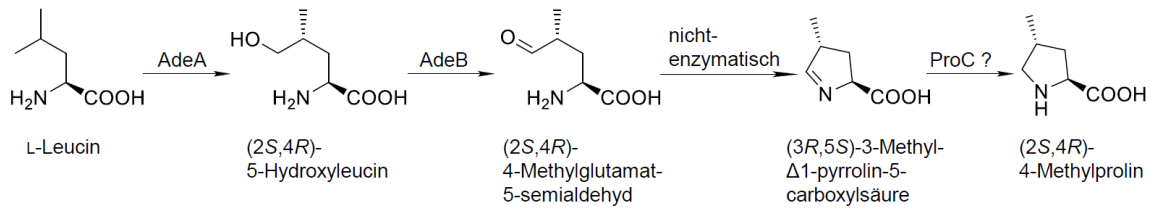


Abbildung 29: Möglicher Ablauf der Biosynthese von MePro im Rahmen der ADEP-Biosynthese.

4.4.1.3 Biosynthese der Alkenseitenkette durch eine Typ-II-PKS

Typ-II PKS synthetisieren in der Regel langkettige, aromatische Polyketidverbindungen und zeichnen sich durch alleinstehende Enzyme aus, die während der Synthese mehrfach rekrutiert werden. Im Gegensatz dazu wird bei einem PKS-Typ-I Megaenzymkomplex mit modularer Struktur jede Domäne des Megaenzym nur einmal genutzt (Fischbach and Walsh, 2006).

Kürzlich wurden mehrere Studien veröffentlicht, die die Biosynthese von stark reduzierten Polyenstrukturen in Actinobacteria durch eine minimale Typ-II PKS beschreiben. Die BGCs für Skyllamycin, Simocyclinone und Ishigamid enthalten PKS-Enzyme, die die typischen KS-Untereinheiten α und β einer Typ II-PKS aufweisen, aber statt aromatischer Verbindungen kurzkettige, stark reduzierte, lineare Polyketidverbindungen als Bestandteil der von ihnen synthetisierten Naturstoffe produzieren (Bilyk et al., 2016; Du et al., 2016, 2017; Pohle et al., 2011).

Die Gene *adeC-adeF* im *ade*-BGC codieren für Enzyme, die den PKS-Enzymen in den genannten Clustern in ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Anordnung sehr ähnlich sind (Abbildung 30, Alignments in Kapitel 6.3.4-6.3.7).

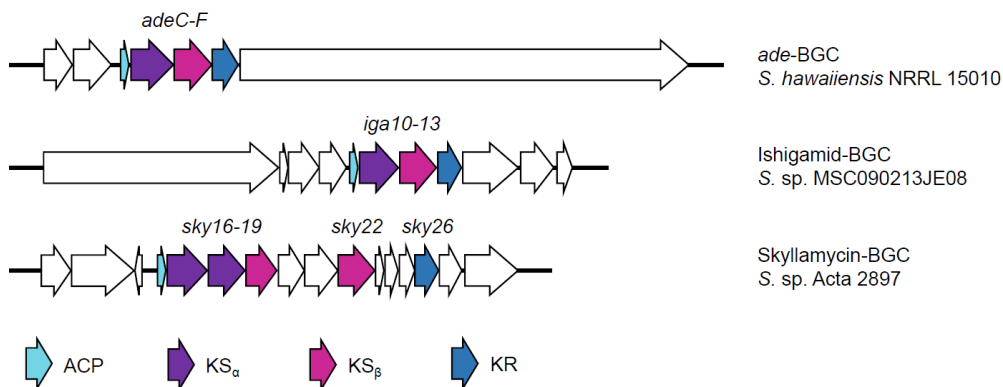


Abbildung 30: Anordnung der PKS-Gene in *S. hawaiiensis* und PKS-Homologe in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 und *Streptomyces* sp. Acta 2897. ACP = Acyl-Carrier-Protein; KS α = Ketosynthase α ; KS β = Ketosynthase β ; KR = Kettoreduktase.

AdeD trägt das typische Aminosäuremotiv Cys-His-His des aktiven Zentrums einer Ketosynthase und phylogenetische Analysen zeigten eine enge Verwandtschaft von AdeD mit anderen Ketosynthase- α -Untereinheiten. In AdeE ist dieses Motiv zu Gln-Ser-Asp verändert und es zeigt enge Verwandtschaft mit Ketosynthasen des β -Typs, die typischerweise eine veränderte, inaktive katalytische Triade aufweisen. Im Phylogeniebaum traten beide Enzyme zusammen mit Enzymen auf, die ebenfalls lineare Polyenkette synthetisieren, so dass eine vergleichbare Funktion von AdeD und AdeE mit diesen sehr wahrscheinlich ist (Martina Adamek, Nadine Ziemert; unveröffentlicht). Daher erwarten wir für die Alkenseitenketten der ADEP-Derivate im A54556-Extrakt einen analogen Biosyntheseweg, in dem die Polyketid-Elongation an der ACP-Domäne AdeC mit Acetyl-CoA startet und Malonyl-CoA als Erweiterungsbaustein genutzt wird. Ein KS-

Heterodimer aus AdeD und AdeE könnte diese in Claisen-Kondensationen (AdeD) zu einem Tri- oder Tetraketid verknüpfen, wobei die Kettenlänge (abgeleitet von den bisher bekannten ADEP-Faktoren im A54556-Extrakt C6 oder C8) vom CLF AdeE bestimmt wird (Tang et al., 2003). Allerdings sind für die Fertigstellung der konjugierten Alkene weitere Ketoreduktionen und Dehydrierungsreaktionen nötig. Ein putatives Ketoreduktase-Gen (*adeF*) liegt im Cluster zusammen mit *adeC-E* vor (Alignment in Kapitel 6.3.7), während keine Dehydratase gefunden werden konnte. Durch BLAST-Analysen des Genoms von *S. hawaiiensis* konnten putative, Dehydratase-codierende Gene gefunden werden, so dass diese Reaktion höchstwahrscheinlich von einem Enzym des Primärstoffwechsels ausgeführt wird (Abbildung 31, Alignment in Kapitel 6.3.8).

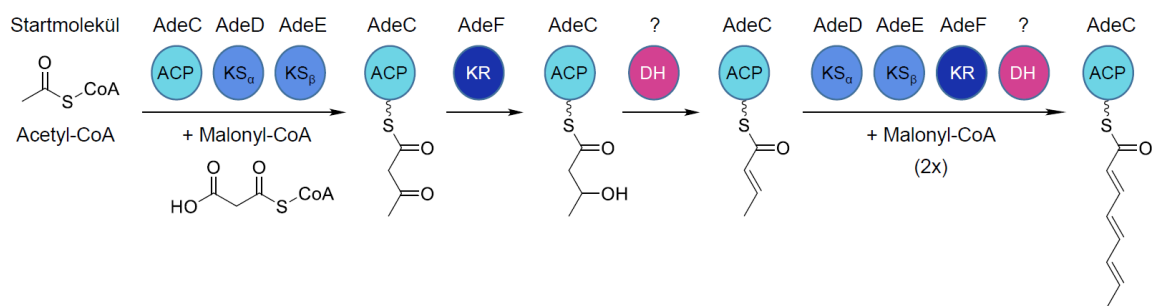


Abbildung 31: Möglicher Ablauf der Biosynthese der C8-Trienseitenkette im Rahmen der Biosynthese von ADEP1.

4.4.2 Knockout- und Knockdown-Versuche

Um sowohl die Identität als auch die Grenzen des *ade*-BGC zu bestätigen bzw. zu bestimmen, sollten Knockouts in ausgewählten Genen von *S. hawaiiensis* erzeugt werden, die das Cluster mutmaßlich begrenzen oder maßgeblich an der ADEP-Biosynthese beteiligt sein sollten. Die Gene *adeA* und *adeB*, die aller Wahrscheinlichkeit nach für die Bereitstellung von MePro notwendig sind, sollten ausgeknockt werden, da erwartet wurde, dass die erhaltenen Mutanten nicht mehr in der Lage sind ADEP1 zu produzieren, während Faktor B weiterhin produziert werden kann. Um die ADEP-Biosynthese komplett zu unterbinden, sollte das für eine NRPS codierende Gen *adeH* eliminiert werden und um die rechte Grenze zu bestimmen sollten *adel* und *orfA* ausgeknockt werden (Abbildung 32).



Abbildung 32: Ausgewählte Gene zur Erzeugung von Knockout-Mutanten (magenta) zur Bestätigung des *ade*-BGC und seiner Grenzen in *S. hawaiiensis*.

Zu Beginn wurde versucht, markerlose Knockouts durch doppelt-homologe Rekombination mit dem Suicide-Vektor pGusA21, der keinen *Origin of Replication* für *Streptomyces* besitzt, zu erzielen. Als dies nicht erfolgreich war, wurden Konstrukte mit denselben Flanken und einer Antibiotika-Kassette zur Selektion auf ThioStrepton in pA18 kloniert, deren Konjugation ebenfalls nicht zu Mutanten führte. Anschließend wurden die Genflanken aus den pGusA21-Konstrukten in den Vektor pGM-GUS-Xba eingebracht, mit dem im Rahmen dieser Arbeit erfolgreich Knockouts in *S. lividans* TK24 erzeugt werden konnten (4.5.2.2). Dieser Vektor wurde durch Einführen einer *Xba*I-Schnittstelle durch ortsspezifische Mutagenese in pGM-GUS generiert und trägt einen temperatur-sensitiven *Origin of Replication*, so dass das Plasmid in *Streptomyces* durch Inkubation bei 39 °C nicht mehr repliziert werden kann. Des Weiteren besitzt er das GUS-Reportersystem für Aktinomyceten (Myronovsky et al., 2011) und ermöglicht eine Blau-Weiß-

Selektion von rekombinanten Klonen. Ist der Vektor nach einfach-homologer Rekombination integriert, kann durch das Vorhandensein von *gusA* das Enzym β -Glucuronidase exprimiert werden und das Substrat X-Gluc (5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure) zu einem blauen Farbstoff verstoffwechselt werden. Bei Verlust des Vektors, im besten Fall nach Elimination des gewünschten Gens durch doppelt-homologe Rekombination, bleiben die Kolonien weiß.

Mit keinem der genannten Konstrukte und für keins der ausgewählten Gene wurden Mutanten erzielt. Obwohl unter den für *S. hawaiiensis* optimierten Bedingungen konjugiert wurde (4.1.3.1), kam es nicht zur einfach-homologen Rekombination (Vektorkarten in 6.2.6-6.2.9).

Um die Beteiligung der annotierten Gene an der ADEP-Biosynthese dennoch beweisen zu können, sollte versucht werden, dies für *adeA* und *adeG* durch eine Knockdown-Strategie zu erzielen. Mittels einer Antisense (si)-RNA-basierten Methode konnte bereits in *Streptomyces coelicolor* A3(2) die Actinorhodin-Produktion reguliert werden (Uguru et al., 2013). Dabei wurde eine zur mRNA eines ausgewählten Gens des BGC komplementäre siRNA kontrolliert exprimiert, um die mRNA „abzufangen“ und somit die Expression des Zielproteins zu regulieren. Analog dazu wurden in *S. hawaiiensis* für die beiden gewählten Gene Sequenzabschnitte gesucht, die die ribosomale Bindestelle und mindestens 50 bp der codierenden Sequenz einschließen und zwischen 120-160 bp lang sind. Sequenzen mit geringer Sekundärstruktur und einer hohen lokalen Entropie wurden mittels RNAfold (Hofacker, 2003) ermittelt und verwendet. Für die Klonierung wurde die Sequenz revers und komplementär amplifiziert. Um die Stabilität der exprimierten siRNA in der Zelle zu erhöhen, wurden über die verwendeten Primer neben den notwendigen Restriktionsschnittstellen auch gepaarte Enden mit einer sich wiederholenden Sequenzabfolge angehängt. Anfänglich wurde das Plasmid pIJ6902 (Vektorkarten für pIJ6902PROL und pIJ6902NRPS in 6.2.2.3 und 6.2.2.4) verwendet, welches eine über Thiostrepton induzierbare Expression erlaubt und über die Φ C31 *attP*-Stelle ins Genom integriert. Wie in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben, verursacht die Integration dieses Plasmids einen heterogenen Phänotyp, welcher es unmöglich machte die ADEP-Produktion mittels HPLC- oder Bioassay-Analysen zu quantifizieren, da sich das Wachstum der untersuchten Mutanten zu stark unterschied und somit auch die zum Wachstum proportionale ADEP-Produktion stark schwankte. Deshalb wurden basierend auf dem Vektor pIJ10257, der über die Φ BT1 *attP*-Stelle ins Genom integriert, Konstrukte zur induzierbaren Expression der siRNA erzeugt (Vektorkarten in 6.2.5.8-6.2.5.10).

Die Vektoren wurden durch Konjugation in *S. hawaiiensis* eingebracht, wodurch Mutanten generiert wurden, die keine offensichtliche Veränderung des Phänotyps beim Wachstum auf MS-Agar zeigten. Verschiedene Mutanten wurden in YM-Medium mit 0, 5 oder 50 μ g/ml Thiostrepton kultiviert und Proben des Kulturüberstands zu verschiedenen Zeitpunkten gezogen. Diese wurden gegen den Thiostrepton-resistenten Stamm *Bacillus subtilis* BKE01020 im Bioassay getestet (3.1.3.2).

Abbildung 33 zeigt als repräsentatives Beispiel für alle durchgeführten Versuche dieser Reihe die Ergebnisse eines Bioassays zur Überprüfung von verschiedenen Bioreplikaten der *S. hawaiiensis* si-*adeG* Mutante. Bei keiner der getesteten Mutanten wurde der gewünschte Knockdown-Effekt auf die ADEP-Produktion nach Induktion der Expression der siRNA sichtbar. Die minimal kleineren Hemmhöfe, die bei den induzierten 24 h-Proben von *S. hawaiiensis* si-*adeG* 1.2 im Vergleich zur nicht-induzierten Probe zu sehen sind, werden auf eine mit bloßem Auge sichtbare Verzögerung

des Wachstums der induzierten Kulturen und somit auch der ADEP-Produktion zum Zeitpunkt der Probennahme zurückgeführt. Diese trat auch beim Kontrollstamm *S. hawaiiensis* pIJtsr auf. Bei Proben, die nach 48 h Inkubation gezogen wurden, konnte keinerlei Unterschied zwischen Mutanten und Leervektorkontrolle sowie induzierten und nicht-induzierten Proben mehr detektiert werden. Kulturüberstände von *S. hawaiiensis* si-adeA Mutanten, bei denen durch Expression der siRNA die Produktion von ADEP1, aber nicht von Faktor B, verhindert werden sollte, wurden mittels HPLC-Analysen getestet. Auch hier konnte keine Veränderung im Vergleich zur nicht induzierten Probe detektiert werden. Somit konnte die Identität des *ade*-BGC mit dieser Methode nicht bewiesen werden.

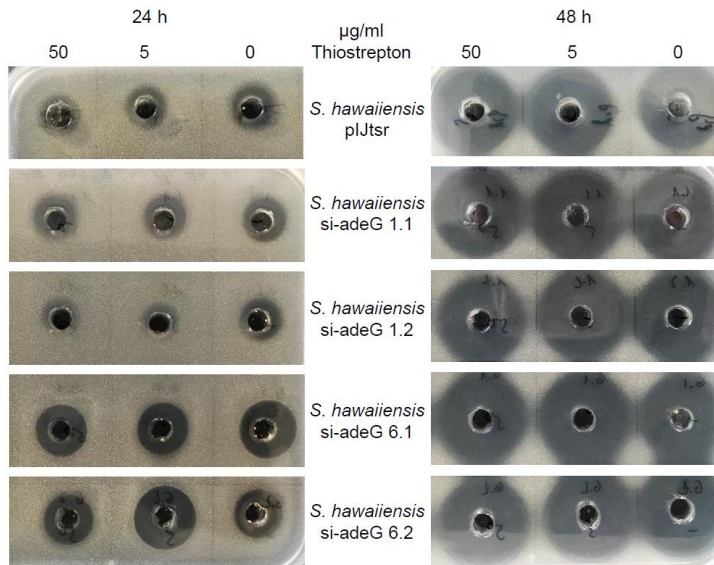


Abbildung 33: Bioassay mit Kulturüberständen von siRNA gegen *adeG*-mRNA exprimierenden *S. hawaiiensis* Mutanten, getestet gegen *B. subtilis* BKE01020. Es wurde nicht (0) bzw. mit 5 oder 50 µg/ml Thiostrepton induziert. Kulturen mit *S. hawaiiensis* pIJtsr dienten als Leervektorkontrolle. Proben wurden nach 24 und 48 h genommen und je 40 µl Kulturüberstand für den Bioassay verwendet.

Letztendlich konnte die Identität des Clusters durch heterologe Expression in *S. coelicolor* M1146 bestätigt werden. Dies erfolgte durch Elizabeth Culp und Gerard D. Wright (McMaster Universität, Hamilton, Kanada) in einer in Kooperation durchgeführten Arbeit. Durch Einbringen des Bereichs von *adeA* bis einschließlich *clpP_{ADEP}* in den heterologen Wirtsstamm konnte dieser intaktes ADEP1 sekretieren (unveröffentlicht).

4.5 Studien zur Clp-Maschinerie in Streptomyceten

Die Gattung *Streptomyces* besitzt die größte, bisher bekannte Clp-Multigen-Familie in Bakterien. Verschiedene Bakteriengattungen, wie beispielsweise *M. tuberculosis*, *Bacillus thuringiensis* und das Cyanobakterium *Synechococcus* weisen neben einer Auswahl von meist zwei oder drei Clp-ATPasen ebenso Gene für zwei bis drei *clpP*-Homologe auf. Mehr als drei *clpP*-Homologe sind abgesehen von Streptomyceten bisher nur in Eukaryonten bekannt (Akopian et al., 2012; Andersson et al., 2009; Derrien et al., 2012; Fedhila et al., 2002; Schelin et al., 2002). Das zusätzliche *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}*, das in der Nähe des *ade*-BGC gefunden wurde, macht die Clp-Maschinerie in *S. hawaiiensis* mit sechs *clpPs* daher besonders interessant. So sollte die Funktionalität sowie das Zusammenspiel der ClpP-Homologe in *S. hawaiiensis* näher untersucht werden. Da *S. hawaiiensis* in unseren Händen aber nicht ausreichend genetisch modifizierbar war, konnten keine umfassenden *in vivo*-Experimente mit diesem Stamm durchgeführt werden. *S. lividans* wurde stellvertretend als Modellorganismus ausgewählt, da mit diesem Stamm bereits

Studien zur Clp-Maschinerie erfolgreich durchgeführt und veröffentlicht worden waren (Bellier et al., 2006; Bellier and Mazodier, 2004; De Crécy-Lagard et al., 1999; Gominet et al., 2011; Guyet et al., 2013; Viala et al., 2000; Viala and Mazodier, 2002). Zunächst sollte die physiologische Situation der ClpP-Expression in *S. lividans* TK24 untersucht werden, um das Wissen über Streptomycceten-ClpPs auszubauen und so Rückschlüsse auf *S. hawaiiensis* ziehen zu können. Um Aussagen über den Resistenzmechanismus machen zu können, wurde *clpP_{ADEP}* in den *S. lividans* TK24 Wildtyp und verschiedene *clpP*-Knockout-Mutanten eingebracht und seine Funktion in vergleichenden Analysen mit *S. hawaiiensis* in qPCR-Experimenten, Western Blots und Bioassays untersucht.

4.5.1 Analyse von *clpP*-Genen und ihrer Expression in *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24

4.5.1.1 Sequenzanalysen der *clpP*-Homologe in *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24

Die *clpP*-Homologe *clpP1* und *clpP2* sowie *clpP3* und *clpP4* sind in Streptomycceten, wie bereits erwähnt, jeweils gepaart in einem bicistronischen Operon codiert (De Crécy-Lagard et al., 1999; Viala et al., 2000). Während *clpP3* und *clpP4* direkt aufeinander folgen und lediglich durch eine Base voneinander getrennt sind (z. B. *S. lividans* TK24) oder sich um eine Base überschneiden (z. B. *S. hawaiiensis*), liegen zwischen *clpP1* und *clpP2* in *S. lividans* TK24 50 Basen und in *S. hawaiiensis* 112 Basen (Abbildung 34).

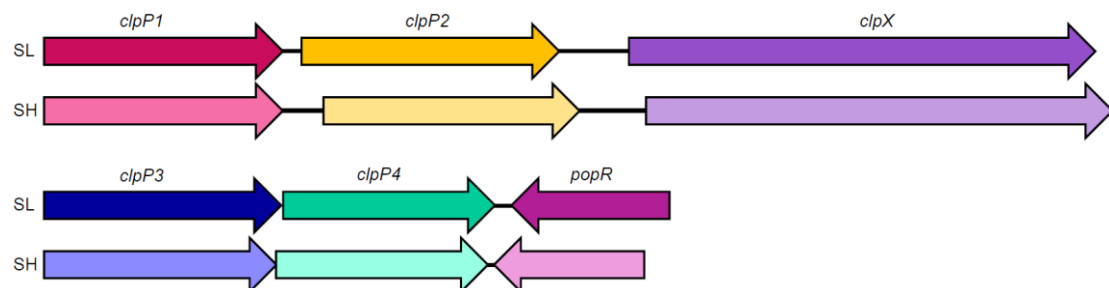


Abbildung 34: Schematische Darstellung des *clpP1clpP2*-Operons mit angrenzendem *clpX* sowie des *clpP3clpP4*-Operons und dem angrenzenden *popR*-Gen in umgekehrter Orientierung in *S. lividans* (SL) und *S. hawaiiensis* (SH).

Dieser deutlich größere Abstand der beiden Gene ist allerdings nicht spezifisch für *S. hawaiiensis*, da mittels BLAST-Analysen weitere *Streptomyces*-Stämme, wie *Streptomyces chartreusis* NRRL 3882 und *Streptomyces* sp. S10(2016), mit diesem Muster gefunden wurden (Alignments in Kapitel 6.3.9). Abgesehen von diesen Unterschieden sind die Sequenzidentitäten, besonders für *clpP1* (94,85%) und *clpP2* (93,93%) von *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24 sehr hoch (Tabelle 32). Wie in *S. lividans* TK24 und anderen *Streptomyces*-Stämmen, liegt in *S. hawaiiensis* downstream des *clpP1clpP2*-Operons ein Gen für die Clp-ATPase ClpX und downstream des *clpP3clpP4*-Operons ein Gen für den Transkriptionsregulator PopR in umgekehrter Orientierung (Abbildung 34, Alignments in Kapitel 6.3.9 und 6.3.10). Des Weiteren konnten Gene für alle aus *S. lividans* bisher bekannten, an der Clp-Maschinerie beteiligten Proteine gefunden werden (Abbildung 11; Alignments in Kapitel 6.3.13). Den einzigen offensichtlichen Unterschied in *S. hawaiiensis* stellte somit das zusätzliche *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}* dar.

Beim Sequenzvergleich zeigte *clpP_{ADEP}* höchste Ähnlichkeit mit *clpP1* (Tabelle 32), was auch in phylogenetischen Analysen von *Streptomyces*-ClpP-Proteinen ersichtlich wurde, da ClpP_{ADEP} im phylogenetischen Baum zusammen mit ClpP1 und benachbart zu ClpP3 auftrat und daher ein

gemeinsamer Vorfahre und eine funktionelle Homologie vermutet wird (Martina Adamek, Nadine Ziemert; unveröffentlicht).

	SH <i>clpP_{ADEP}</i>	SH <i>clpP1</i>	SL <i>clpP1</i>	SH <i>clpP2</i>	SL <i>clpP2</i>	SH <i>clpP3</i>	SL <i>clpP3</i>	SH <i>clpP4</i>	SL <i>clpP4</i>	SH <i>clpP5</i>	SL <i>clpP5</i>
SH <i>clpP_{ADEP}</i>	100	63,61	63,93	50,25	49,92	57,14	56,63	50	50,68	47,97	49,27
SH <i>clpP1</i>	63,61	100	94,85	57,7	57,74	62,04	64,8	58,08	56,4	54,79	55,27
SL <i>clpP1</i>	63,93	94,85	100	58,32	58,51	62,84	65,26	57,74	56,23	53,99	54,15
SH <i>clpP2</i>	50,25	57,7	58,32	100	93,93	56,01	55,63	66,5	66,5	66,19	62,84
SL <i>clpP2</i>	49,92	57,74	58,51	93,93	100	54,87	56,1	67	67	67,62	64,27
SH <i>clpP3</i>	57,14	62,04	62,84	56,01	54,87	100	87,32	53,77	52,43	55,19	53,12
SL <i>clpP3</i>	56,63	64,8	65,26	55,63	56,1	87,32	100	53,6	52,26	55,43	54,55
SH <i>clpP4</i>	50	58,08	57,74	66,5	67	53,77	53,6	100	88,89	61,03	59,37
SL <i>clpP4</i>	50,68	56,4	56,23	66,5	67	52,43	52,26	88,89	100	62,69	60,7
SH <i>clpP5</i>	47,97	54,79	53,99	66,19	67,62	55,19	55,43	61,03	62,69	100	78,46
SL <i>clpP5</i>	49,27	55,27	54,15	62,84	64,27	53,12	54,55	59,37	60,7	78,46	100

Tabelle 32: Prozentuale Identitätsmatrix von *clpP*-Genen aus *S. hawaiiensis* (SH) und *S. lividans* TK24 (SL), erstellt mit Clustal 2.1.

4.5.1.2 Expressionsanalysen mittels qPCR

Um mögliche Unterschiede zwischen *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24 zu analysieren und den Einfluss von *clpP_{ADEP}* auf die Transkription der anderen *clpP*-Homologe zu untersuchen, wurden vergleichende qPCR-Experimente durchgeführt. Dazu wurde zunächst die Expression der *clpP*-Gene in *S. hawaiiensis* in verschiedenen Wachstumsstadien untersucht. Aus der Wachstums- und ADEP-Produktionskurve (**Abbildung 17**) wurden vier Zeitpunkte von besonderem Interesse abgeleitet: keine mittels Bioassay detektierbaren Mengen ADEP in der *lag*-Phase (Latenzphase) (16 h), das Erreichen der geringsten, im Bioassay detektierbaren Menge ADEP zu Beginn der *log*-Phase (exponentielle Phase) (28 h), Erreichen der stationären Phase und maximaler ADEP-Gehalt der Kultur (56 h) und Absterbephase und sinkende Mengen ADEP (90 h). Das Experiment wurde durchgeführt wie in 3.2.2 und 3.2.4.4 beschrieben, die Daten mit der AriaMX Software Version 1.3 ausgewertet, ΔC_t -Werte mit Bezug auf das Housekeeping-Gen *hrdB* ermittelt und die berechneten $2^{-\Delta C_t}$ -Werte in Balkendiagrammen dargestellt.

Abbildung 35 zeigt eine Experimentreihe, bei der die relativen Expressionslevel der verschiedenen *clpP*-Homologe ermittelt wurden. Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass das Verhältnis der mRNA-Expressionslevel der verschiedenen *clpP*-Gene zueinander in den verschiedenen Wachstumsphasen konstant blieb mit vergleichsweise starker Expression von *clpP1*, *clpP2* und *clpP_{ADEP}* und niedriger bis minimaler Expression von *clpP3*, *clpP4* und *clpP5*. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass in *S. hawaiiensis*, wie in *S. lividans*, Clp1Clp2 den Aktivator PopR des *clpP3clpP4*-Operons abbauen und *clpP5* gering und konstitutiv exprimiert wird. Die Expressionslevel von *clpP_{ADEP}* und *clpP1* waren zu allen Zeitpunkten vergleichbar, während die Expressionslevel von *clpP2* permanent unter denen von *clpP1* lagen, obwohl *clpP1* und *clpP2* im gleichen Operon liegen. Ein ähnliches Bild zeigte sich für das *clpP3clpP4*-Operon, da *clpP3* ebenfalls stärker exprimiert wurde als *clpP4*. Dieses Phänomen wurde bereits in anderen Organismen beobachtet und auf getrennte Regulation der Gene oder eine mRNA-Instabilität zurückgeführt (Dogra et al., 2015; Rex et al., 1994). Für *S. coelicolor* wurde eine insgesamt strengere Genregulation im Vergleich zu anderen Organismen, wie z. B. *E. coli*, und ein allgemein absteigender Expressionstrend für das zweite Gen verschiedener multicistronischer Operons beobachtet (Laing et al., 2006). Die Ursache für die beobachteten

Expressionsunterschiede zwischen *clpP1* und *clpP2* bzw. *clpP3* und *clpP4* in *S. hawaiiensis* wurden jedoch nicht näher untersucht.

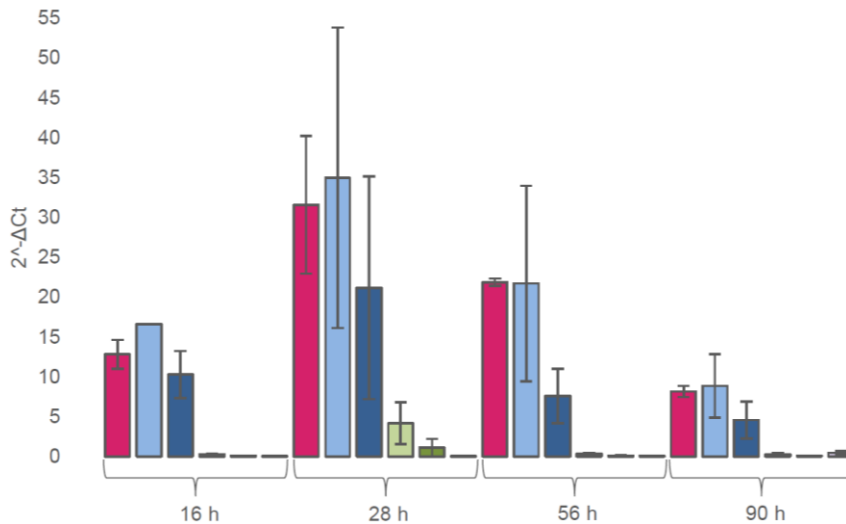


Abbildung 35: Relative Expressionsmengen der *clpP*-Gene in *S. hawaiiensis* in verschiedenen Wachstumsstadien. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der *clpP*-Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: *clpP_{ADEP}* = magenta; *clpP1* = hellblau; *clpP2* = dunkelblau; *clpP3* = hellgrün; *clpP4* = dunkelgrün; *clpP5* = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.

Die mRNA-Expressionslevel der untersuchten Gene variierten leicht zwischen den Wachstumsphasen, wobei zu Beginn der exponentiellen Phase, also bei grundsätzlich hoher Zellaktivität, auch höhere Expressionslevel gemessen wurden. Interessanterweise stieg zu diesem Zeitpunkt auch die Transkriptmenge von *clpP3* und *clpP4* leicht an, deren Transkription in Analogie zu *S. lividans* durch den Abbau des Transkriptionsregulators PopR durch ClpP1 und ClpP2 verhindert werden sollte. Allerdings war dieser Anstieg gering und es dominierten auch hier die Transkriptmengen von *clpP1* ($2^{-\Delta Ct} = 34,96$) und *clpP2* ($2^{-\Delta Ct} = 21,16$) über *clpP3* ($2^{-\Delta Ct} = 4,15$) und *clpP4* ($2^{-\Delta Ct} = 1,1$).

ClpP1, *clpP2* und *clpP_{ADEP}* sind somit die in *S. hawaiiensis* primär exprimierten *clpP*-Homologe. Da für *S. lividans* bekannt ist, dass ClpP1 und ClpP2 die physiologische ClpP-Maschinerie bilden, wurde eine vergleichende Analyse mit *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24 sowie mit einer *S. lividans* Mutante, die *clpP_{ADEP}* unter dem konstitutiven *ermE**-Promotor trägt (*S. lividans* pSETclp_{ADEP}) und einer entsprechenden Leervektorkontrolle (*S. lividans* pSETempty) durchgeführt. So sollte sowohl die physiologische *clpP*-Expression in *S. lividans* TK24 im Vergleich zu *S. hawaiiensis*, als auch ein möglicher Einfluss von *clpP_{ADEP}* auf diese untersucht werden.

Auffällig in dieser Experimentreihe waren die wesentlich geringeren $2^{-\Delta Ct}$ -Werte für alle *clpP*-Gene in *S. lividans* im Vergleich zu *S. hawaiiensis* (Abbildung 36). Zwar wurden für *S. lividans* andere Primer für die qPCR verwendet, da aber rund vierfach geringere relative Mengen für alle *S. lividans* *clpP*-Homologe gemessen wurden, konnte ein Primer-Effekt ausgeschlossen werden. Somit kamen die niedrigeren Werte entweder durch ein grundsätzlich niedrigeres Expressionslevel der *clpP*-Homologe in *S. lividans* zustande oder durch ein basal höheres Expressionslevel des Referenzgens *hrdB* in *S. lividans* im Vergleich zu *S. hawaiiensis*, da alle Werte auf dieses Gen normiert wurden.

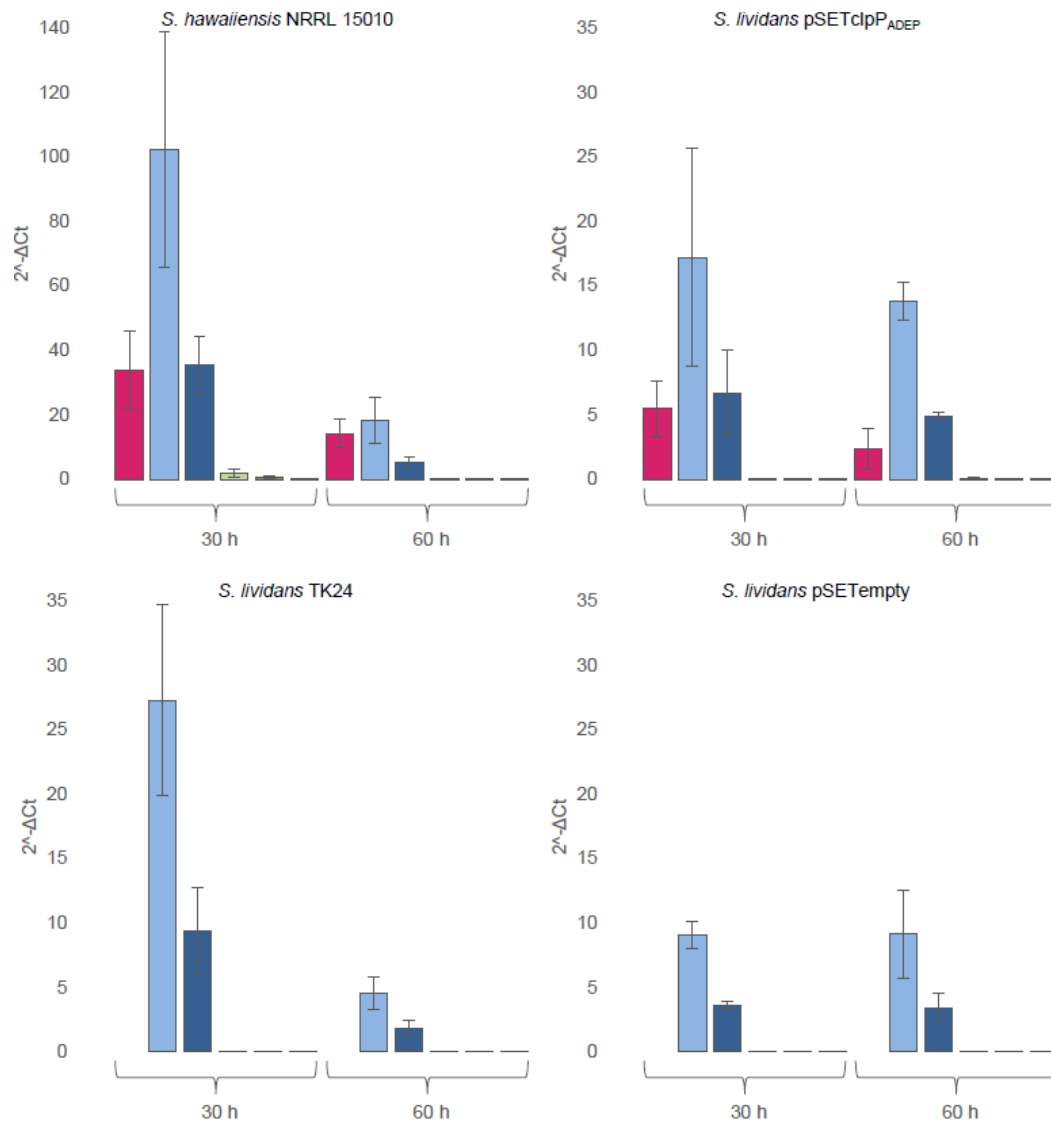


Abbildung 36: Relative Expressionsmengen der *clpP*-Gene in *S. hawaiiensis*, *S. lividans* pSETclpPADEP, *S. lividans* pSETEmpty und *S. lividans* TK24 nach 30 und 60 h Inkubation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der *clpP*-Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: *clpPADEP* = magenta; *clpP1* = hellblau; *clpP2* = dunkelblau; *clpP3* = hellgrün; *clpP4* = dunkelgrün; *clpP5* = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.

Das Verhältnis der Expressionslevel der *clpP*-Homologe zueinander war aber vergleichbar mit dem Verhältnis in *S. hawaiiensis*. Wie bei *S. hawaiiensis* wurde für alle getesteten *S. lividans* Stämme ein vergleichbarer Unterschied der relativen Expressionslevel von *clpP1* und *clpP2* beobachtet. Dieser, wie auch die Expressionslevel der anderen *clpP*-Homologe änderten sich nicht, wenn *clpPADEP* in *S. lividans* TK24 unter einem konstitutiven Promotor exprimiert wurde (*S. lividans* pSETclpPADEP). Somit scheint *clpPADEP* keinen Einfluss auf die Expression der übrigen *clpP*-Homologe zu haben.

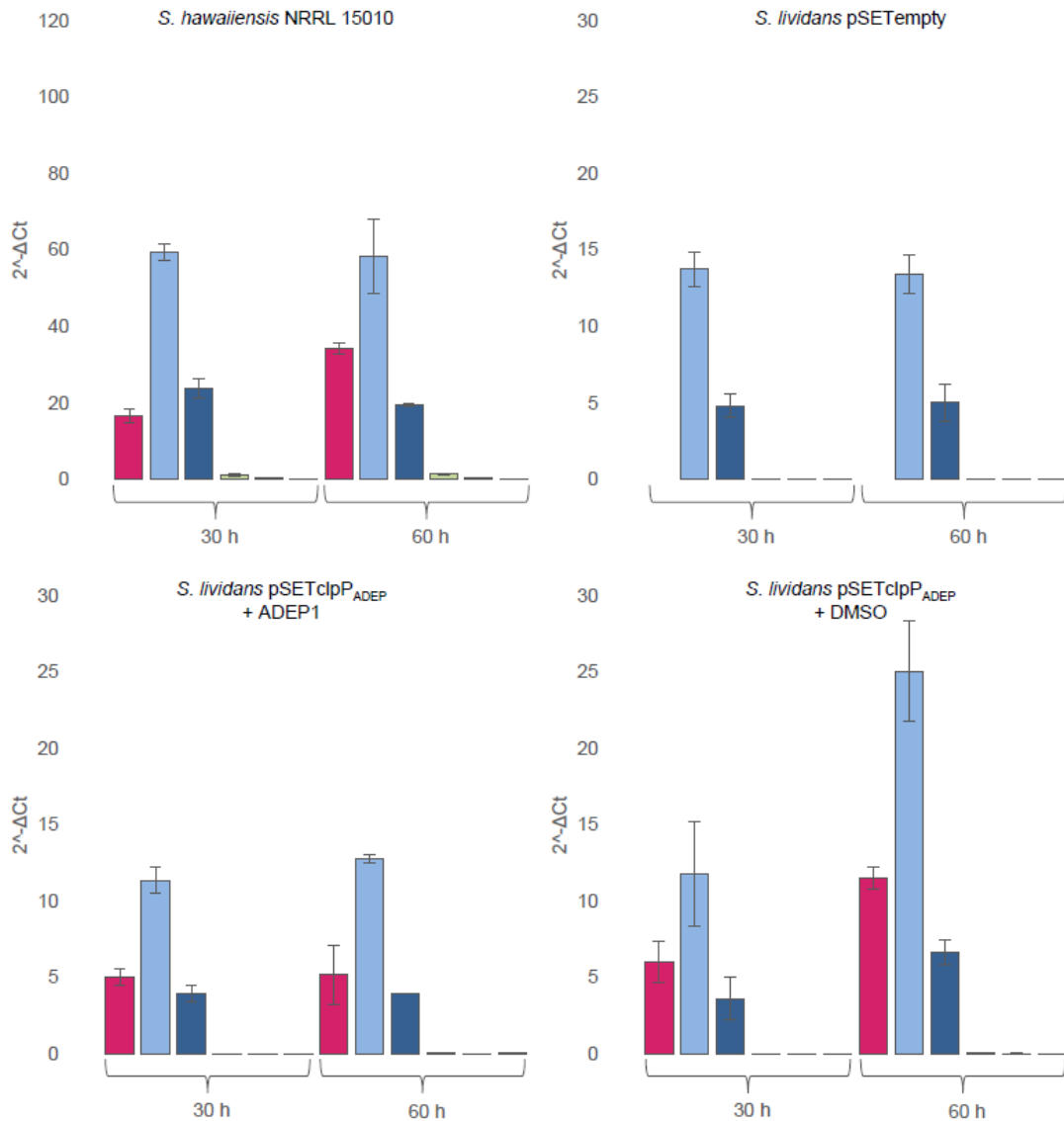


Abbildung 37: Relative Expressionsmengen der *clpP*-Gene in *S. hawaiiensis*, *S. lividans* pSETclpP_{ADEP} mit 10 µg/ml ADEP1, *S. lividans* pSETclpP_{ADEP} mit 200 µl DMSO und *S. lividans* pSETempty nach 30 und 60 h Inkubation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der *clpP*-Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: *clpP_{ADEP}* = magenta; *clpP1* = hellblau; *clpP2* = dunkelblau; *clpP3* = hellgrün; *clpP4* = dunkelgrün; *clpP5* = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.

Auch die Zugabe von ADEP1 während des Wachstums der *clpP_{ADEP}*-exprimierenden *S. lividans* Mutante im Vergleich zur DMSO-Kontrolle führte zu keiner Veränderung des *clpP*-Expressionslevel (Abbildung 37). Dies deutet darauf hin, dass *clpP_{ADEP}* nicht in das Regulon der anderen *clpP*-Homologe eingebunden ist und eine Interaktion mit der Clp-Maschinerie eher translational oder post-translational zu erwarten ist.

4.5.2 Analyse von ClpP-Proteinen in *S. lividans*

Abgeleitet aus den qPCR-Ergebnissen sollten daher in weiteren Experimenten post-translationale Interaktionen der ClpP-Homologe in *S. lividans* TK24 untersucht werden. Wie bereits in den Kapiteln 1.6 und 4.5.1 im Detail erläutert, liegen im *S. lividans*-Genom fünf ClpP-Homologe vor, von denen unter physiologischen Bedingungen nur ClpP1 und ClpP2 von Bedeutung für die notwendigen proteolytischen Aktivitäten der Clp-Maschinerie zu sein scheinen. Über die Konstruktion verschiedener Knockout-Mutanten, ihre Komplementierung (4.5.2.2) und anschließende Western Blot- (4.5.2.3) und Bioassay-Analysen (4.5.2.4) sollten Aussagen über

mögliche Interaktions- und Prozessierungspartner der einzelnen ClpP-Homologe sowie ihrer ADEP-Sensitivität getroffen werden.

4.5.2.1 Sequenzanalysen der ClpP-Homologe in *S. lividans* TK24 und *S. hawaiiensis*

Wie bereits nach der Gensequenzanalyse zu erwarten war, zeigte ein Vergleich der ClpP-Aminosäuresequenzen von *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24 hohe Identitäten der jeweiligen ClpP-Homologe beider Organismen mit 96,8% für ClpP1, 95,32% für ClpP2, 88,68% für ClpP3, 92% für ClpP4 und 71,56% für ClpP5 (**Abbildung 38, Tabelle 33**). ClpP_{ADEP} zeigte die größte Identität zu *S. hawaiiensis* ClpP1 mit 65,53%. Während ClpP_{ADEP} sowie ClpP1, ClpP2 und ClpP3 beider Organismen die typische katalytische Triade (Ser, His, Asp) aufweisen, ist das His des ClpP4-Homologs beider Stämme zu Gly mutiert. Es ist daher möglich, dass es sich bei ClpP4 um eine inaktive Peptidase handelt. In *S. lividans* ClpP5 ist das Ser der katalytischen Triade um eine Aminosäure, in *S. hawaiiensis* ClpP5 sogar um zwei verschoben. Der Effekt dieses Verschiebungs wurde nicht untersucht, er könnte aber ebenfalls die katalytische Aktivität des Proteins beeinflussen.

	SH ClpP _{ADEP}	SH ClpP1	SL ClpP1	SH ClpP2	SL ClpP2	SH ClpP3	SL ClpP3	SH ClpP4	SL ClpP4	SH ClpP5	SL ClpP5
SH ClpP _{ADEP}	100	65,53	65,05	43,00	42,00	52,22	50,97	39,29	40,82	40,59	42,57
SH ClpP1	65,53	100	96,80	44,23	44,71	50,48	49,77	39,90	40,40	42,79	42,31
SL ClpP1	65,05	96,80	100	45,19	45,19	50,96	50,23	39,89	40,40	42,79	42,79
SH ClpP2	43,00	44,23	45,19	100	95,32	40,20	41,38	52,00	54,00	56,25	52,88
SL ClpP2	42,00	44,71	45,19	95,32	100	39,70	40,89	51,50	54,00	57,69	54,33
SH ClpP3	52,22	50,48	50,96	40,20	39,70	100	88,68	35,38	36,92	42,79	40,80
SL ClpP3	50,97	49,77	50,23	41,38	40,89	88,68	100	37,19	38,19	43,90	42,93
SH ClpP4	39,29	39,90	38,89	52,00	51,50	35,38	37,19	100	92,00	46,50	47,00
SL ClpP4	40,82	40,40	40,40	54,00	54,00	36,92	38,19	92,00	100	47,50	48,00
SH ClpP5	40,59	42,79	42,79	56,25	57,69	42,79	43,90	46,50	47,50	100	71,56
SL ClpP5	42,57	42,31	42,79	52,88	54,33	40,80	42,93	47,00	48,00	71,56	100

Tabelle 33: Prozentuale Identitäts-Matrix von ClpP-Homologen aus *S. hawaiiensis* (SH) und *S. lividans* TK24 (SL), erstellt mit Clustal 2.1.

In Studien mit *S. lividans* ClpP1 und ClpP2 konnte gezeigt werden, dass beide Proteine prozessiert werden und die Prozessierungsstellen wurden durch Edman-Abbau bestimmt. Es wurde spekuliert, dass es sich hierbei um eine gegenseitige Prozessierung handeln könnte, da beide ClpP-Homologe anwesend sein mussten, um die prozessierten Formen detektieren zu können (De Crécy-Lagard et al., 1999). Mutmaßliche Prozessierungsstellen in *S. lividans* sind in **Abbildung 38** rot markiert und sind auch in *S. hawaiiensis* ClpP1 und ClpP2 zu finden. Des Weiteren wurde bereits publiziert, dass für die Translation von *S. lividans* ClpP1 und ClpP2 zwei mögliche Startcodons vorhanden sind. Abgeleitet vom Codon-Usage in Streptomycceten wurde für ClpP1 das zweite (ClpP1kurz) und für ClpP2 das erste Startcodon (ClpP2lang) vorgeschlagen (verschiedene Translationsstarts in blau in **Abbildung 38**; ebenfalls in *S. hawaiiensis* zu finden) (De Crécy-Lagard et al., 1999). Da sowohl der Expressionsstart beider ClpP-Homologe als auch die für die Prozessierung notwendigen ClpPs nicht eindeutig in *in vivo*-Studien belegt wurden, sollte dies im Rahmen dieser Arbeit erfolgen.

```

haw_clpPADEP      -----VKDIKELTGRTLGASRWNLNDQVMHRLMDERIIMLGQ
liv_clpP1         -----MRRPGAVVRRAGGYVFNLMPSAAGEPSIGGGLGDQVYNRLNGERIIFLGG
haw_clpP1         -----YRRPGAVVRRAGGYVFNLMPSAAGEPSIGGGLGDQVYNRLNGERIIFLGG
liv_clpP2         -----VNDFFPGSGLYDRVNAAQDMRAASQGRYTGPOAESRYVIFRFRVERTSQGVREYDYPYAKLFEERVIFLGV
haw_clpP2         -----VNDFFPGSGIYDRMHAVQDMS-ASQGRYTGPOAESRYIIPRFVERTSQGIREYDYPYAKLFEERVIFLGV
liv_clpP3         -----MSFFTAGPAPARTPRAEEGDTPATRFDDRLAEQLLDQRIVLLGT
haw_clpP3         -----MTPLTALAPRAEEGDTPTTRFDQDLAAQLLAQRIVLLGT
liv_clpP4         -----MGSYTIPNVVERTPQGERSYDVFSSRLLSERIIFLGT
haw_clpP4         -----MGTYTIPNVIERTPQGERSFDVFSRLLNERIIFLGT
liv_clpP5         -----MTRPSARHVLPEFTERTSAGTRTSDPYSKLLQERIVFLGT
haw_clpP5         -----MTRPSARYVLPPEFTERTGSGQRTMDPYSKLLEERIVFLGA

haw_clpPADEP      EVDDAGSNAICSQLLLLLA-GDSPRDISLYINSPGGSVTAGMAIYDTMNYIENDVVTVMAGTAAASMGQF
liv_clpP1         PVDDDIANKITAQLLLLLA-SDPKDIFLYINSPGGSITAGMAIYDTMQYIKNDVVTIAMGLAASMGQF
haw_clpP1         PVDDDIANKITAQLLLLLA-SDPEKDIYLYINSPGGSITAGMAIYDTMQYIKNDVVTIAMGLAASMGQF
liv_clpP2         QIDNASANDVMAQLLCLLESMDPDRDISVYINSPGGSFTALTAIYDTMQYVKPDVQTVCMGQAASAAAV
haw_clpP2         QIDNASANDVMAQLLCLLESMDPDRDISVYINSPGGSFTALTAIYDTMQYVKPDVQTVCMGQAASAAAV
liv_clpP3         QVDEVSANRVCSQLLILSAEDAHTDISLYINSPGGSVHAGLAIYDTMRLIPNDVSTLAMGFAASMGQF
haw_clpP3         QVDEVSANRVCSQLLILSAEDAHTDISLYINSPGGAVHAGLAIYDTMRLIPNDVSTLAMGFAASMGQF
liv_clpP4         EIDDGVANVVIAQLLHLESSAPESEIAVYINSPGGSFTSLMAIYDTMTFVQAPISTFCVQGAASSTAAV
haw_clpP4         EIDDGVANVVIAQLLHLESSAPESEIAIYLNTPGGSFTSLMAIYDTMTFVQAPISTFCVQGAASSTAAV
liv_clpP5         PVDETSANDVTAQLMYLEHQAPDRDIELYVNSPGGSFTAMTAIYDTMRYVACDVATCLGQAGPSAAV
haw_clpP5         PVDETSANDVMAQFMYLEHQAPERDISLYINSPGGTFHAMTALYDTMRYVSCDVETICLGQAGAASSV

haw_clpPADEP      LLTAGTPGKRIVLPHAEILMHOQPS--AGLGSASDIKIHAERLIRVKKRMIDITAQHTGRVVEEIKRD
liv_clpP1         LLSAGTPGKRIFALPNAEILIHQPS--AGLAGSASDIKIHAERLLHTKRRMAELTSQHTGQTIHQITRD
haw_clpP1         LLSAGTPGKRIFALPNAEILIHQPS--AGLAGSASDIKIHAERLLHTKRRMAELTSQHTGQTIHQITRD
liv_clpP2         LLAAGTPGKRIMALPNARVLIHQPY-SETGRGQVSDLEIAANEILMRMSQLEEMLAKHSTTPVEKIRE
haw_clpP2         LLAAGTPGKRIMALPNARVLIHQPY-SETGRGQVSDLEIAANEILMRMSQLEEDMLAKHSTTPVEKIRE
liv_clpP3         LLSVGTAGKRYALPNARIMMHOQPS--AGIGGTTADIEIQADNLDFTKRTIERTIAEHTGQSPETISRD
haw_clpP3         LLSVGAPGKRYALPNARIMMHOQPS--AGIGGTTADIEIQQNLEFTKRTIERTIAEHTGQSPENISRD
liv_clpP4         LLAGGDPGRRFVLEHARVLLGQPA-SGGRQGTVSDLALQAKEMVIRISQVEEVLARHTHHDVATLRAD
haw_clpP4         LLAGGDPGRRFVLEHRSVLLGQPA-AGGQRGMVSDLALQAKEMVIRISQVEEVLARHTHHDVATLRAD
liv_clpP5         LLAAGTPGKRAALPGARVVLHQPALTEPVRGQAGDLAVHAAELVVRARLEEILVRHTGRTPGQVAAD
haw_clpP5         LLAAGTPGKRIFALPDARLVIHQPALPEPVRGQASDLAIQADELTRIRGRMEEMLALHTGRTEQVSTD

haw_clpPADEP      SDRDRWFSADEAVEYGLADRVVEYVAATVPGNIGAAK----
liv_clpP1         SDRDRWFDAFEAKEYGLIDDVIATAAGMPGGGGTGA----
haw_clpP1         SDRDRWFDAFEAKEYGLIDDVMTAAGMPGGGGTGA----
liv_clpP2         IERDKILTAEDALSYGLIDQIITTRKMDNSSLR-----
haw_clpP2         IERDKILTAEDALSYGLIDQVISTRKMDNSSLR-----
liv_clpP3         GDRDRWFATAEEAREYGMVDQVVQSLADVRPAATRMRMGL-
haw_clpP3         GDRDRWFATAEEAREYGMVDRVVEVSLSDVRPAATRMRMGLQ
liv_clpP4         MDRDKVFTAQEAQAVAYGLADEVLARLRLTRV-----
haw_clpP4         MDRDKVFTAQEAQAVAYGLADEVLSRRLVKV-----
liv_clpP5         LERDTVLDARQAREYGLVDRIVPGRRTPPSSGAR-----
haw_clpP5         IERDKILTAQEAQAVAYGLVDGIIPSRKATLAPPTGR-----

```

Abbildung 38: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der ClpP-Homologe aus *S. lividans* (liv) und *S. hawaiiensis* (haw). Aminosäuren der katalytischen Triade sind gelb, mögliche Expressionsstarts in Clp1 und Clp2 sind blau und bekannte Prozessierungsstellen in *S. lividans* Clp1 und Clp2 sowie übereinstimmende Aminosäuren in *S. hawaiiensis* sind rot hinterlegt.

4.5.2.2 Konstruktion verschiedener *clpP*-Knockout-Mutanten in *S. lividans* TK24 und ihre Komplementierung

Um die einzelnen ClpP-Homologe von *S. lividans* TK24 ohne ihre vermeintlichen Partner betrachten und so Aussagen über ihre Funktionalität und Interaktionen machen zu können, sollten für *clpP1-4* Knockout-Mutanten erzeugt werden, wie in Kapitel 3.2.5.9 beschrieben. Um *clpP1* und *clpP1clpP2* zu eliminieren, wurde durch die Zugabe von ADEP1 (2 µg/ml) bei der Selektion ein Druck für den zweiten Schritt der doppelt-homologen Rekombination angelegt, da der Verlust des ADEP-Targets dem Stamm unter diesen Bedingungen das Überleben sichert. Dies führte schließlich zur erfolgreichen Deletion der Gene (*S. lividans* $\Delta clpP1$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$). Eine Knockout-Mutante mit fehlendem *clpP2* (bei vorhandenem *clpP1*) ließ sich unter den getesteten Bedingungen nicht erzeugen. Mutanten ohne *clpP3* und *clpP3clpP4* ließen sich hingegen problemlos und ohne Selektion auf ADEP generieren (*S. lividans* $\Delta clpP3$ und *S. lividans* $\Delta clpP3P4$).

Die erhaltenen Knockout-Mutanten wurden mit einer Vielzahl von Konstrukten komplementiert. Es wurde mit den Plasmiden pJ12551 und pJ10257 gearbeitet, die über verschiedene *attP*

Stellen in das Genom integrieren (2.4, Vektorkarten in Kapitel 6.2.4 und 6.2.5) und so die konstitutive Expression von zwei verschiedenen ClpP-Proteinen im gewählten Stamm-Hintergrund ermöglichen. Eine vollständige Auflistung aller erzeugten Mutanten ist in **Tabelle 15** und **Tabelle 16** zu finden. Es wurden verschiedene Variationen von *clpP1* und *clpP2* in die genannten Plasmide eingebracht, um eine konstitutive Expression vom ersten (ClpP1lang, ClpP2lang) sowie vom zweiten Startcodon (ClpP1kurz, ClpP2kurz) zu erreichen. Des Weiteren wurden Varianten mit einem His₆-Tag für erweiterte Western Blot-Analysen (z. B. ClpP2-His) konstruiert.

4.5.2.3 Analyse der erzeugten *S. lividans* *clpP*-Mutantenstämme mittels Western Blot

Um die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von ClpP-Proteinen in den jeweiligen *S. lividans* TK24 Mutanten zu bestätigen sowie ihre Prozessierung zu detektieren, wurden Western Blot-Analysen mit Zellextrakten dieser Stämme durchgeführt wie in 3.4.1 und 3.4.2 beschrieben. Es wurde ein polyklonaler Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper verwendet, der allerdings nicht vollkommen spezifisch für ClpP1 ist. In Western Blot-Analysen mit Konzentrationsreihen von isoliertem ClpP1, ClpP2 und ClpP_{ADEP} konnte gezeigt werden, dass der anti-ClpP1-Antikörper auch, rund zehnfach schlechter, an ClpP2 und ClpP_{ADEP} bindet. Ebenso ist er in der Lage ClpP3 zu binden. Hierfür wurde die Affinität im Vergleich zu ClpP1 nicht auf der Grundlage von gereinigten Proteinen bestimmt, jedoch fiel auf, dass die ClpP3 Bande nach Inkubation mit dem anti-Clp1 polyklonalen Serum deutlich stärker hervortrat als die von ClpP2. Der ebenfalls verwendete polyklonale Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper hingegen bindet spezifisch nur an ClpP3. Diese Eigenschaften zeigten sich von Vorteil für die durchgeführten Analysen, da so für alle getestete Stämme ein Proteinbandenmuster detektiert werden konnte, von dem Rückschlüsse auf Prozessierungen, Interaktionen und die Proteaseaktivität der beteiligten ClpP-Varianten gezogen werden konnten. Hier ist anzumerken, dass sich die Bandenstärke der ClpP-Homologe ClpP2, ClpP_{ADEP} und ClpP3, die unspezifisch durch den anti-ClpP1-Antikörper detektiert wurden, mitunter in verschiedenen Bioreplikaten derselben Probe auf verschiedenen Western Blots unterschied. Eine eindeutige Erklärung wurde dafür nicht gefunden. Die Antikörperlösung (1:1.000 bzw. 1:5.000 in PBST mit 5% Milchpulver) wurde für bis zu drei Western Blots in Folge verwendet und stellte damit eine mögliche Variable dar, was sich bei der Detektion der Western Blots aber nicht eindeutig bestätigen ließ.

In den folgenden Abbildungen wird „ClpP“ aus Gründen der Übersichtlichkeit zum Teil mit „P“ abgekürzt.

In einer ersten Versuchsreihe wurden die $\Delta clpP1$ - und $\Delta clpP1P2$ -Mutanten mit dem Wildtyp verglichen und durch Komplementierung mit Plasmiden zur Expression der kurzen und langen Proteinvarianten (ClpP1kurz, ClpP1lang, ClpP2kurz, ClpP2lang) in verschiedenen Kombinationen versucht, den Zustand im Wildtyp wiederherzustellen.

Im Wildtyp wurde eine einzige Bande mit dem anti-ClpP1-Antikörper detektiert, so dass diese Bande prozessiertem ClpP1 zugeordnet werden konnte (**Abbildung 39**). In den Knockout-Mutanten *S. lividans* $\Delta clpP1$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ konnte diese Bande, wie erwartet, nicht detektiert werden. Dafür wurde aber eine Bande mit dem anti-ClpP3-Antikörper sichtbar, die ebenfalls, etwas schwächer, mit dem anti-ClpP1-Antikörper detektierbar war, und daraufhin ClpP3 zugeordnet wurde. Eine weitere Bande, die nur im Zellextrakt von *S. lividans* $\Delta clpP1$, aber

nicht von *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ detektierbar war, stimmte mit der Größe von unprozessiertem ClpP2 überein (Abbildung 39; vgl. ClpP2lang und ClpP2kurz in Abbildung 40).

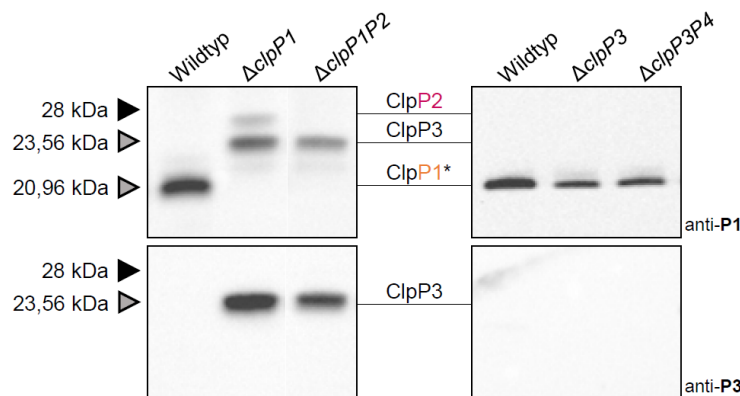


Abbildung 39: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* TK24 und auf diesem Stamm beruhenden *clpP*-Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Dieses Ergebnis bestätigt die bereits publizierten Erkenntnisse, dass ClpP1 und ClpP2 zusammen den Transkriptionsaktivator PopR des *clpP3clpP4*-Operons abbauen (Viala and Mazodier, 2002). Sobald ClpP1 nicht mehr exprimiert wurde (*S. lividans* $\Delta clpP1$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$) konnte PopR, trotz Anwesenheit von ClpP2, nicht mehr abgebaut werden, so dass ClpP3 exprimiert wurde und detektiert werden konnte. Hier ist anzumerken, dass die Expression von ClpP3 im weiteren Verlauf dieser Arbeit als Biomarker für einen proteolytischen Abbau von PopR und somit für die Entstehung eines aktiven, funktionalen ClpP1/ClpP2-Komplexes angesehen wurde.

Bei $\Delta clpP3$ und $\Delta clpP3P4$ Knockout-Mutanten konnte im Western Blot mit den beschriebenen Antikörpern keine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp detektiert werden (Abbildung 39).

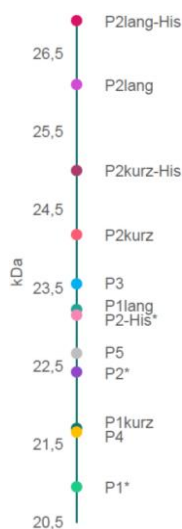


Abbildung 40: Erwartete Größen der ClpP-Proteine in *S. lividans* TK24 und den in diesem Stammhintergrund erzeugten Knockout-Mutanten sowie mit verschiedenen Konstrukten komplementierten Mutanten. Prozessierte ClpP-Versionen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Die Stämme *S. lividans* $\Delta clpP1$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ wurden beide mit Konstrukten zur Expression von ClpP1kurz und ClpP1lang transformiert. In den $\Delta clpP1$ -Mutanten *S. lividans* $\Delta clpP1+P1kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1+P1lang$ wurde durch beide Konstrukte eine vollständige

Komplementierung mit Verschwinden der ClpP3-Bande und mit vollständig prozessiertem ClpP1 wie im Wildtyp erreicht (Abbildung 41, links).

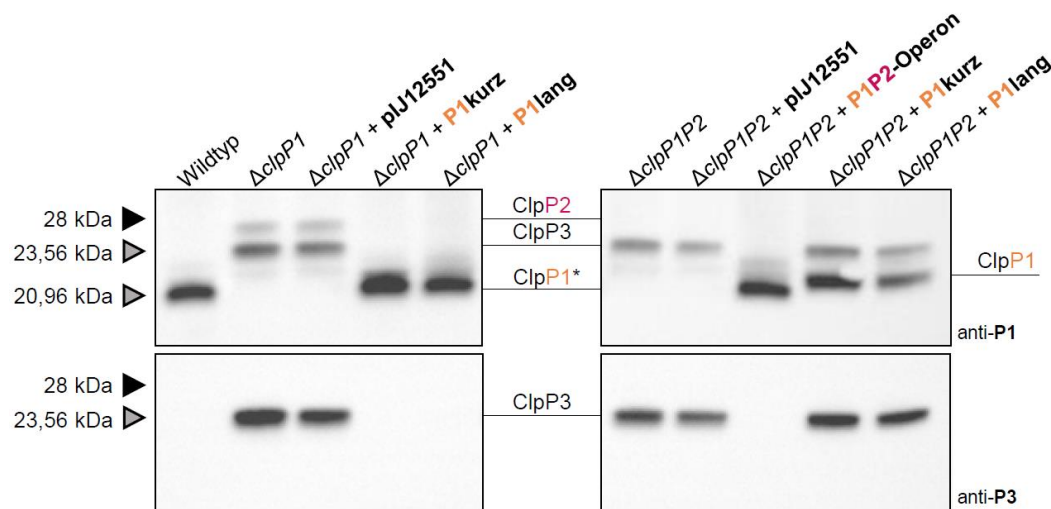


Abbildung 41: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* TK24 und auf diesem Stamm beruhenden *clpP*-Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Alle verwendeten Konstrukte zur Komplementierung beruhen auf dem Plasmid pJJ12551 (Leervektor), in den *clpP1* vom ersten (P1lang) oder vom zweiten (P1kurz) möglichen Startcodon bzw. das vollständige *clpP1clpP2*-Operon (P1P2-Operon) kloniert wurden. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP1 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Die Proben der komplementierten $\Delta clpP1P2$ -Mutanten *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1lang$ wiesen beide eine ClpP1-Bande derselben Größe auf, die höher lief als die ClpP1-Bande im Wildtyp, in den Mutanten $\Delta clpP1+P1kurz$ und $\Delta clpP1+P1lang$ sowie der mit dem gesamten *clpP1clpP2*-Operon komplementierten Mutante $\Delta clpP1P2+P1P2$ -Operon (Abbildung 41, rechts). Daraus konnte geschlussfolgert werden, dass in beiden Stämmen unprozessiertes ClpP1 vorlag, welches aufgrund der identischen Größe in beiden Stämmen vom selben Startcodon exprimiert wurde. Somit konnte belegt werden, dass die Translation von ClpP1 in *S. lividans* TK24 vom zweiten Startcodon beginnt, da nur dieses in beiden Konstrukten vorkommt und dass eine Prozessierung von ClpP1 nur in Anwesenheit von ClpP2 möglich ist.

Des Weiteren war in beiden Stämmen, *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1lang$, eine ClpP3-Bande detektierbar (Abbildung 41, rechts). Somit war ClpP1 alleine weder in der Lage sich selbst zu prozessieren, noch PopR, den Aktivator der ClpP3ClpP4-Expression, abzubauen. Dadurch konnte ClpP3 exprimiert und detektiert werden. Lediglich durch Komplementierung mit dem vollständigen *clpP1clpP2*-Operon (*S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1P2$ -Operon) konnte dies unterbunden werden, was die Notwendigkeit von ClpP1 und ClpP2 für die Bildung eines proteolytisch aktiven Komplexes bestätigt (Abbildung 41, rechts). Die in der Zelle vorhandenen ClpP-Homologe ClpP3, ClpP4 und ClpP5 scheinen keine geeigneten Interaktionspartner für ClpP1 zum Abbau von PopR zu sein.

Die $\Delta clpP1P2$ -Mutante wurde im nächsten Schritt mit beiden Konstrukten zur ClpP2-Expression transformiert, resultierend in *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P2kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P2lang$. Wie bereits nach Detektion des Western Blots mit *S. lividans* $\Delta clpP1$ angenommen wurde (Abbildung 39), konnte keine ClpP2-Version in Abwesenheit von ClpP1 durch den Abbau von PopR ein Verschwinden der ClpP3-Bande vermitteln (Abbildung 42, links).

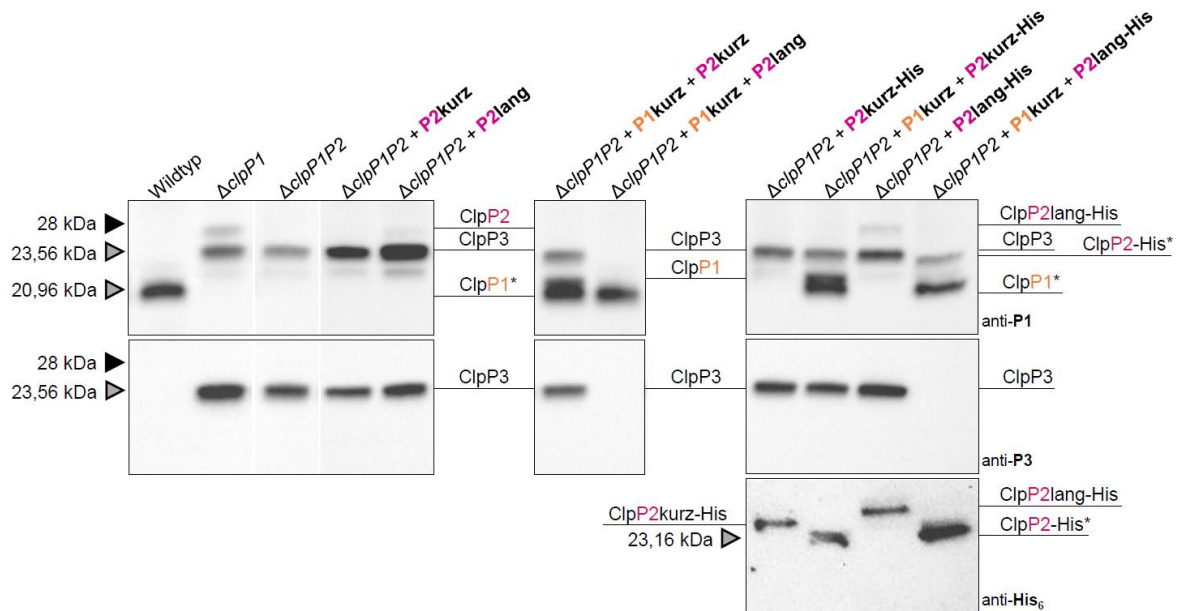


Abbildung 42: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* TK24 und auf diesem Stamm beruhenden *clpP*-Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti 6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP1* beruhen auf dem Plasmid pIJ12551, Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP2* beruhen auf dem Plasmid pIJ10257. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP3 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Durch kombinierte Komplementierung der $\Delta clpP1P2$ -Mutante mit ClpP1kurz und jeweils einer ClpP2-Version (*S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz + P2kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz + P2lang$) wurde ersichtlich, dass die Wildtyp-Situation nur mit ClpP2lang erreicht wird (**Abbildung 42, Mitte**). Nur in Gegenwart von ClpP2lang kam es zu einer vollständigen Prozessierung von ClpP1 und dem vollständigen Verschwinden der ClpP3 Bande, die einen effizienten PopR-Abbau impliziert. Zwar ist eine Teilprozessierung von ClpP1 auch mit ClpP2kurz sichtbar, aber der PopR-Abbau scheint erschwert oder vollständig unterbunden, da die ClpP3-Bande weiterhin präsent blieb. Durch die Transformation mit ClpP2-Versionen mit C-terminalen His₆-Tags wurde ersichtlich, dass beide, ClpP2kurz-His und ClpP2lang-His, in Anwesenheit von ClpP1 prozessiert werden, so dass die Länge des N-Terminus von ClpP2 zumindest für seine Prozessierung nicht entscheidend zu sein scheint (**Abbildung 42, rechts**). Die mit einem His₆-Tag versehenen ClpP2-Konstrukte zeigen zudem noch einmal deutlich, dass zur N-terminalen Prozessierung von ClpP2 die Anwesenheit von ClpP1 erforderlich ist.

Zusammenfassend wurde also zum Einen die Hypothese bewiesen, dass die Expression von ClpP2 am ersten Startcodon beginnt und außerdem bestätigt, dass ClpP1 und ClpP2 Interaktionspartner sind, die beide vorhanden sein müssen, um die Knockout-Mutante zurück zum Wildtyp-Zustand zu komplementieren. Obwohl auch die verkürzte ClpP2-Version eine langsame Prozessierung von ClpP1 und ClpP2 möglich machte und somit zur Interaktion mit ClpP1 fähig sein muss, scheint der verlängerte N-Terminus von ClpP2lang eine wichtige Funktion zu erfüllen, die die Prozessierung von ClpP1 und ClpP2 sowie den PopR-Abbau auf das Wildtyp-Niveau beschleunigt.

4.5.2.4 Western Blot-Analyse mit ClpP1-Funktionsverlustmutanten

In einem weiteren Experiment sollten die Auswirkungen untersucht werden, wenn ClpP1 nicht mehr mit den Clp-ATPasen interagieren kann oder seine katalytische Aktivität verliert. Dazu wurden, aus Gründen der Zweckmäßigkeit, Konstrukte zur Expression von *S. hawaiiensis* ClpP1 (*ShP1*) genutzt, da Konstrukte mit den nötigen Mutationen in *ShP1* bereits von Laura Reinhardt aus unserer Arbeitsgruppe für andere Experimente hergestellt worden waren und als Template für die Amplifikation von mutierten *ShclpP1*-Genen genutzt werden konnten. Zur Inhibierung der Bindung der Clp-ATPasen wurden drei konservierte Aminosäuren ausgetauscht (*ShP1Hyp*: Y62Y, Y64V, Y84V), die zur sogenannten H-Pocket gehören und für die Bindung der Clp-ATPasen unbedingt notwendig sind (Lee et al., 2010; Li et al., 2010). Um die katalytische Aktivität von *ShClpP1* zu unterbinden wurde ein Aminosäureaustausch des Ser der katalytischen Triade vorgenommen (*ShP1Cat*: S100A). Die erhaltenen Konstrukte wurden in *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P2lang$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P2lang$ -His eingebracht.

In Western Blots mit Zellextrakten von *S. lividans* $\Delta clpP1P2+ShP1Cat+P2lang$ bzw. $P2lang$ -His wurde durch das Fortbestehen der ClpP3-Bande klar ersichtlich, dass sich durch den Aminosäureaustausch in der katalytischen Triade von *ShP1Cat*, trotz Anwesenheit von funktionalem ClpP2, kein proteolytisch aktiver Komplex bilden konnte, da das mutierte ClpP1 keine proteolytische Aktivität mehr besitzt (Abbildung 43, rechts). Somit wurde bestätigt, dass nicht nur die bloße Anwesenheit von ClpP1, sondern auch sein proteolytisches Potential für die physiologische ClpP-Funktionalität essentiell sind.

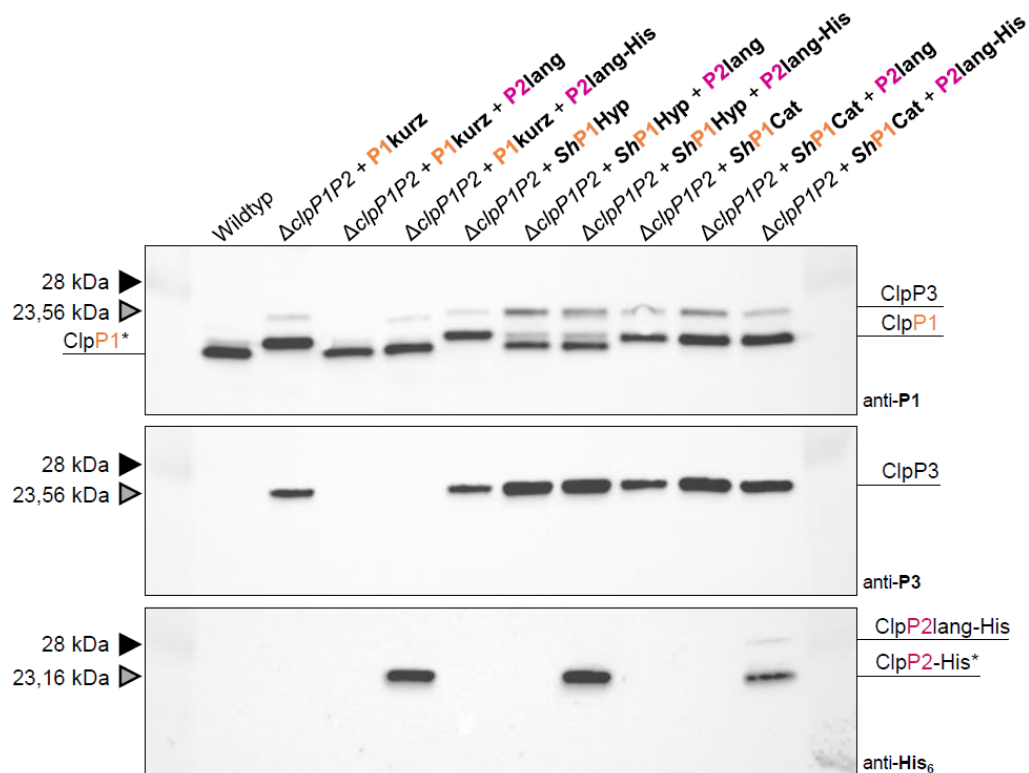


Abbildung 43: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* *ShClpP1*-Funktionsverlustmutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP1* beruhen auf dem Plasmid pIJ12551, Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP2* beruhen auf dem Plasmid pIJ10257. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP3 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Während *ShP1Cat* nicht prozessiert wurde, fand aber eine fast vollständige Prozessierung von *ClpP2lang-His* statt. Diese konnte in Abwesenheit von *ShP1Cat* bzw. *ClpP1* (*S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +*P2lang-His*, **Abbildung 42**) nicht beobachtet werden und schien somit unabhängig von der proteolytischen Aktivität von *ClpP1* stattzufinden, aber dennoch die Anwesenheit von *ClpP1* zu erfordern. Dies könnte darauf hindeuten, dass *ClpP2* nach Bildung eines Komplexes mit *ClpP1* in der Lage ist, sich selbst zu prozessieren.

Bei der gemeinsamen Expression von *ShP1Hyp*, an das keine *Clp*-ATPasen mehr binden können, mit *ClpP2lang-His* in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ (*S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +*ShP1Hyp*+*P2lang-His*) konnte ebenfalls kein Komplex mehr gebildet werden, der zum Abbau von *PopR* in der Lage war (*ClpP3* blieb bestehen) (**Abbildung 43, Mitte**). Allerdings konnte neben einer vollständigen Prozessierung von *ClpP2lang-His* eine Teilprozessierung von *ShP1Hyp* beobachtet werden. Somit schien auch in diesem Fall ein Komplex entstanden zu sein, der aber durch den Verlust der *Clp*-ATPasen-Bindung an *ClpP1* den Großteil seiner Funktionalität verloren hat.

Die Aminosäuresequenzidentitäten zwischen den *S. hawaiiensis* und *S. lividans* *ClpP*-Homologen sind zwar sehr hoch, jedoch ist zu bedenken, dass in den in diesem Abschnitt (4.5.2.4) beschriebenen Experimenten die Interaktion zwischen *ClpP*-Proteinen aus zwei verschiedenen Organismen untersucht wurden (*ClpP1* aus *S. hawaiiensis* und *ClpP2* aus *S. lividans*). Daher sollten die hier beschriebenen Beobachtungen mit Defektmutanten in *S. lividans* *ClpP1* bestätigt werden, was im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr erfolgen konnte.

4.5.2.5 Bioassay-Analysen der *clpP*-Knockout-Mutanten zur ADEP-Sensitivität

S. lividans-Mutanten, die kein Plasmid tragen und somit keine Selektion auf ein Antibiotikum benötigen, wurden in Bioassays gegen *S. hawaiiensis* (3.1.3.3) getestet.

Während durch Knockouts von *clp3* oder *clp3clp4* keine Veränderung der ADEP-Sensitivität im Vergleich zum Wildtyp auftrat, wurde durch Verlust von *clp1* allein oder *clp1clp2* eine ADEP-Hochresistenz erzeugt (vgl. *S. hawaiiensis* als intrinsisch resistenter Stamm in **Abbildung 44**).

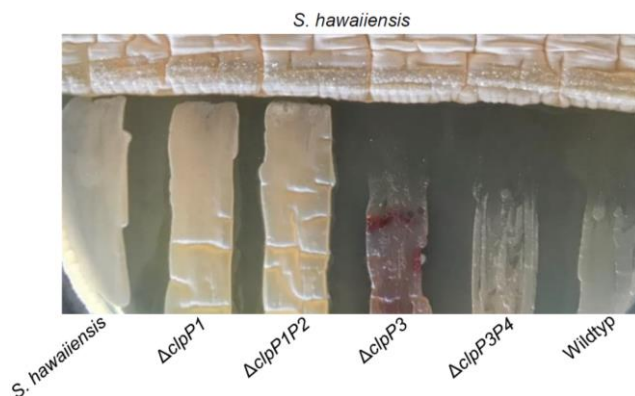


Abbildung 44: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener *clpP*-Knockout-Mutanten gegen den A54556 ADEP-Komplex, sekretiert von *S. hawaiiensis*. Stämme ohne Genus- und Spezies-Bezeichnung beruhen alle auf *S. lividans* TK24.

Die komplementierten Mutanten wurden in Bioassays gegen reines ADEP1 getestet (3.1.3.1), wodurch der Effekt von *ClpP1* auf die ADEP-Sensitivität ebenfalls bestätigt werden konnte (**Abbildung 45**). Für die $\Delta clpP1$ -Mutante war aus Western Blot-Analysen bekannt, dass *ClpP2*, *ClpP3* und somit höchstwahrscheinlich auch das mit *ClpP3* in einem Operon liegende *ClpP4* exprimiert werden. Da das Wachstum der $\Delta clpP1$ -Mutante durch ADEP1 nicht inhibiert wurde,

kann also geschlussfolgert werden, dass, mit Ausnahme von ClpP1, alle ClpP-Homologe unempfindlich gegenüber ADEP1 sind. Somit scheint ClpP1 das einzige durch ADEP deregulierbare ClpP-Homolog in *S. lividans* TK24 zu sein. Dies konnte ebenfalls durch die Komplementierung der $\Delta clpP1P2$ -Mutante mit *clpP1* gezeigt werden, da in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1kurz eine ADEP-Sensitivität durch die Expression von ClpP1, unabhängig von seinem physiologischen Partner ClpP2, vermittelt wird.

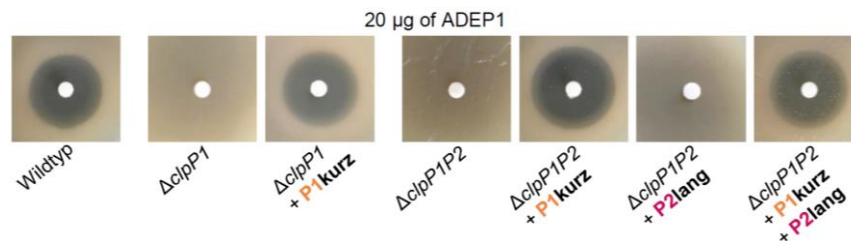


Abbildung 45: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener komplementierter *S. lividans* TK24 *clpP*-Knockout-Mutanten gegen 20 µg ADEP1.

Grundsätzlich konnte eine ADEP-Sensitivität in allen ClpP1-exprimierenden Stämmen (*S. lividans* TK24, *S. lividans* $\Delta clpP1$ +P1kurz, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1kurz, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1P2-Operon) detektiert werden, während alle Stämme ohne funktionales ClpP1 (*S. lividans* $\Delta clpP1$, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P2lang) eine ADEP-Resistenz zeigten (Abbildung 45). Somit kann die intrinsische ADEP-Resistenz des ADEP-Produzentenstammes nicht ausschließlich durch Expression von ADEP-resistenten ClpP-Homologen (z. B. ClpP3 und ClpP4) erzeugt werden, sondern muss gleichzeitig durch eine Detoxifizierung von ClpP1 erfolgen.

4.5.3 ClpP_{ADEP}-vermittelte ADEP-Resistenz in Streptomyceten

Wie bereits in Kapitel 4.4 beschrieben, wurde bei der Analyse des *ade*-BGC kein Resistenzgen und auch kein Exporter in unmittelbarer Nähe zu den Biosynthesegenen gefunden. Bei der Untersuchung der upstream- und downstream-Regionen konnte aber 4,8 kb downstream des BGCs das *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}* identifiziert werden. Durch seine Nähe zum BGC, dem Wirkmechanismus von ADEP an ClpP und der erfolgreichen heterologen Expression des *ade*-BGC in *S. coelicolor* M1146 in Gegenwart von *clpP_{ADEP}* (Elizabeth Culp, Gerard D. Wright; unveröffentlicht) qualifizierte es sich als potentiell Resistenzgen gegen ADEPs in *S. hawaiiensis*.

4.5.3.1 Expression von ClpP_{ADEP} in verschiedenen Streptomyces-Spezies

Um ClpP_{ADEP} auf seine ADEP-Resistenz-vermittelnden Eigenschaften zu testen, wurde das *clpP_{ADEP}*-Gen aus *S. hawaiiensis* in den *E. coli*/*Streptomyces*-Shuttle-Vektor pSET152*ermE**ΔHindIII kloniert und so unter Kontrolle des konstitutiven *ermE**-Promotors in *S. lividans* TK24, *Streptomyces coelicolor* A3(2) und *Streptomyces griseus* Waksman exprimiert (Vektorkarte in 6.2.3). Die Stämme wurden in Bioassays gegen den von *S. hawaiiensis* sekretierten A54556-Extrakt getestet (3.1.3.3) und zeigten eine deutliche ADEP-Insensitivität, da sie, im Gegensatz zum Wildtyp und zur Leervektorkontrolle, bis an den ADEP-Produzenten heranwachsen konnten (Abbildung 46). Somit scheint ClpP_{ADEP} in *Streptomyces* speziesunabhängig als Resistenzfaktor zu fungieren. Da *S. griseus* kein *clpP3clpP4*-Operon besitzt, lässt sich eine Beteiligung dieser ADEP-insensitiven *clpP*-Homologe am Resistenzmechanismus, zumindest für *S. griseus*, ausschließen.

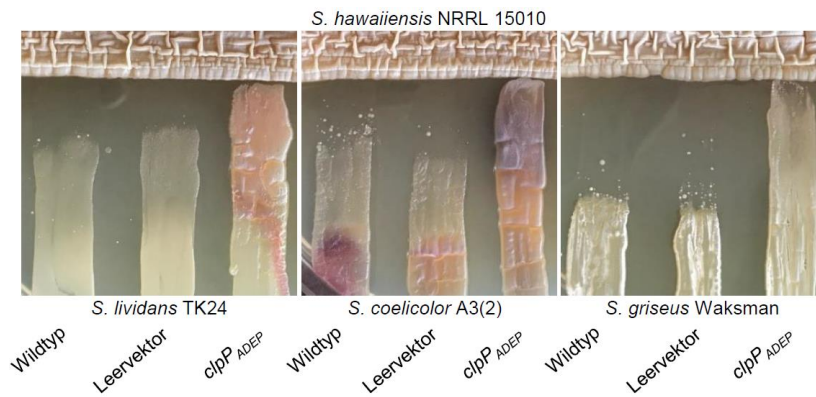


Abbildung 46: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener *clpP*_{ADEP}-tragender *Streptomyces*-Mutanten gegen den A54556 ADEP-Komplex, sekretiert von *S. hawaiiensis*. Leervektor: pSET152ermE* Δ HindIII; *clpP*_{ADEP}: pSET152*clpP*_{ADEP}.

Um einen möglichen Einfluss der ClpP_{ADEP}-Expression auf die Expression und Stabilität der anderen ClpP-Proteine in den erzeugten Mutanten sowie in *S. hawaiiensis* zu untersuchen, wurden Zellextrakte der im Bioassay getesteten Stämme mittels Western Blots analysiert (Abbildung 47).

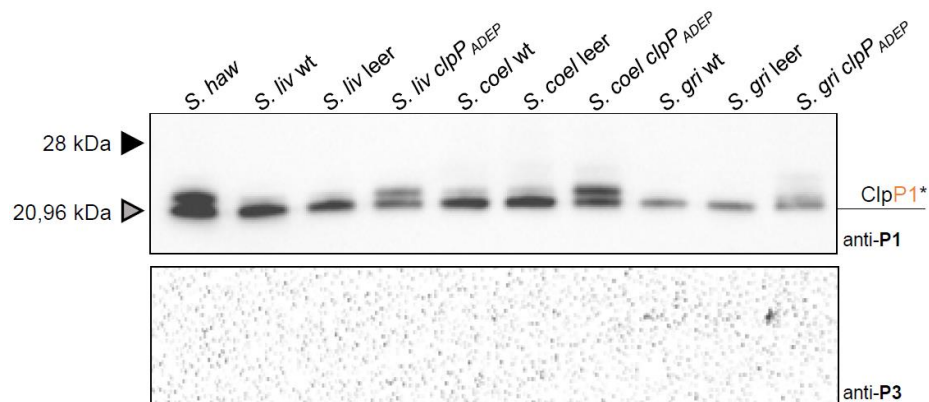


Abbildung 47: Western Blot-Analyse verschiedener *clpP*_{ADEP}-tragender *Streptomyces*-Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Stämmen und *S. hawaiiensis*. *S. haw*: *S. hawaiiensis*; *S. liv*: *S. lividans* TK24; *S. coel*: *S. coelicolor* A3(2); Wt: Wildtyp; leer: pSET152ermE* Δ HindIII; *clpP*_{ADEP}: pSET152*clpP*_{ADEP}. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Bei keinem der getesteten Stämme wurde ein Signal mit dem anti-ClpP3-Antikörper detektiert, womit eine Beteiligung von ClpP3 am durch ClpP_{ADEP} vermittelten Resistenzmechanismus gegen ADEP nicht nur für *S. griseus*, sondern auch für die beiden weiteren getesteten Spezies sowie für *S. hawaiiensis* ausgeschlossen werden konnte. Mit dem anti-ClpP1-Antikörper wurde in allen Proben eine prägnante Bande detektiert, die in vorherigen Western Blots (4.5.2.3) prozessiertem ClpP1 zugeordnet werden konnte. Bei allen ClpP_{ADEP}-exprimierenden Stämmen, inklusive *S. hawaiiensis*, trat außerdem eine etwas höher laufende, zweite Bande auf (bei *S. griseus* pSET*clpP*_{ADEP} schwächer und diffus), die entweder eine (aufgrund der Größe vermutlich prozessierte) Form von ClpP_{ADEP} oder, abgeleitet vom Bandenshift im Vergleich zur prozessierten ClpP1-Bande, auch unprozessiertes ClpP1 sein könnte (vgl. unprozessiertes ClpP1kurz in **Abbildung 41** und **Abbildung 48** sowie unprozessiertes ClpP_{ADEP} in **Abbildung 48**). Um diese und weitere Fragen bezüglich des Resistenzmechanismus zu beantworten, wurden umfassende *in vivo*-Experimente zur ClpP_{ADEP}-Expression in *S. lividans* TK24 und den in diesem Stamm erzeugten *clpP*-Knockout-Mutanten durchgeführt.

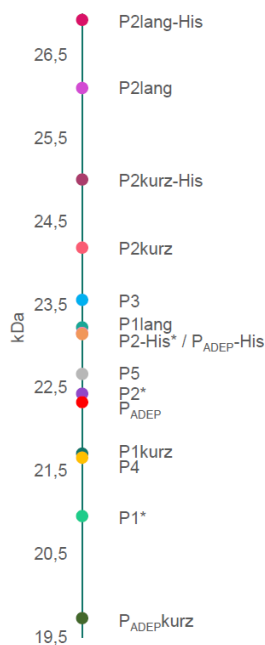


Abbildung 48: Erwartete Größen der ClpP-Proteine in *S. lividans* TK24 und den in diesem Stammhintergrund erzeugten Knockout-Mutanten sowie mit verschiedenen Konstrukten komplementierten Mutanten. Prozessierte ClpP-Versionen sind mit einem Stern gekennzeichnet. ClpP_{ADEP}kurz ist eine um 23 Aminosäuren verkürzte Version von ClpP_{ADEP}, die erzeugt wurde, um die Lage der Prozessierungsstelle durch Größenvergleiche im Western Blot abzuschätzen.

4.5.3.2 Kontrollierte Expression von ClpP_{ADEP} in *S. lividans* TK24 und *clpP*-Knockout-Mutanten

Mit Hilfe einer *S. lividans* TK24-Mutante, bei der die ClpP_{ADEP}-Expression durch einen *tipA*-Promotor regulierbar ist (*S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}), konnte die ADEP-Sensitivität des Stammes in Abhängigkeit von der Expressionsstärke von ClpP_{ADEP} untersucht werden. Dazu wurde *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP} in Bioassays bei steigenden Induktorkonzentrationen (0-20 µg/ml Thioestrepton) gegen 10 µg ADEP1 getestet. In **Abbildung 49** veranschaulichen die mit steigender Thioestrepton-Konzentration immer kleiner werdenden Hemmhöfe die zunehmende ADEP-Resistenz von *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP} bei zunehmender Expression von ClpP_{ADEP}.

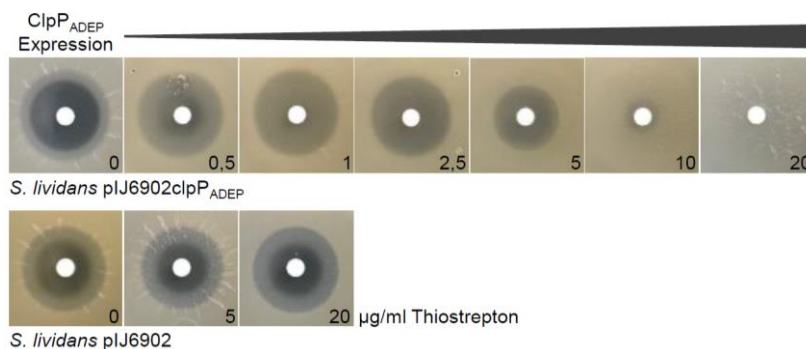


Abbildung 49: ADEP-Sensitivität einer induzierbaren *S. lividans* *clpP*_{ADEP}-Mutante (*S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}, obere Reihe) sowie einer Leervektorkontrolle (*S. lividans* pIJ6902, untere Reihe). Die Stämme wurden auf Müller-Hinton-Agar mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert und gegen 10 µg ADEP1 auf Papierfiltern getestet.

Bei einer Western Blot-Analyse mit Zellextrakten von *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}, die aus Kulturen gewonnen wurden, die ebenfalls mit steigenden Thioestrepton-Konzentrationen angezogen worden waren, konnte eine stetige Zunahme des Signals der bereits in Kapitel 4.5.3.1 beschriebenen, zusätzlichen Bande beobachtet werden (**Abbildung 50**).

Um zu testen, ob es sich bei dieser Bande um das ansteigend exprimierte ClpP_{ADEP} oder möglicherweise um eine unprozessierte Form von ClpP1 handelt, wurde ein weiteres Konstrukt

zur induzierbaren Expression von ClpP_{ADEP} mit C-terminalem His₆-Tag erzeugt (pIJ6902clpP_{ADEP}-His, Vektorkarte in 6.2.2.2). Dieses Konstrukt wurde in *S. lividans* TK24 sowie in die $\Delta clpP1$ - und die $\Delta clpP1P2$ -Mutante eingebracht und Zellextrakte ohne (0 μ g/ml Thiostrepton) oder mit induzierter ClpP_{ADEP}-Expression (20 μ g/ml Thiostrepton) in Western Blots getestet (**Abbildung 51**).

Für die im Wildtyp-Hintergrund ClpP_{ADEP} oder ClpP_{ADEP}-His exprimierenden Stämme (*S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP} und *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}-His) konnte mit einer Bande für prozessiertes ClpP1 und der beschriebenen zusätzlichen Bande ein einheitliches Bandenmuster detektiert werden (**Abbildung 51A**). Da ClpP_{ADEP}-His aufgrund seines höheren Molekulargewichtes im Vergleich zu ClpP_{ADEP} als höher laufende Bande detektierbar sein sollte (**Abbildung 48**), wurde dies als erstes Indiz dafür gewertet, dass es sich bei der zusätzlichen Bande nicht um ClpP_{ADEP} bzw. ClpP_{ADEP}-His handeln kann.

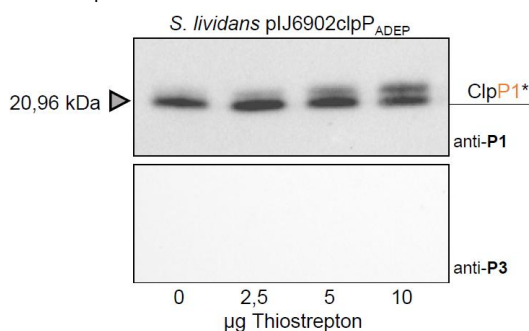


Abbildung 50: Western Blot-Analyse von Zellextrakten von *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}, die mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert worden sind (0-10 μ g/ml Thiostrepton). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Bei der Expression von ClpP_{ADEP} oder ClpP_{ADEP}-His im $\Delta clpP1$ -Stamm wurde dieser Größenunterschied von ClpP_{ADEP} zu ClpP_{ADEP}-His detektierbar, da der anti-ClpP1-Antikörper aufgrund von fehlendem ClpP1 unter diesen Bedingungen unspezifisch an ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His und ClpP3 band (**Abbildung 51B**). In der hier gezeigten Testreihe wurde ClpP_{ADEP}-His leider wesentlich schwächer detektiert als ClpP_{ADEP}, möglicherweise durch eine geringere Expression, durch eine geringere Affinität des Antikörpers zum His₆-getaggten ClpP_{ADEP} oder durch eine schlechte Übertragung des Randbereichs von der SDS-PAGE auf die Nitrocellulosemembran. Durch das Wiederholen des in **Abbildung 52B** gezeigten Western Blots mit der doppelten Menge an Zellextrakt konnte ein eindeutiges Ergebnis erzielt werden (**Abbildung 63**).

Beim Vergleich der Laufhöhe der ClpP_{ADEP}-Bande in **Abbildung 51B** mit der zusätzlichen Bande im Western Blot in **Abbildung 51A** wurde deutlich, dass es sich bei dieser nicht um ClpP_{ADEP} handeln kann. Demnach entspricht diese Bande höchstwahrscheinlich unprozessiertem ClpP1, so dass ClpP1 in Anwesenheit von ClpP_{ADEP} langsamer oder vermindert prozessiert zu werden scheint.

Es konnte außerdem für die induzierten Proben von *S. lividans* $\Delta clpP1$ pIJ6902clpP_{ADEP} und *S. lividans* $\Delta clpP1$ pIJ6902clpP_{ADEP}-His im Vergleich zu den Proben ohne Induktor ein fast vollständiges Verschwinden der ClpP3-Bande beobachtet werden. Interessanterweise trat dieser Effekt der ClpP_{ADEP}-Expression auf ClpP3 im $\Delta clpP1P2$ -Stamm aber nicht auf (**Abbildung 51C**). Hier wurde für die induzierten Proben eine starke Expression von ClpP3 mit dem spezifischen anti-ClpP3-Antikörper als auch mit dem unspezifisch bindenden anti-ClpP1-Antikörper detektiert.

Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass ClpP_{ADEP} bzw. ClpP_{ADEP}-His allein (*S. lividans* $\Delta clpP1P2$ pIJ6902clpP_{ADEP} bzw. *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ pIJ6902clpP_{ADEP}-His) nicht in der Lage ist PopR abzubauen, so dass die ClpP3-Bande bestehen bleibt. ClpP2, welches in den $\Delta clpP1$ -Stämmen *S. lividans* $\Delta clpP1$ pIJ6902clpP_{ADEP} bzw. *S. lividans* $\Delta clpP1$ pIJ6902clpP_{ADEP}-His weiterhin exprimiert wurde, scheint somit ein potentieller Interaktionspartner für ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His zu sein und gemeinsam mit ClpP_{ADEP} den PopR-Abbau zu vermitteln.

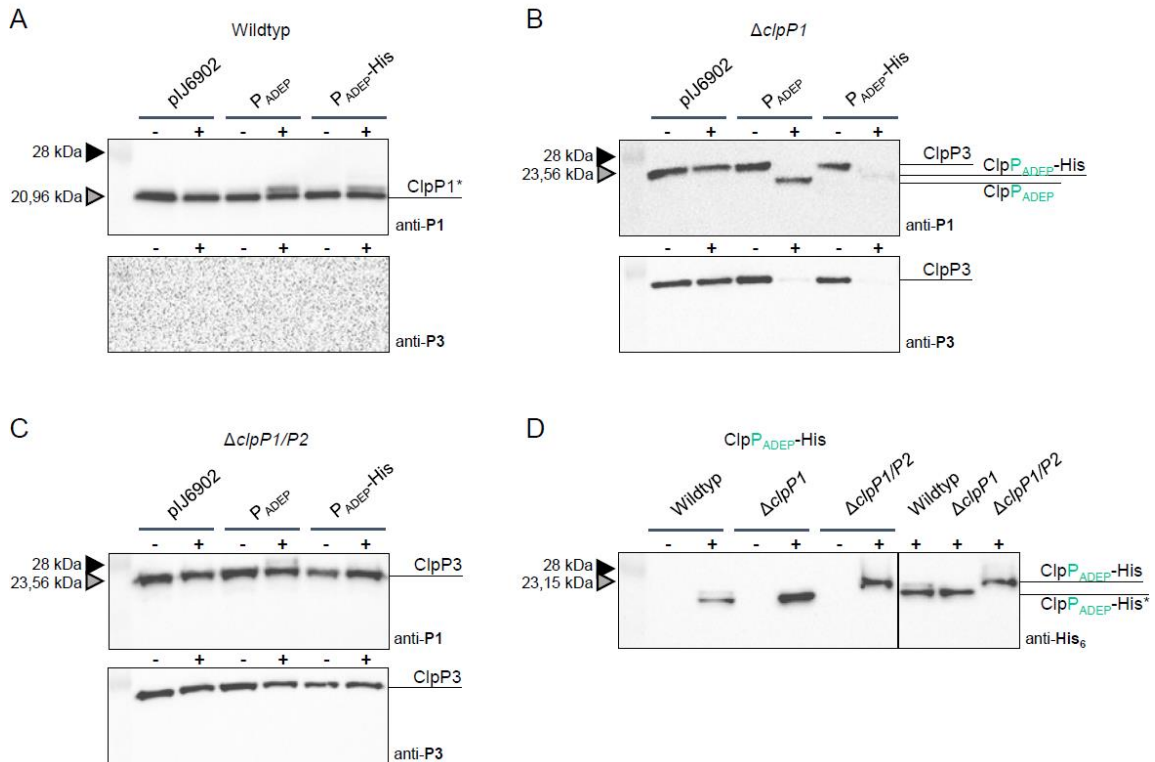


Abbildung 51: Induzierte Expression von ClpP_{ADEP} (P_{ADEP}) bzw. ClpP_{ADEP}-His (P_{ADEP}-His) in A) *S. lividans* TK24 (Wildtyp), B) *S. lividans* $\Delta clpP1$ ($\Delta clpP1$) und C) *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ ($\Delta clpP1P2$). Zellextrakte wurden aus Kulturen hergestellt, die für zwei Tage ohne Induktor (-) oder mit 20 μ g/ml ThioStrepton (+) angezogen wurden. Stämme mit pIJ6902 dienen als Leervektorkontrolle. Obere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1); untere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Die aufgetragene Proteinmenge pro Extrakt betrug 50 μ g. Einzige Ausnahme stellten die Extrakte der *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ -Mutanten dar, da hier mit 50 μ g kein Signal detektiert werden konnte, so dass 100 μ g (anti-P3) bzw. 300 μ g (anti-P1 und anti-His₆) aufgetragen wurden. D) Zellextrakte aller *clpP*_{ADEP}-His tragenden Stämme wurden mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆) detektiert. Um den Bandenshift von ClpP_{ADEP}-His durch das Ausbleiben der Prozessierung in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ zu verdeutlichen, wurden die induzierten Proben rechts ein zweites Mal direkt nebeneinander aufgetragen. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Für ClpP_{ADEP} bzw. ClpP_{ADEP}-His konnte im $\Delta clpP1P2$ -Hintergrund im Gegensatz zum $\Delta clpP1$ -Hintergrund mit dem anti-ClpP1-Antikörper kein Signal detektiert werden. Da die Anwesenheit von ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ pIJ6902clpP_{ADEP}-His mit einem spezifischen anti-His₆-Antikörper bestätigt werden konnte, passiert dies entweder durch ein geringeres Expressionslevel im Vergleich zum $\Delta clpP1$ -Stamm oder durch eine höhere Affinität des anti-ClpP1-Antikörpers für ClpP3 als für ClpP_{ADEP}, so dass ClpP_{ADEP} erst detektiert werden kann, wenn ClpP3 nicht in großen Mengen im Zellextrakt vorhanden ist (Abbildung 51D).

Bei der Detektion der *clpP*_{ADEP}-His-Mutanten aller Stammhintergründe mit einem anti-His₆-Antikörper wurde ein Größenunterschied zwischen ClpP_{ADEP}-His im Wildtyp- und $\Delta clpP1$ -Hintergrund im Vergleich zum $\Delta clpP1P2$ -Stamm deutlich (Abbildung 51D). Somit scheint die Anwesenheit von ClpP2 zusammen mit ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His neben dem PopR-Abbau auch eine

Prozessierung von ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His zu ermöglichen. Interessant war an dieser Stelle, dass die Prozessierung von ClpP_{ADEP}-His im Wildtyp, also in Anwesenheit von ClpP1, ClpP2 und ClpP_{ADEP}-His, ineffizienter zu sein schien, als in der $\Delta clpP1$ -Mutante ohne ClpP1 (erkennbar an der schwachen Bande von unprozessierten ClpP_{ADEP}, die in Gegenwart von ClpP1 sichtbar blieb). Dies ließ eine Analogie zur verlangsamten Prozessierung von ClpP1 im Wildtyp bei Expression von ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His vermuten.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde die Hypothese aufgestellt, dass ClpP_{ADEP} bei der Resistenzvermittlung vermutlich mehrere Aufgaben in der Zelle erfüllt. Aus den Western Blot-Analysen der Zellextrakte von *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP} (**Abbildung 51A**) wurde ersichtlich, dass das ADEP-sensitive ClpP1 unter den getesteten Bedingungen immer präsent ist und in Gegenwart von ClpP_{ADEP} nicht abgebaut wird, um die Zelle vor dem Einfluss von ADEP zu schützen. Somit muss es auf eine andere Art und Weise detoxifiziert werden, höchstwahrscheinlich durch eine Interaktion mit ClpP_{ADEP}, die zu einer Verzögerung der Prozessierung von ClpP1 als auch von ClpP_{ADEP} selbst führt.

Auf der anderen Seite muss die physiologische Funktion der Clp-Maschinerie trotz des „Ruhigstellens“ von ClpP1 weiter ablaufen. Da ClpP3 und ClpP4 trotz ihrer ADEP-Insensitivität nicht exprimiert werden, wenn ClpP_{ADEP} im Wildtyp-Hintergrund präsent ist, muss der Transkriptionsaktivator PopR effizient abgebaut werden. Bei induzierter ClpP_{ADEP}-Expression im $\Delta clpP1$ -Hintergrund wurde im Western Blot ein Verschwinden der ClpP3-Bande beobachtet, allerdings nicht im $\Delta clpP1P2$ -Hintergrund (**Abbildung 51B und C**). Dies deutet auf eine Interaktion von ClpP_{ADEP} mit ClpP2 als neuem Partner anstelle von ClpP1 hin.

In Folgeexperimenten sollten diese Hypothesen durch kombinierte Expression der möglichen Interaktionspartner in den *S. lividans*-Knockout-Mutanten bestätigt werden.

4.5.3.3 Kombinierte Expression von ClpP_{ADEP} und ClpP1

Um Hinweise auf eine mögliche Interaktion von ClpP_{ADEP} mit ClpP1 als detoxifizierender Anteil des Resistenzmechanismus zu erhalten, sollten diese zusammen, unabhängig von ClpP2, in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ exprimiert werden.

Wie in Kapitel 4.5.2.3 gezeigt werden konnte, ist der physiologische Translationsstart von ClpP1 das zweite der beiden möglichen Startcodons. Konstitutiv von einem Plasmid exprimiertes ClpP1 wird im $\Delta clpP1P2$ -Hintergrund nicht prozessiert, da ClpP2 als Interaktionspartner fehlt und ebenso konnte die Anwesenheit von ClpP3 nachgewiesen werden, was den Abbau von PopR durch ClpP1 allein ausschließt (**Abbildung 41**). Eine ähnliche Situation wurde auch für ClpP_{ADEP} bei induzierter Expression im $\Delta clpP1P2$ -Hintergrund beobachtet, welches in Abwesenheit von ClpP2 ebenfalls nicht prozessiert wurde und auch kein PopR abbaute (**Abbildung 51C und D**).

Um zu testen, ob sich die Anwesenheit von ClpP_{ADEP} auf den Expressionsstart von ClpP1 auswirkt sowie zur Bildung eines proteolytisch aktiven Komplexes und somit zur Prozessierung der ClpP-Homologe oder zum Abbau von PopR führt, wurden beide Konstrukte zur Expression von ClpP1 (pIJ12551clpP1kurz und pIJ12551clpP1lang) mit pIJ10257clpP_{ADEP} in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ kombiniert (*S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1kurz+P_{ADEP}, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1lang+P_{ADEP}). Zellextrakte dieser Stämme wurden in Western Blots getestet. In beiden Proben wurde mit dem anti-ClpP1-Antikörper eine Bande von unprozessiertem ClpP1 detektiert (vgl. mit *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1kurz, *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P1lang in **Abbildung 52** sowie **Abbildung 41**) sowie mit

dem anti-ClpP3-Antikörper eine ClpP3-Bande. Somit kam es in keiner der getesteten Kombinationen zu einer Prozessierung von ClpP1 oder zum Abbau von PopR. Ebenso wurde die Expression von ClpP1 vom zweiten Startcodon (ClpP1kurz) auch in Anwesenheit von ClpP_{ADEP} bestätigt.

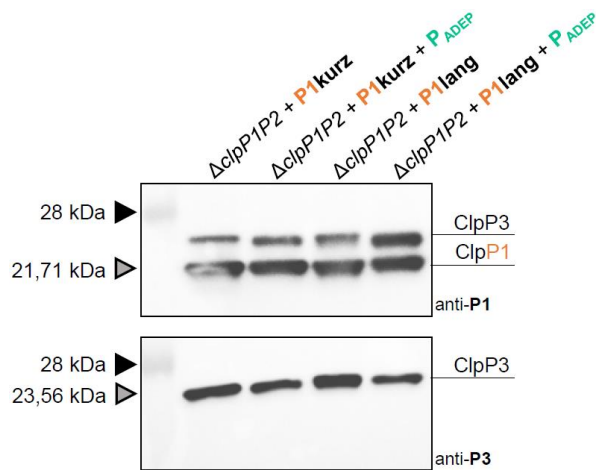


Abbildung 52: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP1kurz oder ClpP1lang und ClpP_{ADEP} in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

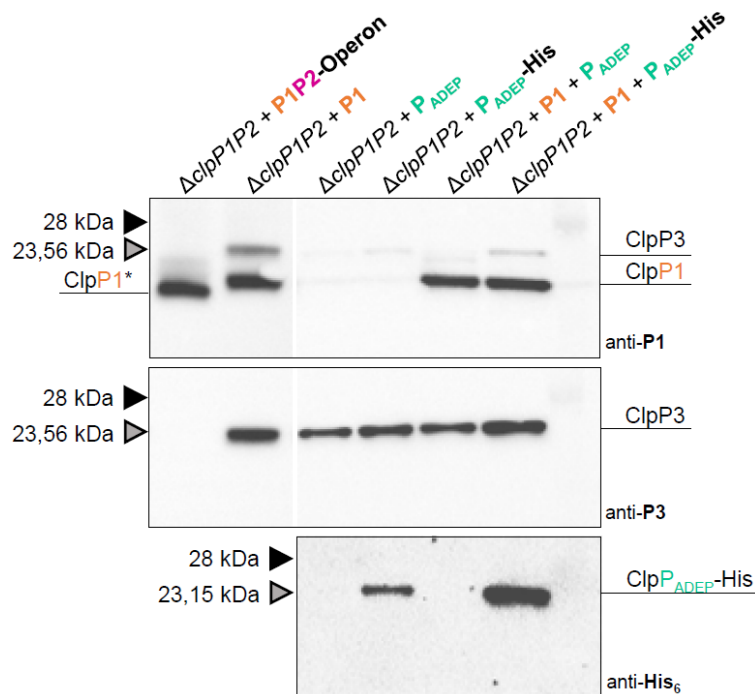


Abbildung 53: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP1kurz und ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

In einem weiteren Experiment wurden ClpP1kurz und ClpP_{ADEP}-His gemeinsam in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ exprimiert (*S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1_{kurz} + P_{ADEP}\text{-His}$), um mit einem anti-His₆-Antikörper eine mögliche Prozessierung von ClpP_{ADEP}-His durch ClpP1 detektieren zu können (Abbildung 53). Die Western Blot-Analyse ergab aber keine Veränderung der Bandenhöhe im Vergleich zum

Zellextrakt von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP}$ -His. Somit konnte durch Kombination von ClpP1 und ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His keine Veränderung im Vergleich zur einzelnen Expression der Enzyme detektiert werden. ClpP1 und ClpP_{ADEP} scheinen daher keinen proteolytisch aktiven Komplex zu bilden.

Im Gegensatz dazu konnte im Bioassay zur Bestimmung der ADEP-Sensitivität ein deutlicher Effekt bei der Expression von ClpP1 zusammen mit ClpP_{ADEP} (*S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz + P_{ADEP}$) im Vergleich zu ClpP1 allein beobachtet werden. In Kapitel 4.5.2.4 wurde bereits beschrieben, dass die Anwesenheit von ClpP1 unabhängig von den anderen ClpP-Proteinen in *S. lividans* TK24 eine ADEP-Sensitivität hervorruft (Abbildung 45). Im Bioassay mit *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz + P_{ADEP}$ wurde ersichtlich, dass diese durch ClpP1 vermittelte Sensitivität bei gemeinsamer Expression von ClpP1 und ClpP_{ADEP} komplett aufgehoben wird (Abbildung 54).

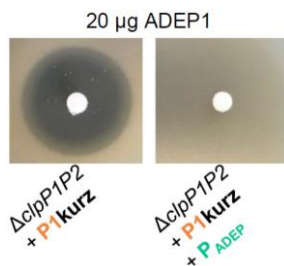


Abbildung 54: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P1kurz + P_{ADEP}$ gegen 20 µg ADEP1.

Somit muss eine Interaktion stattfinden, die aber weder eine Prozessierung noch einen PopR-Abbau bewirkt, sondern entweder ADEP durch eine hohe Affinität zu ClpP_{ADEP} von ClpP1 fernhält oder ADEP-aktiviertes ClpP1 durch eine direkte Interaktion von ClpP_{ADEP} mit ClpP1 detoxifiziert.

4.5.3.4 Kombinierte Expression von ClpP_{ADEP} und ClpP2

Analog zu den Experimenten mit ClpP1 und ClpP_{ADEP} sollten auch ClpP2 und ClpP_{ADEP} kombiniert in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ exprimiert werden, um eine mögliche Interaktion unabhängig von ClpP1 visualisieren zu können.

In vorherigen Zellextraktexperimenten konnte gezeigt werden, dass ClpP2 und ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His bei jeweils einzelner Expression (*S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2kurz$, *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang$, *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP}$ bzw. *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP}$ -His) nicht prozessiert werden und PopR nicht abgebaut wird (Abbildung 42, Abbildung 51D). Außerdem war bereits bekannt, dass nur ClpP2lang, nicht aber ClpP2kurz, mit ClpP1 zusammen zu einer vollständigen Prozessierung beider ClpP-Homologe und zum PopR-Abbau führt (Abbildung 42).

So wurden Zellextrakte von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2kurz + P_{ADEP}$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang + P_{ADEP}$ in Western Blots analysiert, um auch hier beide möglichen Versionen von ClpP2 (ClpP2kurz und ClpP2lang) auf ihr Interaktionspotential mit ClpP_{ADEP} zu testen.

Im Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2kurz + P_{ADEP}$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang + P_{ADEP}$ konnte eine deutliche Interaktion lediglich zwischen ClpP_{ADEP} und ClpP2lang beobachtet werden, die sich in Form einer Prozessierung von ClpP2lang (Verschwinden der unprozessierten Bande im Vergleich zu *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang$) und einem Abbau von PopR äußerte (Verschwinden der ClpP3-Bande) (Abbildung 55). Der längere N-Terminus von ClpP2lang im Vergleich zu ClpP2kurz schien dabei, wie auch bei der Interaktion mit ClpP1, essentiell zu sein. Die unterste Bande im mit dem anti-ClpP1-Antikörper detektierten

Western Blot konnte nicht eindeutig zugeordnet werden. Hierbei könnte es sich, abgeleitet von der Laufhöhe, um prozessiertes ClpP2, prozessiertes ClpP_{ADEP} oder auch ClpP4 handeln, das ebenfalls in der Zelle vorhanden sein müsste, wenn ClpP3 präsent ist (Abbildung 48).

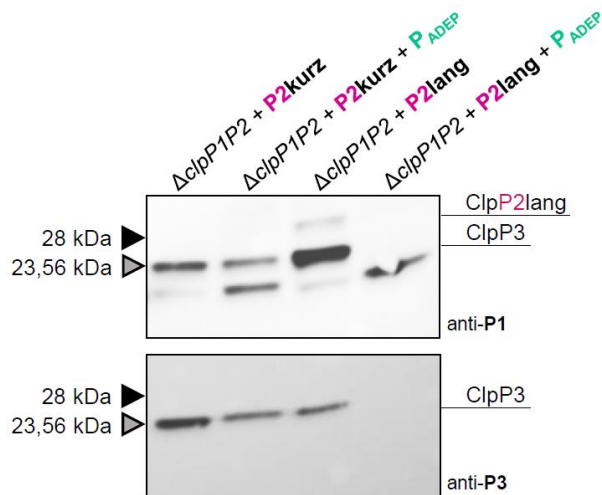


Abbildung 55: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP2kurz oder ClpP2lang und ClpP_{ADEP} in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Um die Prozessierung von ClpP2 zu verdeutlichen und auch eine mögliche Prozessierung von ClpP_{ADEP} detektieren zu können, wurden Stämme mit His₆-getaggtten Versionen der Proteine erzeugt. Im Western Blot mit Extrakten dieser (*S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang + P_{ADEP}$ -His und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP} + P2lang$ -His) und anderer Mutanten konnte eine Interaktion von ClpP2/ClpP2-His und ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His in Form einer Prozessierung beider Proteine sowie einem PopR-Abbau erneut bestätigt werden (Abbildung 56).

Interessanterweise konnte mit dem anti-His₆-Antikörper bei ClpP2lang-His in *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P2lang$ -His eine prozessierte Form beobachtet werden, die nicht der vollständig prozessierten Form entspricht. Es ist zu vermuten, dass diese in Abbildung 56 mit ClpP2lang-His(*) gekennzeichnete Form entweder durch Autoprozessierung oder durch anwesendes ClpP3/ClpP4 entsteht. Dieses teilprozessierte ClpP2lang-His(*) konnte zu einem geringen Anteil auch im Zellextrakt von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP} + P2lang$ -His beobachtet werden. Durch die Anwesenheit von ClpP_{ADEP} lag ClpP2-His hier aber überwiegend vollständig prozessiert vor. Möglicherweise läuft die Prozessierung von ClpP2 daher immer zunächst über die beschriebene, teilprozessierte Form ab und es ist möglich, dass ClpP2 sich selbst, unabhängig von anderen ClpP-Homologen, teilprozessiert.

Des Weiteren lagen ClpP2 und ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His in den Zellextrakten von *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP} + P2lang$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP}$ -His + P2lang vollständig prozessiert vor und es konnte ein vollständiges Verschwinden der ClpP3-Bande beobachtet werden. Lediglich in *S. lividans* $\Delta clpP1P2 + P_{ADEP} + P2lang$ -His konnten noch Banden für die un- und teilprozessierten Formen von ClpP2lang-His sowie eine ClpP3-Bande detektiert werden. Somit scheint der zusätzliche His₆-Tag an ClpP2lang Auswirkungen auf die Interaktion mit ClpP_{ADEP} oder die Proteaseaktivität zu haben und sollte in weiteren Experimenten gemieden werden.

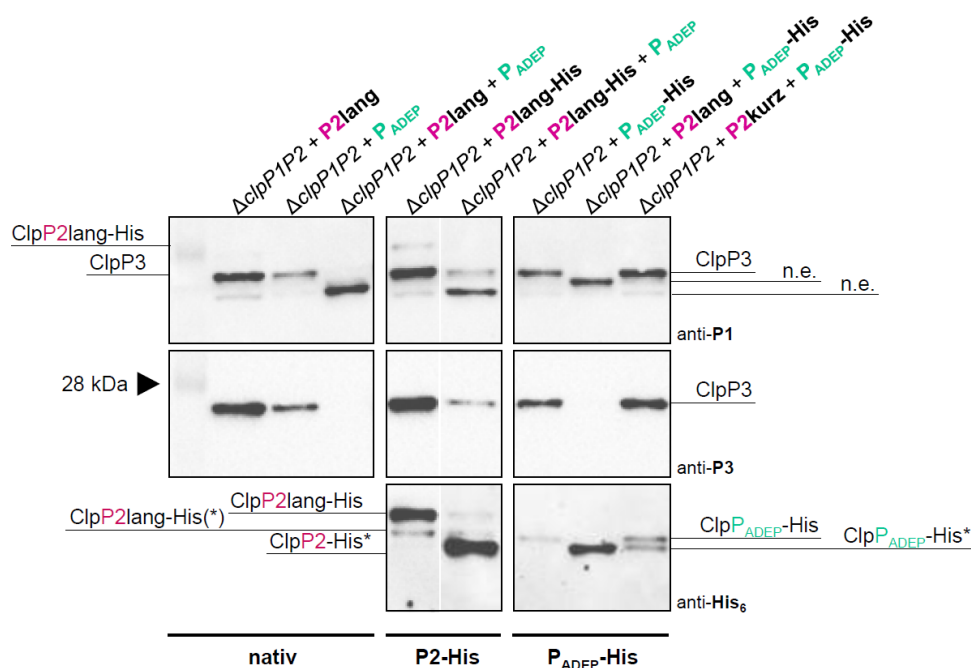


Abbildung 56: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP2lang/ClpP2lang-His und ClpPADEP/ClpPADEP-His in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). n.e.: Banden konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Prozessierte Formen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (*SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard*), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs.

Analog zur Kombination von ClpP1 mit ClpP2kurz (Abbildung 42), wurde auch für ClpPADEP-His und ClpP2kurz eine unvollständige Prozessierung von ClpPADEP-His und ein unvollständiger PopR-Abbau beobachtet (Abbildung 56, rechts). Somit scheint der vollständige N-Terminus von ClpP2lang auch für die Interaktion von ClpPADEP mit ClpP2 unabdingbar, obwohl die vermutlich durch Autoprozessierung entstehende, teilprozessierte Bande von ClpP2 nach Abschätzen der Größe auf dem Western Blot eine ähnliche Größe wie die vom zweiten Startcodon exprimierte Form ClpP2kurz aufweist.

Auf der Basis dieser Beobachtungen ist davon auszugehen, dass im Rahmen des ClpPADEP-vermittelten Resistenzmechanismus ein Heteromer aus ClpP2 und ClpPADEP entsteht, das proteolytisch ausreichend funktional zu sein scheint, um die Expression von ClpP3 und ClpP4 durch den Abbau von PopR zu unterbinden und dem jeweiligen Stamm als ADEP-resistenter Clp-Protease-Komplex das Überleben zu sichern.

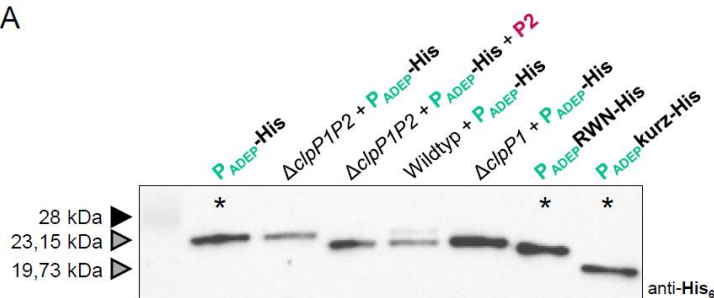
Die Resistenzvermittlung in *S. hawaiiensis* scheint somit vergleichbar neuartig und komplex zu sein wie der Wirkmechanismus von ADEP an ClpP. Während eine Interaktion des Resistenzfaktors ClpPADEP mit ClpP1 den Effekt der ADEP-vermittelten Überaktivierung aufzuheben und ClpP1 zu detoxifizieren scheint, entsteht durch eine Interaktion von ClpPADEP mit ClpP2 vermutlich ein funktionaler Komplex, der die verlorenen Zellfunktionen des ClpP1/ClpP2-Komplexes übernimmt.

4.5.3.5 Prozessierung von ClpPADEP

Mit den zuvor beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass ClpPADEP, wie ClpP1 und ClpP2, prozessiert wird, um in der Zelle proteolytisch aktive Komplexe zu bilden. Um die Prozessierungsstelle zu ermitteln, wurde zunächst versucht das prozessierte ClpPADEP-His nach

Expression in *S. lividans* TK24 und *S. lividans* $\Delta clpP1$ über den His₆-Tag mittels IMAC aufzureinigen und die Sequenz des N-Terminus mittels Edman-Abbau zu bestimmen. Die Konzentration von ClpP_{ADEP}-His sowie die Reinheit der Probe waren aber zu gering für diese Methode. Daher konnte bisher lediglich die Region, in der die Prozessierung mutmaßlich stattfindet, durch einen Vergleich der detektierten Banden verschiedener Proben im Western Blot abgeschätzt werden. Dazu wurden Zellextrakte verwendet, bei denen eine Prozessierung von ClpP_{ADEP}-His bereits in Western Blot-Experimenten bestätigt werden konnte (4.5.3.4) sowie in *E. coli* überexprimierte und aufgereinigte ClpP_{ADEP}-His-Versionen mit verschiedenen Expressionsstarts (P_{ADEP}-His (Volllänge), P_{ADEP}-RWN-His (um 15 AS verkürzt) und P_{ADEP}kurz-His (um 23 AS verkürzt) von Laura Reinhardt; unveröffentlicht) (Abbildung 57).

A



B

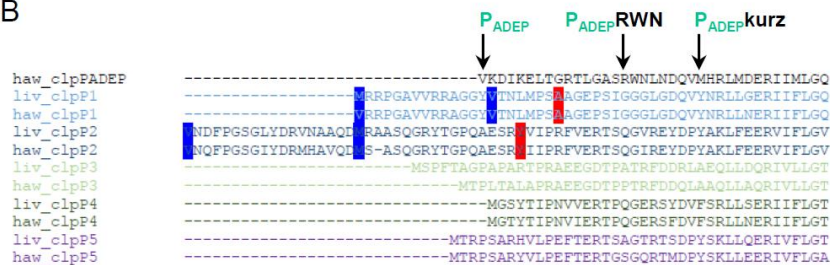


Abbildung 57: Größenvergleich verschiedener prozessierter und nicht prozessierter ClpP_{ADEP}-His-Proteine mittels Western Blot zur Abschätzung der Lage der N-terminalen Prozessierungsstelle. A) Die mit einem Stern markierten Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und über ein His₆-Tag aufgereinigt (Laura Reinhardt, unveröffentlicht). Bei allen weiteren Proben handelt es sich um Zellextrakte von ClpP_{ADEP}-His exprimierenden *S. lividans* TK24-, *S. lividans* $\Delta clpP1$ - und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ -Stämmen. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. B) Die Translationsstarts der verschiedenen ClpP_{ADEP}-His-Versionen sind im Kontext der N-Termini verschiedener ClpP-Homologe dargestellt (vgl. Abbildung 38). Die tatsächliche Prozessierungsstelle von ClpP_{ADEP}-His liegt, wie aus A) ersichtlich, zwischen den Translationsstarts von P_{ADEP}-His und P_{ADEP}^{RWN}-His. Mögliche Translationsstarts von ClpP1 und ClpP2 sind blau markiert. Die für *S. lividans* bestätigten Prozessierungsstellen von ClpP1 und ClpP2 sind rot markiert.

Durch einen Vergleich der Laufhöhen der ClpP_{ADEP}-His-Banden wurde ersichtlich, dass die *in vivo*-prozessierten ClpP_{ADEP}-His-Proteine der Zellextraktproben (*S. lividans* $\Delta clpP1P2$ +P_{ADEP}-His+P2lang, *S. lividans*+P_{ADEP}-His und *S. lividans* $\Delta clpP1$ +P_{ADEP}-His) zwischen dem aus *E. coli* aufgereinigten Vollängen-P_{ADEP}-His und der verkürzten Version P_{ADEP}-RWN-His liegen (Abbildung 57A). Somit muss sich die tatsächliche Prozessierungsstelle innerhalb der ersten 16 Aminosäuren des N-Terminus befinden. Der Vergleich der Laufhöhen der verschiedenen Banden lässt eine Prozessierungsstelle an einer ähnlichen Stelle wie bei ClpP1 vermuten, wohingegen im Western Blot in Abbildung 56 die prozessierten Banden von ClpP2-His und ClpP_{ADEP}-His auf der selben Höhe auftreten (Abbildung 57B).

5 Diskussion

Die erste Veröffentlichung über ADEPs und ihren Wirkmechanismus erregte Aufmerksamkeit in der Wissenschaftswelt, da hier eine neue Substanzklasse mit hoher antibiotischer Potenz aber geringer Zytotoxizität und einem absolut neuartigen Target beschrieben worden war (Brötz-Oesterhelt et al., 2005). Die Kombination mit Rifampicin gegen persistierende Zellen zeigte eine weitere mögliche Anwendungen und die Potenz der ADEPs auf (Conlon et al., 2013). Kürzlich wurden außerdem neue ADEP-Derivate mit erhöhter Affinität zu humanem ClpP vorgestellt, und es wurde ein therapeutisches Potential für die Krebstherapie diskutiert (Wong et al., 2018).

Auch abseits der medizinischen Aspekte stellen ADEPs wertvolle Werkzeuge für die Grundlagenforschung dar, da sie sich als sehr nützlich erwiesen haben, um die Funktion der Clp-Maschinerien verschiedener Organismen und ihre Rolle in der Zelle zu untersuchen.

In dieser Arbeit wurde die ADEP-Produktion von *S. hawaiiensis* charakterisiert, wodurch ein schnelles und unkompliziertes Aufreinigungsverfahren für ADEP1 aus dem Kulturüberstand entwickelt werden konnte, so dass der Naturstoff für Folgeexperimente im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stand und folglich zukünftig auch von anderen Arbeitsgruppen nach diesem Verfahren gereinigt werden kann.

Des Weiteren wurde das ADEP-Biosynthesegencluster identifiziert und analysiert, wobei das *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}* als neuartiger Resistenzfaktor beschrieben werden konnte. Da *S. hawaiiensis* nicht ausreichend genetisch modifizierbar war, wurden Experimente bezüglich Funktion und Funktionalität der ClpP-Homologe in *S. lividans* TK24 durchgeführt und der Mechanismus der durch ClpP_{ADEP} vermittelten Resistenz in diesem Organismus untersucht, um letztendlich auf den Selbstschutzmechanismus des ADEP-Produzenten *S. hawaiiensis* rückschließen zu können.

5.1 Die konstitutive ADEP-Produktion von *S. hawaiiensis* ermöglicht ein robustes Aufreinigungsverfahren für ADEP1 aus dem Kulturüberstand im kleinen Maßstab

Die Expression von Antibiotika-Biosynthesegenclustern und anderen Sekundärmetabolitgenclustern in Streptomyceten ist normalerweise an den Entwicklungszyklus des jeweiligen Produzenten gekoppelt. Während die Trophophase in erster Linie auf das schnelle Zellwachstum abzielt und die dafür notwendigen Primärmetabolite produziert werden, beginnt mit der stationären Wachstumsphase und entstehenden Nährstoffdefiziten die Ideophase, in der der Fokus auf die Produktion von Sekundärmetaboliten zur Generation eines Selektionsvorteils anstelle des Wachstum gelegt wird. Bedingt durch das Wachstum in Hyphenpellets verschwimmen die Phasen häufig, da innerhalb eines Pellets Zellen in unterschiedlichen Wachstumsphasen vorliegen können. Das Inokkulieren mit Sporen statt Mycel kann helfen eine deutlichere Phasentrennung zu sehen, da dann noch keine Ideophasen-Enzyme produziert wurden, die mit in die Hauptkultur übertragen werden (Cundliffe and Demain, 2010; Doull and Vining, 1990).

Auf Grundlage dieses Wissens wurde *S. hawaiiensis* zur Charakterisierung des Wachstums und der ADEP-Produktion, aber auch für *clpP*-Expressionsanalysen und die Gewinnung von Zellextrakten immer mit Sporen angeimpft. Der Stamm war unter den genutzten Bedingungen

ein verlässlicher Antibiotikaproduzent und sekretierte ADEPs in allen getesteten Medien (**Abbildung 16**). Detektierbare Mengen ADEP wurden im gewählten Produktionsmedium YM-MilliQ bereits zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase produziert, so dass die ADEP-Konzentration in der Kultur proportional zur Biomasse anstieg, über die stationäre Phase hinweg nahezu konstant blieb und in der Absterbephase ebenfalls proportional zur Biomasse abnahm (**Abbildung 17**). Diese scheinbar konstitutive Expression des *ade*-BGC ist ungewöhnlich im Vergleich zur Sekundärmetabolitproduktion anderer Streptomycceten, insbesondere im Hinblick auf viele Biosynthesegencluster, die unter Laborbedingungen gar nicht transkribiert werden, also *silent* (engl. für stumm, still, ruhig) sind (Rutledge and Challis, 2015). Die Regulation des *ade*-BGC wäre somit ein interessantes Thema für zukünftige Studien. Eine konstitutive ADEP-Produktion könnte im natürlichen Habitat von Vorteil sein, um die Nährstoffversorgung durch das Ausschalten von konkurrierenden Bakterien sicherzustellen (Van Der Heul et al., 2018). Allerdings sind hohe Produktionslevel energetisch kostspielig und kommen auch resistenten Nicht-ADEP-Produzenten in direkter Umgebung zugute (Gerardin et al., 2016).

Für die Handhabung im Labor und die Entwicklung eines Aufreinigungsverfahrens erwies sich die konstitutive ADEP-Produktion als sehr vorteilhaft, da die Kultur unter den gewählten Bedingungen über einen Zeitraum von ungefähr 20 h eine konstante Menge an antibiotisch wirksamen ADEPs enthielt und in diesem zeitlichen Rahmen variabel abgeerntet werden konnte (**Abbildung 17** und **Abbildung 18**). Mit nur zwei chromatographischen Auftrennungen konnten rund 10 mg reines ADEP1 aus 3 L Kultur gewonnen werden.

5.2 Das *ade*-BGC besteht aus drei minimalistischen Subclustern zur Biosynthese des peptidischen Rückgrats, der Polyenseitenkette und des nicht-proteinogenen MePros

Da die Strukturen von sechs ADEP-Derivaten im A54556-Extrakt bereits aus früheren Studien bekannt waren (Michel and Kastner, 1985), konnte anhand dieser abgeleitet werden, welche Biosyntheseeinheiten im *ade*-BGC vermutlich zu erwarten sind. *In silico*-Analysen des identifizierten, putativen Genclusters waren in der Tat überwiegend im Einklang mit der ADEP1-Primärstruktur, so dass mit weiterführenden biochemischen Studien die noch offenen Fragen bezüglich einzelner Biosyntheseschritte beantwortet werden sollten.

Mit der isolierten multispezifischen A6-Domäne der NRPS AdeH wurde ein Hydroxamat-Formierungs-Assay durchgeführt, um die Diskrepanz zwischen den *in silico* vorhergesagten Substraten Pro und Pip und den in den bekannten ADEP-Derivaten vorhandenen Aminosäuren Pro und MePro aufzuklären (**Tabelle 31**). Der *in vitro*-Assay bestätigte die Aktivierung von Pro und MePro durch A6 und zeigte ein zusätzlich erweitertes Substratspektrum, da auch moderate Mengen Ser aktiviert wurden, obwohl kein ADEP-Derivat mit Ser an dieser Position bekannt ist (**Abbildung 28**). Dieses Ergebnis zeigt die Limitierung von *in vitro*-Assays mit isolierten Domänen auf. In einer kürzlich veröffentlichten Studie wurde die Bedeutung der C-Domänen für den spezifischen Einbau von Substraten durch multispezifische A-Domänen am Beispiel des Microcystin-BGC gezeigt (Meyer et al., 2016). So wurde eine erweiterte Gatekeeping-Funktion der C-Domänen beschrieben, welche in bedeutendem Maße an der Kontrolle der Substrataktivierung durch A-Domänen beteiligt sind, was auch im Rahmen der ADEP-Biosynthese eine wichtige Rolle der C6-Domäne beim spezifischen Einbau von Pro und MePro durch A6 vermuten lässt.

NRPS mit multispezifischen A-Domänen sind vor allem in Cyanobakterien sehr prominent und ermöglichen dem jeweiligen Organismus im besten Fall die Biosynthese ganzer Naturstoffbibliotheken (Christiansen et al., 2011; Golakoti et al., 2001; Hoffmann et al., 2003; Luesch et al., 2003). In Streptomycceten kommen sie wesentlich seltener vor, aber dienen auch hier der Biosynthese einer Reihe von leicht abgewandelten Derivaten, wie z.B. ADEP1 und Faktor B von *S. hawaiiensis*. Durch die Vielfältigkeit der entstehenden Sekundärmetabolite stellen sie sowohl interessante Bausteine für die synthetische Mikrobiologie dar, als auch Angriffspunkte für metabolisches Engineering, um die Spezifität für ein präferiertes Substrat und somit den Produktionstitert durch Mutagenese zu erhöhen (Christiansen et al., 2011).

Neben zwei NRPS enthält das *ade*-BGC Gen-Sets für die Bereitstellung von MePro und für die Biosynthese der Alkenseitenkette, die beide hohe Ähnlichkeiten in ihrer Genanordnung (Abbildung 30) und den Aminosäuresequenzen der einzelnen Enzyme (6.3.1, 6.3.2, 6.3.4-6.3.7) zu kürzlich beschriebenen Subclustern mit ähnlicher Funktion aufweisen (Bilyk et al., 2016; Du et al., 2016, 2017; Lukat et al., 2017; Pohle et al., 2011). Allerdings fehlt in beiden Subclustern des *ade*-BGC jeweils ein Enzym, um das vollständig modifizierte Endprodukt zu erhalten. Die erfolgreiche heterologe Expression des *ade*-BGC in *S. coelicolor* M1146 (Elizabeth Culp, Gerard D. Wright; unveröffentlicht) lässt darauf schließen, dass für diese Reaktionen Enzyme des Primärstoffwechsels rekrutiert werden. Das Fehlen einer Dehydratase, wie in der *ade* Typ II-PKS, wurde bereits in anderen Typ II-PKS beobachtet und wird wahrscheinlich durch ein Enzym der Fettsäuresynthese ersetzt (Bilyk et al., 2016). Des Weiteren fehlt ein Enzym für die finale Reduktion der (3*R*,5*S*)-3-Methyl- Δ 1-pyrrolin-5-carboxylsäure zu MePro. Im Griselimycin-BGC befindet sich im Subcluster mit den Enzymen GriE-H zur Bereitstellung von MePro die Oxidoreduktase GriH, für die im *in vitro*-Assay gezeigt wurde, dass sie in der Lage ist, diese Reaktion zu katalysieren. Allerdings entstand MePro bei der heterologen Expression von GriE-H in *S. lividans* selbst dann, wenn GriH ausgeknockt war. Der letzte Reduktionsschritt wurde in diesem Fall vermutlich von ProC, einer Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase der Prolin-Biosynthese, übernommen, wie *in vitro* mit ProC aus *E. coli* gezeigt werden konnte (Lukat et al., 2017). Im Griselimycin-BGC liegt somit ein Cluster-assoziiertes Enzym für diese Reduktion vor, um genügend MePro bereitzustellen, um es an zwei Positionen in Griselimycin bzw. an drei in Methyl-Griselimycin einzubauen. Im Gegensatz dazu liegt MePro in ADEP1 lediglich an einer Position vor und gar nicht in Faktor B, so dass eine Cluster-zugehörige Reduktase vermutlich nicht notwendig ist, um ausreichende Mengen MePro für die ADEP-Biosynthese zu erzeugen.

Durch die fehlende Möglichkeit der genetischen Manipulation von *S. hawaiiensis* wurde die Gencluster-Analyse stark erschwert und die Funktion sowie die Zugehörigkeit einer Reihe von Genen zum *ade*-BGC konnte nicht durch die ursprünglich geplanten Knockout- und Knockdown-Experimente gezeigt werden (4.4.2). Die erfolgreiche heterologe Expression des Clusters in *S. coelicolor* M1146 (Elizabeth Culp, Gerard D. Wright; unveröffentlicht) in Kombination mit einer umfangreichen *in silico*-Analyse, der biochemischen Analyse zweier A-Domänen und den Studien zum Resistenzfaktor *clp*_{ADEP} lassen aber keinen Zweifel an der Identität des *ade*-BGC und der Funktion des Großteils der codierten Enzyme.

5.3 Die ClpP-Maschinerien von *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24

Streptomycceten sind keine humanpathogenen Organismen und gehören daher klassischerweise nicht zu den Bakterienstämmen, die bei der Aufklärung von Wirkmechanismen von Antibiotika

an ihrem Target ins Auge gefasst werden. Allerdings sind im Genom von Antibiotika produzierenden Streptomycceten Resistenzfaktoren codiert, um diese Stämme vor dem antibakteriellen Potenzial ihrer eigenen Produkte zu schützen. Zahlreiche Resistenzfaktoren erfüllen eine mit dem Wirkmechanismus des Antibiotikums in Zusammenhang stehende Funktion, um z. B. den Verlust der Zielstruktur auszugleichen oder zu verhindern. Somit muss zunächst der Wirkmechanismus des Antibiotikums im Produzentenstamm verstanden werden, um die Funktion solcher Resistenzfaktoren zu verstehen.

Die Gesamtheit aller Antibiotikaresistenzgene, das Resistom, wurde vor einigen Jahren als spannendes Forschungsfeld innerhalb der Antibiotikaforschung erkannt. Bei der Untersuchung von Erdproben wurde in den daraus kultivierbaren Bakterien eine unwahrscheinlich hohe Dichte an Resistenzgenen gegen alle klinisch relevanten Antibiotikaklassen gefunden (D'Costa et al., 2006). Daher geht man davon aus, dass in Umweltbakterien ein regelrechtes Reservoir von Resistenzfaktoren vorliegt, welche durch Horizontalen Gentransfer auf andere Bakterien übertragen werden können. So wird eine evolutionäre Verbindung zwischen den Resistenzgenen von Antibiotikaproduzenten mit denen in Pathogenen vermutet, wobei letztere die Resistenzfaktoren höchstwahrscheinlich nicht durch einen direkten Transfer von Produzentenstämmen erhalten haben, sondern durch einen mehrstufigen Prozess über nicht-produzierende Actinomyceten und Proteobakterien (Peterson and Kaur, 2018).

Die Erforschung von Evolution, Diversität und Mechanismen von Antibiotikaresistenzen stellt somit einen weiteren wichtigen Angriffspunkt zur Adressierung des Resistenzproblems dar, um Resistenzentwicklungen besser vorhersehen und frühzeitig in Klinik und Forschung reagieren zu können.

Das *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}*, welches bei der Analyse des *ade*-BGC gefunden wurde, konnte als neuartiger Resistenzfaktor gegen die von *S. hawaiiensis* produzierten ADEPs identifiziert werden und der durch dieses Gen vermittelte Resistenzmechanismus sollte im Rahmen dieser Arbeit aufgeklärt werden. Dazu wurden zunächst Studien zum ADEP-Target ClpP in Streptomycceten durchgeführt, um auf Grundlage dieses Wissens die durch *clpP_{ADEP}* vermittelte Schutzfunktion für die ClpP-Maschinerie untersuchen zu können. Aufgrund der fehlenden genetischen Modifizierbarkeit von *S. hawaiiensis* konnten in diesem Stamm nicht, wie anfänglich geplant, ausführliche *clpP*-Knockout-Experimente durchgeführt werden, woraufhin die Studien zur ClpP-Maschinerie und zum Einfluss des Resistenzfaktors ClpP_{ADEP} mehrheitlich im Modellorganismus *S. lividans* TK24 durchgeführt wurden.

5.3.1 *clpP*-Genexpressionsanalysen in *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24

Bei Gensequenzanalysen der *clpP*-Homologe in *S. hawaiiensis* und *S. lividans* TK24 fiel das zusätzliche *clpP*-Homolog *clpP_{ADEP}* in *S. hawaiiensis* als einziger markanter Unterschied der *clpP*-Maschinerien der beiden Stämme auf. Mit dem Ziel seinen Einfluss auf die Expression der anderen *clpP*-Homologe zu untersuchen, wurden qPCR-Versuchsreihen zur Charakterisierung der Expression aller *clpPs* in *S. hawaiiensis* in verschiedenen Wachstumsstadien und weiterführende Expressionstudien der *clpP*-Homologe in *S. lividans* TK24 und der *clpP_{ADEP}*-exprimierenden Mutante *S. lividans* pSETclpP_{ADEP} durchgeführt (4.5.1.2).

Auffällig waren bei allen durchgeführten Genexpressionsanalysen die zum Teil starken Schwankungen der C_t-Werte der beiden untersuchten biologischen Replikate, wodurch sich

große Abweichungen vom Mittelwert ergaben, obwohl die Kulturen für beide biologischen Replikate mit dem gleichen Inokkulum angeimpft und unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Für alle getesteten Stämme wurden außerdem zu Beginn der Experimentreihe Wachstumskurven aufgezeichnet, um die gewünschten Wachstumsphasen bei der Probennahme für die RNA-Isolierung genau zu treffen. Daher ist zu vermuten, dass die Schwankungen der C_t -Werte auf das mycelartige Wachstum der Streptomyceten zurückzuführen sein könnten, wodurch in einer Probe Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen vorliegen können. Daher konnten an dieser Stelle keine absoluten Werte in Form der Kopienzahl des jeweiligen Gens ermittelt werden und es wurde stattdessen die relative Genexpression, normiert auf das Housekeeping-Gen *hrdB*, bestimmt. Hier zeigte sich, wie bereits im Ergebnisteil angesprochen, eine deutliche Differenz des relativen Expressionslevels der *clpP*-Gene zwischen den verschiedenen getesteten Stämmen und in allen Experimenten war das Expressionslevel der *clpP*-Gene in *S. hawaiiensis* höher als in *S. lividans*. Da die Unterschiede zwischen den auf *S. lividans* TK24 basierenden Stämmen untereinander nicht so groß waren wie der Unterschied zwischen diesen und *S. hawaiiensis*, scheint sich das Expressionslevel speziesspezifisch zu unterscheiden, entweder durch ein grundsätzlich niedrigeres Expressionslevel der *clpP*-Homologe oder durch ein basal höheres Expressionslevel des Referenzgens *hrdB* in *S. lividans* im Vergleich zu *S. hawaiiensis*, da alle Werte auf dieses Gen normiert wurden. Während der laufenden qPCR-Experimente im Rahmen dieser Arbeit wurde publiziert, dass *hrdB*, obwohl es das für *Streptomyces* am häufigsten genutzte Referenzgen ist, als Housekeeping-Gen suboptimal ist, da seine Promotorstärke mitunter durch die Wahl des Mediums und eingeführte Mutationen variiert (Li et al., 2015). Dies begründet zwar nicht die speziesspezifischen Unterschiede, aber verlangt eine kritische Betrachtung der hier ermittelten und auf *hrdB* bezogenen Daten.

Somit konnten aus den erzeugten Genexpressionsdaten lediglich die allgemeinen Trends der relativen Expressionslevel der *clpP*-Homologe ermittelt und miteinander verglichen werden. Dabei fiel der Unterschied der Expressionslevel der in einem bicistronischen Operon codierten Homologe *clpP1* und *clpP2* in allen Stämmen auf, welcher auch in anderen *Streptomyces*-Spezies beobachtet werden konnte (Dogra et al., 2015; Laing et al., 2006; Rex et al., 1994). Für eine solche Polarität der Expression wurden bereits mögliche Gründe beschrieben, wie die frühzeitige Termination z. B. durch Umwelteinflüsse oder das Fehlen von Terminationssuppressoren (Laing et al., 2006; Selinger et al., 2003). Über die unterschiedlichen Transkriptmengen von *clpP1* und *clpP2* lässt sich allerdings kein Rückschluss auf die in der Zelle vorhandenen Mengen an ClpP1- und ClpP2-Protein ziehen, da nichts über die Stabilität der beiden ClpP-Homologe bekannt ist.

ClpP1 und *clpP2* waren in allen getesteten Stämmen die am stärksten exprimierten *clpP*-Homologe der physiologischen ClpP-Maschinerie. Auch die vergleichbar starke Expression des Resistenzfaktors *clpP_{ADEP}* in *S. hawaiiensis* und in *S. lividans* pSET*clpP_{ADEP}* führte diesbezüglich zu keiner Veränderung. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass der durch *clpP_{ADEP}* vermittelte Resistenzmechanismus nicht über eine Veränderung des physiologischen *clpP*-Expressionsprofils funktioniert, aber eine permanente, ausreichend starke Expression von *clpP_{ADEP}* erforderlich ist, die post-translational eine ADEP-Resistenz bewirkt (vgl. Bioassay in **Abbildung 49**).

ClpP_{ADEP} wurde in *S. lividans* pSET*clpP_{ADEP}* nicht unter der Kontrolle des nativen *clpP_{ADEP}*-Promotors aus *S. hawaiiensis*, sondern des konstitutiven *ermE**-Promotors exprimiert, wodurch

sich ein *clpP1*-, *clpP2*- und *clpP_{ADEP}*-dominiertes Expressionsprofil ergab, das dem in *S. hawaiiensis* sehr ähnlich war. Da außerdem durch Expression von *clpP_{ADEP}* unter *PermE**-Kontrolle eine deutlich ausgeprägte ADEP-Resistenz für verschiedene *Streptomyces*-Spezies nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 46**), ist nicht zu erwarten, dass eine Expression von *clpP_{ADEP}* unter dem nativen Promotor aus *S. hawaiiensis* zu einer starken Veränderung der Expressionslevel aller drei *clpP*-mRNA-Level führen würde.

Des Weiteren wurde in allen Stämmen ein geringes, basales Expressionslevel für *clpP3*, *clpP4* und *clpP5* detektiert. Zuvor wurde *clpP5* als konstitutiv exprimiertes Gen beschrieben, während die Expression von *clpP3* und *clpP4* in *S. lividans* durch Abbau des Transkriptionsaktivators PopR durch ClpP1 und ClpP2 als konstitutiv unterdrückt gilt (Gominet et al., 2011). In *S. hawaiiensis* schien die Transkriptmenge von PopR nach 28 h Wachstum kurzzeitig leicht anzusteigen, während sie nach 56 h bereits wieder auf das Ausgangslevel abgesunken war (**Abbildung 35**). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Western Blot-Experimente zum ClpP_{ADEP}-vermittelten Resistenzmechanismus in *S. hawaiiensis* ließen darauf schließen, dass ClpP_{ADEP} durch Interaktion mit ClpP1 eine Ruhigstellung des ADEP-aktivierten ClpP1 bewirkt, während es mit ClpP2 einen aktiven Komplex bildet, der PopR abbauen kann (**4.5.3.3** und **4.5.3.4**). So könnte es möglich sein, dass zum Zeitpunkt des Anstiegs der Menge des *clpP3clpP4*-Transkripts kurzzeitig keine ausreichenden Mengen ClpP_{ADEP} exprimiert wurden, um ClpP1 zu detoxifizieren und gleichzeitig genügend aktive Komplexe mit ClpP2 zur Proteolyse einschließlich des PopR-Abbaus zu bilden. In Western Blot-Experimenten mit *S. hawaiiensis*-Zellextrakten konnte aber zu keinem Zeitpunkt ClpP3 detektiert werden (**Abbildung 47**, **Abbildung 60**, **Abbildung 61**). Somit scheint die leicht verringerte Proteolyse von PopR und eventuell auch anderen Proteinen zum besagten Zeitpunkt keinen mit der genutzten Methode quantifizierbaren Effekt und auch keinen negativen Effekt auf die Viabilität von *S. hawaiiensis* zu haben. Die mit *clpP3clpP4* vergleichbar niedrigen Transkriptmengen von *clpP5* lassen darauf schließen, dass die Mengen des durch Translation der mRNA entstehenden Proteins ClpP5 ebenfalls minimal sind und keine nennenswerte Interaktion mit den die ClpP-Maschinerie bildenden ClpP-Homologen zu erwarten ist.

5.3.2 *In vivo*-Studien zur ClpP-Maschinerie in *S. lividans* TK24 zeigen höchste Komplexizität und strikte Kontrolle der Protease auf

Da die physiologische ClpP-Maschinerie in Streptomyceten bisher nur in Ansätzen erforscht wurde, sollten die bereits veröffentlichten Ergebnisse und Theorien bestätigt bzw. ausgebaut werden, und gleichzeitig ein Testsystem etabliert werden, welches in Folgeexperimenten ebenfalls die Untersuchung der Einflüsse von ClpP_{ADEP} auf die physiologischen ClpP-Homologe erlaubt. Dazu wurden durch markerlose In-Frame-Deletionen in *S. lividans* TK24 zwei Knockout-Mutanten, *S. lividans* $\Delta clpP1$ und *S. lividans* $\Delta clpP1P2$, erzeugt, die es möglich machten, die Komplementierung durch die variable Kombination von verschiedenen ClpP1- und ClpP2-Versionen zu testen und zu vergleichen.

Bei der Ausführung und Auswertung der Western Blots wurde ersichtlich, dass es mit dem hier genutzten Testsystem nicht möglich ist, zuverlässige Aussagen über die quantitativen Mengen der exprimierten ClpP-Proteine zu machen. Die genutzten Kulturen wurden immer mit dichten Sporensuspensionen angeimpft und für 40 h kultiviert und nach dem Herstellen der Zellextrakte wurden diese auf 5 oder 10 mg/ml Gesamtprotein, berechnet nach Bestimmung der Absorption bei 280 nm, eingestellt. Für Mutanten, die auf dem *S. lividans* TK24 oder *S. lividans* $\Delta clpP1$

Hintergrund beruhen, war es ausreichend, 50 ng Gesamtprotein über eine SDS-PAGE aufzutrennen, während von den im *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ Hintergrund erzeugten Stämmen für die Detektion von ClpP1-, ClpP2- oder ClpP_{ADEP}-Versionen mit dem anti-ClpP1- oder dem anti-His₆-Antikörper mindestens die vierfache Menge aufgetragen werden musste. Es schien, dass der Verlust des *clpP1clpP2*-Operons die Fitness der in diesem Hintergrund erzeugten Mutanten soweit beeinflusst, dass es zu einer insgesamt schwächeren Expression der eingebrachten ClpP-Homologe kam. Somit konnten Aussagen darüber getroffen werden, ob ein Protein detektiert werden konnte oder nicht, aber Unterschiede in der detektierten Bandenstärke hatten in den gezeigten Western Blots keine interpretierbare Bedeutung. Die einzige Ausnahme stellten Western Blots mit Zellextrakten dar, bei deren Kultivierung lediglich ein einziger Parameter verändert wurde, wie die Menge des Induktors bei der kontrollierten Expression von ClpP_{ADEP} (**Abbildung 50**) oder die Zeit des Wachstums bei der Wachstumskurve von *S. hawaiiensis* (**Abbildung 61**). Des Weiteren konnten Signale von ClpP2- oder ClpP_{ADEP}-Banden aufgrund der unspezifischen Bindung häufig erst dann gut mit dem anti-ClpP1-Antikörper detektiert werden, wenn sich auf demselben Western Blot keine ClpP1-exprimierende Probe befand. Somit wären für quantitative Analysen spezifische Antikörper für alle exprimierten ClpP-Proteine notwendig. Eine weitere Möglichkeit wäre die Expression der ClpP-Homologe mit unterschiedlichen Tags, wobei allerdings nicht bekannt ist, inwieweit ein C-terminaler Tag die Eigenschaften des ClpP-Proteins verändert. So schien die Kombination von ClpP2_{lang}-His mit ClpP_{ADEP} in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ weniger proteolytisch aktiv zu sein, als ClpP2_{lang} mit ClpP_{ADEP} (**Abbildung 56**).

Für beide ClpP-Homologe im *clpP1clpP2*-Operon existieren zwei mögliche Translationsstarts (**Abbildung 38**). Analysen des Codon-Usage implizierten eine Favorisierung des zweiten Startcodons für ClpP1 (ClpP1_{kurz}) und des ersten Startcodons für ClpP2 (ClpP2_{lang}) (De Crécy-Lagard et al., 1999; Viala and Mazodier, 2002), welche im Rahmen dieser Arbeit durch kombinierte Komplementierung der Knockout-Mutanten mit ClpP1_{kurz} oder ClpP1_{lang} und ClpP2_{kurz} oder ClpP2_{lang} in Western Blot-Analysen bewiesen werden konnten (**Abbildung 41** und **Abbildung 42**). Während bei beiden ClpP1-Konstrukten die Expression grundsätzlich vom zweiten Startcodon erfolgte, konnte mit den Plasmiden ClpP2_{kurz} und ClpP2_{lang} die Expression zweier unterschiedlicher ClpP2-Versionen erreicht werden. Die beiden ClpP2-Varianten zeigten allerdings unterschiedliche Funktionalitäten. Durch Expression von ClpP2_{lang} konnte eine vollständige Prozessierung von ClpP1 und ClpP2 sowie ein Verschwinden der ClpP3-Bande beobachtet werden, welches auf einen effizienten Abbau von PopR hinweist, wohingegen bei Komplementierung mit ClpP2_{kurz} die ClpP3-Bande bestehen blieb und lediglich die Prozessierung von ClpP2 vollständig erfolgte (**Abbildung 42**). Die Prozessierung von ClpP1 blieb unvollständig. Somit scheinen die zusätzlichen 18 Aminosäuren am N-Terminus von ClpP2_{lang} essentiell für eine optimale Funktionalität des ClpP-Homologs zu sein, obwohl das Propeptid sowohl bei ClpP2_{lang} (35 Aminosäuren) als auch bei ClpP2_{kurz} (17 Aminosäuren) durch die Prozessierung in Gegenwart von ClpP1 gleichermaßen entfernt wird. Über den bereits prozessierten N-Terminus von ClpP aus anderen Organismen ist bekannt, dass er sowohl den Substratzugang zum proteolytischen Zentrum durch die Eintrittsporen kontrolliert, als auch wichtig für die Interaktion mit den Clp-ATPasen ist (Gribun et al., 2005; Jennings et al., 2008). Dahingegen ist die Funktion des Propeptids am N-Terminus von ClpP kaum erforscht. Für Propeptide anderer Proteasen wurde eine wichtige Rolle bei der Proteinfaltung, zur Kontrolle und zum Schutz der Zelle vor der aktivierten Form der Protease und für die Interaktion mit

anderen Molekülen gezeigt (Demidyuk et al., 2010). Somit wäre denkbar, dass ClpP2kurz aufgrund der fehlenden 18 Aminosäuren nicht optimal gefaltet ist oder nicht in der Lage ist, alle notwendigen Interaktionen, z. B. mit den Clp-ATPasen, einzugehen.

Die Prozessierung von ClpP1 und ClpP2 und der Abbau von PopR als natürliches Substrat konnten als Biomarker für eine Interaktion der ClpP-Homologe bzw. letzteres für die Bildung eines proteolytisch aktiven Komplexes genutzt werden. Viala und Mazodier beobachteten in Western Blot-Experimenten mit Zellextrakten verschiedener *S. lividans-clpP*-Mutanten prozessierte Formen von ClpP1 und ClpP2 jeweils nur in Gegenwart des anderen ClpP-Homologs und vermuteten daher eine gegenseitige Prozessierung. Durch N-terminale Sequenzierung der prozessierten Formen konnten sie die Schnittstellen für beide Homologe in *S. lividans* bestimmen (**Abbildung 38**) (Viala and Mazodier, 2002). Ebenso wurde nur in dieser Konstellation ein PopR-Abbau beobachtet und daher angenommen, dass ClpP1 und ClpP2 einen proteolytisch aktiven, heteromeren Komplex bilden (Viala and Mazodier, 2002). Auch in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Western Blot-Analysen wurden die vollständig prozessierten Formen von ClpP1 und ClpP2 nur in Gegenwart des jeweils anderen Homologs (ClpP1kurz und ClpP2lang) detektiert (**Abbildung 42**). Ebenso wurde nur in dieser Konstellation ein Verschwinden der ClpP3-Bande detektiert, was auf den Verdau des natürlichen Substrats PopR und somit auf die Bildung eines proteolytisch aktiven Komplexes hinweist.

Der detaillierte Vergleich der Bandenmuster verschiedener Proben gab allerdings Hinweise auf komplexere Prozessierungsvorgänge, die über eine gegenseitige Prozessierung hinauszugehen scheinen. So wurde bei der alleinigen Expression von ClpP2lang-His in *S. lividans ΔclpP1P2* neben der Bande für unprozessiertes ClpP2lang-His mit einem anti-His₆-Antikörper eine zusätzliche Bande auf Höhe von ClpP2kurz-His detektiert (**Abbildung 56**). Reste dieser Bande sowie der unprozessierten ClpP2lang-His Bande konnten auf demselben Western Blot auch im Zellextrakt von *S. lividans ΔclpP1P2+P_{ADEP}+P2lang-His* beobachtet werden. Hier lag der Hauptteil des Proteins allerdings in der vollständig prozessierten Form vor, da ClpP_{ADEP} höchstwahrscheinlich als Interaktionspartner für ClpP2 fungiert und ein proteolytisch aktiver Komplex entsteht. Dies lässt vermuten, dass ClpP2 zunächst teilprozessiert wird, bevor in Gegenwart eines Interaktionspartners (ClpP1 oder ClpP_{ADEP}) die vollständige Prozessierung erfolgt. Somit schien ClpP2 sich entweder zu einem gewissen Anteil selbst zu prozessieren oder es wurde durch die ebenfalls anwesenden ClpP-Homologe ClpP3 und ClpP4 prozessiert.

In einem weiteren Experiment wurde *S. hawaiiensis* ClpP1 (*ShP1*) mit Mutationen in den hydrophoben Taschen zur Bindung der Clp-ATPasen (*ShP1HyP*) oder mit einer Funktionsverlustmutation in der katalytischen Triade (*ShP1Cat*) in *S. lividans ΔclpP1P2+P2lang-His* exprimiert und Zellextrakte dieser Mutanten in Western Blots getestet (**Abbildung 43**). Hier zeigte sich anhand der bestehenden ClpP3-Bande, dass sich durch den Knockout der katalytischen Triade von *ShP1Cat* kein Komplex bilden kann, der zum PopR-Abbau fähig ist. Katalytisch aktives ClpP1 scheint also essentiell für den Abbau von Proteinsubstraten durch den ClpP1P2-Komplex zu sein. Dennoch fand eine fast vollständige Prozessierung von ClpP2 statt, während ClpP1 unprozessiert blieb. Da in *S. lividans ΔclpP1P2+P2lang-His*, also in Abwesenheit von *ShP1Cat*, aber in Anwesenheit von ClpP3 und ClpP4, nur die zuvor beschriebene Teilprozessierung, aber keine vollständige Prozessierung stattfand, kann eine Beteiligung von ClpP3 und ClpP4 an der Vollprozessierung von ClpP2 ausgeschlossen werden. Daher scheint die

Anwesenheit von *ShClpP1Cat* trotz des Knockouts der katalytischen Triade die Autoprozessierung von ClpP2 zu triggern, was vermuten lässt, dass die Interaktion mit einem Partnerhomolog und, vermutlich damit einhergehend, die Bildung eines Komplexes auch für die Autoprozessierung essentiell ist.

Durch den Verlust der Fähigkeit von ClpP1 mit den Clp-ATPasen zu interagieren (*ShClpP1Hyp*) konnte in *S. lividans* $\Delta clpP1P2+ShP1Hyp+P2lang-His$ das natürliche Substrat PopR nicht mehr abgebaut werden, aber ClpP2 wurde vollständig und ClpP1 teilweise prozessiert (**Abbildung 43**). Somit schien die Bildung eines ClpP1/ClpP2-Komplexes und eventuell die Bindung einer Clp-ATPase an ClpP2 auszureichen, um die Prozessierung zu stimulieren, während der Komplex aber nicht zur vollständigen Entfaltung seiner Funktionalität in der Lage war. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der heterologe Komplex aus *ShClpP1* und *SlClpP2* nicht optimal zusammen arbeitet oder dass der Komplex zum PopR Abbau auf die Bindung einer Clp-ATPase an ClpP1 angewiesen ist. Um der ersten Hypothese nachzugehen muss in Folgeexperimenten wildtypisches *S. hawaiiensis* ClpP1 mit *S. lividans* ClpP2 kombiniert werden. Um zu testen, ob die alleinige Bindung der ATPase an ClpP1 für den Substratabbau ausreichend ist, müssen in weiterführenden Experimenten Mutationen der hydrophoben Taschen ebenfalls in ClpP2 eingeführt werden und ClpP2Hyp gemeinsam mit voll funktionalem ClpP1 in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ exprimiert werden.

Die Detektion des *S. lividans* $\Delta clpP1P2+ShP1Hyp+P2lang-His$ Zellextrakts zeigte überraschenderweise ein identisches Bandenmuster zu *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1kurz+P2kurz-His$, bei dem die Proteaseaktivität durch eine Verkürzung des Propeptids eingeschränkt zu sein schien (**Abbildung 42** und **Abbildung 43**). Wie bereits zuvor beschrieben, könnte das Volllängenpropeptid von ClpP2lang eine wichtige Funktion zur Interaktion mit anderen Strukturen erfüllen, wie z. B. mit Clp-ATPasen oder anderen ClpP2lang-Monomeren zur Bildung eines Oligomers. Auf der Basis des identischen Bandenmusters lässt sich spekulieren, dass das verkürzte Propeptid von ClpP2kurz eine vergleichbare Interaktion beeinträchtigen könnte, wie die Mutationen, die bei *ShClpP1Hyp* in die hydrophoben Taschen eingeführt wurden und die Bindung der Clp-ATPasen unterbinden.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde das folgende hypothetische Modell für die Bildung des physiologischen ClpP-Komplexes in *S. lividans* TK24 erstellt (**Abbildung 58**).

ClpP2, exprimiert vom ersten Startcodon, war in der Lage sich in Abwesenheit von ClpP1, selbst teilweise zu prozessieren und geht dazu, höchstwahrscheinlich vermittelt durch das lange Propeptid, Interaktionen zur Formierung eines Homooligomers ein. Ob Clp-ATPasen dazu notwendig sind ist noch nicht bekannt (**Abbildung 58A**). In Anwesenheit von proteolytisch inaktivem *ShClpP1Cat* fand sogar eine Vollprozessierung von ClpP2lang statt, so dass ClpP2 sich scheinbar in einem gemischten Komplex vollständig prozessieren kann. ClpP2 konnte *ShClpP1Cat* aber nicht prozessieren und zeigte auch keine proteolytische Aktivität in Form des Abbaus des natürlichen Substrats PopR.

Des Weiteren gibt es Hinweise darauf, dass die Bindung einer Clp-ATPase an ClpP1 notwendig für die volle Funktionalität des ClpP-Komplexes in *Streptomyces* ist, da in *S. lividans* $\Delta clpP1P2+ShP1Hyp+P2lang-His$ zwar Prozessierungen stattfanden, aber der gebildete ClpP-Komplex keine Proteaseaktivität aufwies. In weiterführenden *in vivo*-Experimenten muss zunächst getestet werden, ob dieser Effekt durch eine Inkompatibilität von *S. hawaiiensis* ClpP1

und *S. lividans* ClpP2 zustande kam. Weiterführend soll auch untersucht werden, welchen Effekt Mutationen in den hydrophoben Taschen von ClpP2 auf Prozessierung und Proteaseaktivität haben.

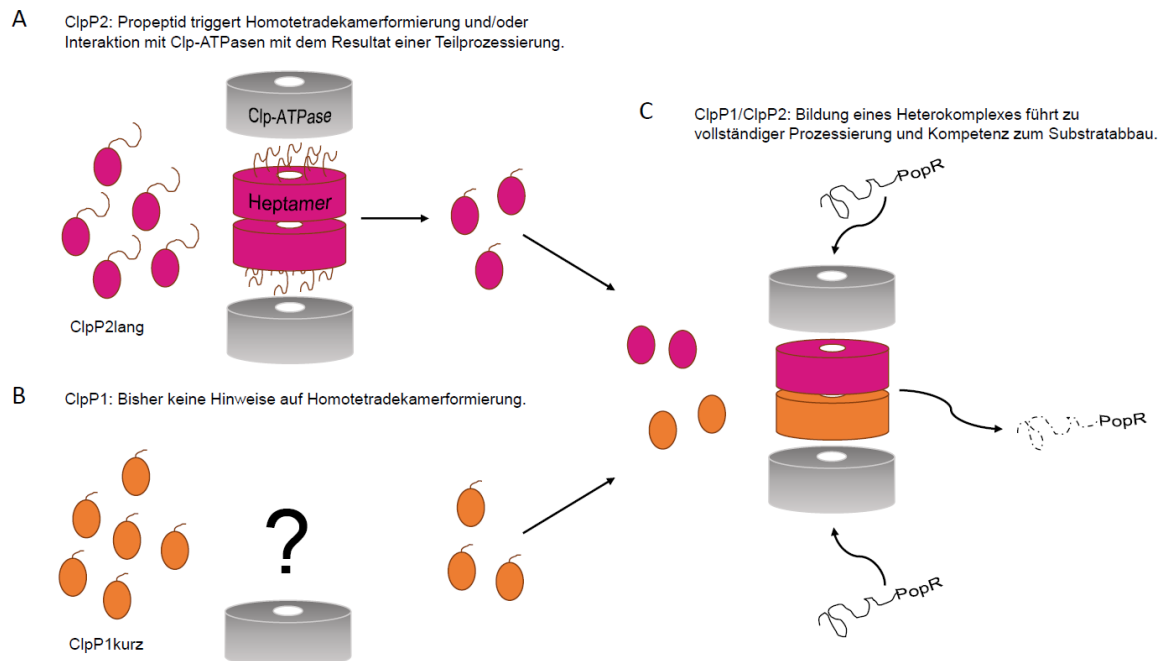


Abbildung 58: Hypothetisches Modell zur Bildung eines funktionalen ClpP-Komplexes in Streptomyceten. A) Das vollständige ClpP2-Propeptid ermöglicht eine Teilprozessierung von ClpP2, vermutlich durch die Bildung eines Homotetradekamers und/oder die Interaktion mit Clp-ATPasen. B) Auf eine Homooligomerbildung von ClpP1 gibt es bisher keine Hinweise. C) In Anwesenheit beider ClpP-Homologe und unter putativer Beteiligung von Clp-ATPasen können sich beide Homologe vollständig prozessieren und der Komplex kann natürliche Substrate, wie PopR, abbauen. Die Interaktion mit den Clp-ATPasen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sowohl eine asymmetrische Bindung an nur einen ClpP-Heptamerling als auch eine symmetrische Bindung an beide Ringe ist denkbar.

Für ClpP1 gibt es bisher keine Hinweise für eine Homooligomerbildung, bevor es zur Bildung eines gemischten Komplexes mit ClpP2 kommt (**Abbildung 58B**). Es schien sich selbst erst durch Bildung eines Heterokomplexes mit ClpP2 prozessieren zu können und verlieh dem Komplex in prozessierter Form seine proteolytische Aktivität (**Abbildung 58C**). In Anlehnung an die Komplexbildung in den nahverwandten Mykobakterien ist die Bildung eines Heterotetradekamers aus zwei Homoheptameren naheliegend (Akopian et al., 2012).

Aus den durchgeführten Bioassays konnte abgeleitet werden, dass nur ClpP1, aber nicht ClpP2, ADEP-sensitiv ist, wodurch es gut möglich sein könnte, dass sich die Affinitäten der beiden Homologe auch für die assoziierten Clp-ATPasen unterscheidet. Diesbezüglich wurde aber noch nichts publiziert und auch in dieser Arbeit wurden keine Untersuchungen mit den Clp-ATPasen in Streptomyceten durchgeführt. Bisher ist bekannt, dass im *S. coelicolor*-Genom ein *clpX*- und drei *clpC*-Homologe (*clpC1*, *clpC2*, *clpC3*) vorhanden sind (Bellier and Mazodier, 2004), welche auch in *S. lividans* TK24 präsent sind. Des Weiteren liegen Gene für die mit der ClpP-Maschinerie assoziierten Proteine ClpS und ClpB vor, sowie zwei Gene für Proteine mit großer Ähnlichkeit zu ClpC (ClpC4 und ClpC5), die aber stark verkürzt und daher vermutlich nicht funktional sind. Bei der Untersuchung des *S. hawaiiensis* Genoms konnten Homologe für alle oben genannten Gene identifiziert werden, allerdings nicht für *clpC3* (6.3.14). Wie bereits bei der Analyse der Anordnung der *clp1clp2*- und *clp3clp4*-Operons (4.5.1.1) konnte auch bei den Clp-ATPasen eine sehr große Ähnlichkeit zu den Homologen in *S. chartreusis* NRRL 3882 und *S. sp S10*(2016)

beobachtet werden. Auch in diesen beiden Stämmen konnte kein Gen für *clpC3* identifiziert werden. Somit ist das Fehlen von *clpC3* nicht spezifisch für *S. hawaiiensis* und kann daher nicht mit dem ADEP-Resistenzmechanismus assoziiert werden. Vielmehr ist anzunehmen, dass es evolutionsbedingt zum Verlust des *clpC*-Homologs gekommen ist, wie bei einigen *Streptomyces*-Stämmen zum Verlust der *clpP*-Homologe *clpP3* und *clpP4*. Hier stellt sich die Frage, welche Funktion ClpC3 in *S. lividans* erfüllt, die in *S. hawaiiensis* nicht benötigt wird und ob, trotz des Fehlens von ClpP3 in *S. hawaiiensis*, die im Rahmen dieser Arbeit in *S. lividans* TK24 durchgeführten Experimente ohne Weiteres auf den ADEP-Produzenten übertragen werden können. Da *in vivo*-Studien in *S. hawaiiensis* nicht möglich sind, empfiehlt es sich, Spezifitäten von Clp-ATPasen sowie Affinitäten zwischen Clp-ATPasen und ClpP-Proteinen von *S. lividans* und *S. hawaiiensis* in zukünftigen *in vitro*-Experimenten mit isolierten Proteinen Seite an Seite zu untersuchen. Interessant wären an dieser Stelle auch Untersuchungen zum Adaptorprotein ClpS, für das in *E. coli* eine modulierende Wirkung auf die Substratspezifität von ClpA gezeigt werden konnte und in Pflanzen sowie Plasmodien eine Interaktion mit ClpC vermutet wird (Ahyoung et al., 2016; Dougan et al., 2002; Zeth et al., 2002).

Insbesondere im Vergleich zu Firmicutes und Mykobakterien überrascht die ClpP-Maschinerie in Streptomyceten durch ihre vielen Komponenten und Kontrollinstanzen, die für das Entstehen einer sicheren und funktionalen Protease scheinbar unabdingbar sind. Beginnend mit der strikt regulierten Expression von mindestens vier in das Regulon eingeschlossenen ClpP-Homologen, müssen ClpP1 und ClpP2 zur Bildung eines aktiven Komplexes prozessiert werden und mit mindestens einer von drei Clp-ATPasen in *S. hawaiiensis* bzw. vier in *S. lividans* und möglicherweise mit zusätzlichen Adapterproteinen interagieren, um natürliche Substrate abbauen zu können. Abgesehen davon, ist es möglich, dass weitere Komponenten, insbesondere Regulatoren und Adapterproteine, involviert sind, die bisher noch gar nicht bekannt sind.

5.3.3 ClpP_{ADEP} vermittelt ADEP-Resistenz in *S. lividans* TK24 durch Interaktion mit ClpP1 und ClpP2

Durch die Unterschiede der ClpP-Maschinerien in verschiedenen Organismen als auch durch die Vielschichtigkeit des Wirkmechanismus von ADEP an ClpP ist dieser selbst in *E. coli* oder *B. subtilis* noch nicht vollständig aufgeklärt bzw. in vielen Organismen, wie den Streptomyceten, nahezu unbekannt. In dieser Arbeit wurde der Fokus zwar nicht auf die Aufklärung des Wirkmechanismus gelegt, jedoch konnte aus Vorarbeiten bereits geschlossen werden, dass es sich nicht um eine einfache Inhibierung des physiologischen ClpP1/ClpP2-Komplexes wie bei Mykobakterien handeln kann, da dann durch eine PopR-induzierte Expression von ADEP-insensitivem ClpP3ClpP4 das Überleben gesichert wäre (Famulla et al., 2016; Gomet et al., 2011). In Bioassays mit *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1$ kurz und *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1$ kurz+P2lang konnte gezeigt werden, dass ClpP1 das einzige ADEP-sensitive ClpP-Homolog ist und in An- wie in Abwesenheit seines physiologischen Partners ClpP2 durch ADEP überaktiviert werden kann (**Abbildung 45**). Somit muss ADEP in der Lage sein, die Bildung eines ClpP1-Homotetradekamers zu triggern und dieses, entkoppelt von den Clp-ATPasen, durch eine Überaktivierung zu toxifizieren. Allerdings schließt dies nicht aus, dass ADEP auch gemischte ClpP1/ClpP2-Komplexe über die Bindung an ClpP1 überaktivieren kann.

Basierend auf diesen Beobachtungen wurde deutlich, dass der durch *clpP*_{ADEP}-vermittelte Resistenzmechanismus zum einen beinhalten muss, dass ADEP-aktiviertes ClpP1 durch ClpP_{ADEP} detoxifiziert wird. In *S. hawaiiensis* und nach dem Einbringen von *clpP*_{ADEP} in verschiedene

Streptomyces-Spezies konnte mittels Western Blots keine Beteiligung von ClpP3 nachgewiesen werden (**Abbildung 47**), womit, analog zum Wirkmechanismus von ADEP an ClpP1, eine bloße Inhibierung von ClpP1 durch ClpP_{ADEP}, welche eine Expression von ClpP3 zur Folge haben würde, ausgeschlossen werden konnte. Somit lässt sich folgern, dass ClpP_{ADEP} neben der Detoxifizierung von ClpP1 auch die physiologischen Funktionen des gestörten ClpP1/ClpP2-Komplexes ersetzt können muss.

Im Western Blot mit *S. lividans* $\Delta clpP1P2+P1_{kurz}+P_{ADEP}$ sowie den Variationen mit *clpP1lang* oder *clpP_{ADEP}-His* konnte keine Prozessierung der beiden ClpP-Homologe oder ein PopR-Abbau beobachtet werden (**Abbildung 52** und **Abbildung 53**). Somit schien ClpP_{ADEP} ClpP1 in einen Komplex einzubinden, der proteolytisch inaktiv und in keiner Weise funktional ist. Western Blot-Experimente mit Zellextrakten von *S. hawaiiensis* und verschiedenen ClpP_{ADEP}-exprimierenden Stämme deuten daraufhin, dass ClpP_{ADEP} die Prozessierung von ClpP1 verhindert bzw. vermindert (**Abbildung 47**). Wie ein solcher proteolytisch inaktiver ClpP1/ClpP_{ADEP}-Komplex aussehen könnte wäre an dieser Stelle reine Spekulation und muss in zukünftigen *in vitro*-Studien, z. B. durch Auftrennung der Komplexe mittels einer nativen PAGE oder einer Größenausschlusschromatographie, untersucht werden.

Im Gegensatz dazu gaben die durchgeführten Experimente eindeutige Hinweise darauf, dass ClpP_{ADEP} und ClpP2 einen Komplex bilden, der, abgesehen von der ADEP-Sensitivität, vergleichbare Eigenschaften wie der physiologischen ClpP1/ClpP2-Komplex aufweist, sowohl bezüglich der Prozessierung beider Partnerhomologe als auch bezüglich des Abbaus von PopR, welches hier stellvertretende für natürliche Substratproteine betrachtet wurde (**Abbildung 55** und **Abbildung 56**). Um die Funktionalität der beiden Partnerhomologe in diesem Komplex zu untersuchen, sollten in zukünftigen Experimenten die für den ClpP1/ClpP2-Komplex vorgeschlagenen Mutationen in den katalytischen Triaden und hydrophoben Bindestellen auch in ClpP_{ADEP} eingeführt werden und analog getestet werden, wie sich die Kombination von ClpP_{ADEP}Hyp oder ClpP_{ADEP}Cat mit ClpP2 auf die Prozessierung der Homologe und die proteolytische Aktivität auswirkt.

Durch die kontrollierte *clpP_{ADEP}*-Expression unter dem induzierbaren *tipA*-Promotor in *S. lividans* pIJ6902*clpP_{ADEP}* konnte im Bioassay gezeigt werden, dass die Ausprägung der Resistenz abhängig von der Konzentration des exprimierten ClpP_{ADEP} ist, da der Stamm mit zunehmender Induktion, also bei steigender ClpP_{ADEP}-Konzentration, stetig resistenter wurde (**Abbildung 49**). Gleichzeitig konnte im Western Blot bei steigender ClpP_{ADEP}-Expression eine Zunahme von unprozessiertem ClpP1 beobachtet werden (**Abbildung 50**), während bei der Detektion eines *S. lividans* P_{ADEP}-His Extrakts auffiel, dass nicht nur ClpP1 zum Teil unprozessiert vorliegt, sondern ebenso ClpP_{ADEP}-His (**Abbildung 56**). Durch die isolierte Expression von ClpP1 mit ClpP_{ADEP} sowie von ClpP2 mit ClpP_{ADEP} in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ konnte aufgezeigt werden, dass der Resistenzfaktor in der Lage ist, zwei voneinander unabhängige ClpP-Systeme zu etablieren. ADEP entkoppelt die natürlichen Partner ClpP1 und ClpP2 voneinander und geht mit beiden eine neue Interaktion ein (**Abbildung 53**, **Abbildung 54** und **Abbildung 56**). Durch die Interaktion von ClpP1 und ClpP_{ADEP} lagen daher Teile beider Homologe in unprozessierter Form vor, während die Interaktion von ClpP2 und ClpP_{ADEP} eine Prozessierung ebendieser bewirkte. Trotz der nachgewiesenen Interaktion von ClpP_{ADEP} mit ClpP1 und ClpP2 konnte sowohl in *S. hawaiiensis* als auch in *S. lividans* pSET*clpP_{ADEP}* prozessiertes ClpP1 detektiert werden (**Abbildung 47**), für dessen Entstehen ein Komplex mit

proteolytisch aktivem ClpP1 präsent sein muss (entweder Restmengen eines physiologischen ClpP1/ClpP2-Komplexes und/oder ein ADEP1-aktiviertes ClpP1-Homotetradekamer und/oder ein ADEP1-aktivierter ClpP1/ClpP2-Komplex, ggf. mit Beteiligung von Clp-ATPasen).

Dies könnte drauf hindeuten, dass die Bildung der ClpP-Komplexe während der Resistenzsituation möglicherweise in einem dynamischen Gleichgewicht steht, welches durch Expression der zum Überleben notwendigen Menge ClpP_{ADEP} auf die Seite der ADEP-resistenten Komplexe verschoben wird (**Abbildung 59**). Trotzdem entstehende Anteile von prozessiertem, potentiell toxischem ClpP1 sind entweder zu gering, um schädigend zu wirken oder können, wie unprozessiertes ClpP1, auch von ClpP_{ADEP} detoxifiziert werden. Dabei ergaben sich keine Hinweise darauf, dass ClpP_{ADEP} eine Präferenz bzw. eine höhere Affinität für eins der beiden ClpP-Homologe besitzt. Basierend auf der Annahme, dass es gleichermaßen wichtig ist, den unkontrollierten Verdau von essentiellen Zellproteinen zu verhindern (ADEP-aktiviertes ClpP1) und den Abbau nicht benötigter Substrate sicherzustellen (ClpP2), ist davon auszugehen, dass die deutlich präferierte Bindung eines ClpP-Homologs durch ClpP_{ADEP} eher kontraproduktiv wäre.

Hypothetisches Modell des physiologischen ClpP1/ClpP2/Clp-ATPase-Komplex in Streptomyces.

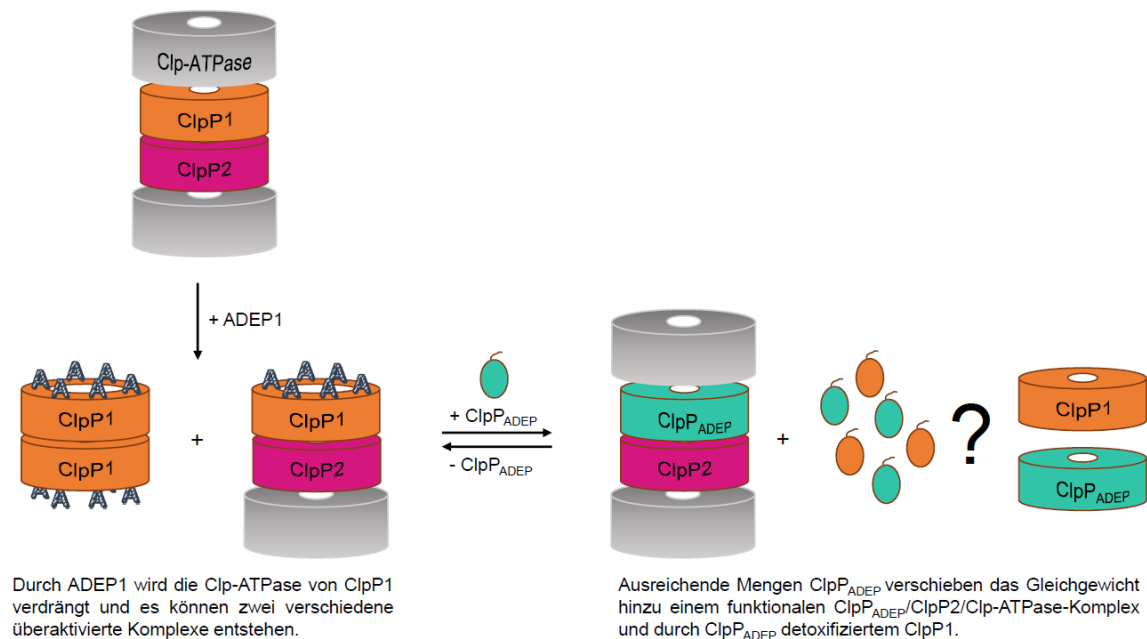


Abbildung 59: Hypothetisches Modell des Effekts von ADEP1 auf die ClpP-Komplexbildung in *Streptomyces* und des Gegeneffekts des ADEP-resistenten ClpP-Homologs ClpP_{ADEP}. Durch Verdrängung der Clp-ATPase von ClpP1 und anschließender Bindung an dieselben Bindestellen bewirkt ADEP1 eine tödliche Überaktivierung von ClpP1-Homotetradekamer- sowie ClpP1/ClpP2-Heterotetradekamerkomplexen. In Anwesenheit von ClpP_{ADEP} wird ClpP1 auf noch unbekannte Weise detoxifiziert und es entsteht ein ADEP-resistenter, aber voll funktionaler ClpP_{ADEP}/ClpP2/Clp-ATPase-Komplex, der den ClpP1/ClpP2/Clp-ATPase-Komplex ersetzt.

Eine spannende Frage bleibt an diese Stelle, wieso ClpP1 im ADEP-Produzenten *S. hawaiiensis*, trotz seiner Toxizität, weiterhin erhalten ist, da es in Anwesenheit von ClpP_{ADEP} und ClpP2 auf der Grundlage der bisherigen Erkenntnisse keinen offensichtlichen Nutzen mehr hat, sondern viel mehr eine Schwachstelle gegen ADEP darstellt. In vorhergegangenen Studien mit einem *S. lividans* Wildtyp-Stamm konnte bereits gezeigt werden, dass unter ADEP-Einfluss spontan ADEP-resistente Mutanten auftreten, bei denen *clpP1* durch Nonsense-Mutationen oder Deletionen nicht mehr funktional war (Gominet et al., 2011). Bei den untersuchten Mutanten in dieser von Gominet *et al.* durchgeführten Studie wurden überwiegend auch Downstream-Effekte auf *clpP2* beobachtet, so dass lediglich in einer von elf Mutanten weiterhin ein funktionales

clpP2-Gen vorhanden war. Somit wäre es möglich, dass solche spontanen Mutationen in *clpP1* nicht so gezielt erfolgen können, dass die Expression von *clpP2* in jedem Fall ohne Downstream-Effekte erfolgen kann. Dies würde den Erhalt des vollständigen *clpP1clpP2*-Operons begründen, da ein funktionales ClpP2 essentiell ist, um gemeinsam mit ClpP_{ADEP} einen funktionalen, ADEP-resistenten ClpP-Komplex zu bilden.

5.4 Ausblick

So wie die Suche nach neuen antibiotischen Wirkstoffen ist auch das Verständnis von Resistenzmechanismen unabdingbar, um der akuten Problematik der steigenden Zahlen von multiresistenten Pathogenen Einhalt zu gebieten. Bei der Identifizierung und Annotierung des *ade*-BGC aus *S. hawaiiensis* wurde ein *clpP*-Homolog als möglicher Resistenzfaktor gefunden, das im Rahmen dieser Arbeit durch das Einbringen in verschiedene *Streptomyces*-Spezies als solcher bestätigt werden konnte.

Da *S. hawaiiensis* nicht genetisch manipulierbar war, gestaltet sich die Planung weiterer Experimente und Projekte, die in *in vivo*-Studien mit dem ADEP-Produzenten erfordern, sehr schwierig. Die Regulation des *ade*-BGC und des Resistenzgens *clpP_{ADEP}* bleiben offene Fragen und könnten in Zukunft eventuell über weitere Experimente in einem heterologen Wirtsstamm oder die Anwendung innovativer Techniken, wie CRISPR-Cas9 Genome Editing, welches in *Streptomyces* bereits erfolgreich angewendet werden konnte (Cobb et al., 2015; Tong et al., 2015; Yeo et al., 2019), beantwortet werden.

So wurde für die Untersuchung des *clpP_{ADEP}*-vermittelten Resistenzmechanismus der Weg der heterologen Expression in *S. lividans* TK24 gewählt. Für diese Arbeiten wurde das Augenmerk zunächst auf die physiologische ClpP-Maschinerie in diesem Stamm gelegt, um den Einfluss des Resistenzgens im Anschluss aussagekräftig interpretieren zu können.

In einer Reihe von *in vivo*-Experimenten, wie *clpP*-Knockout-Studien und anschließende Komplementierungen, Bioassays und Western Blots, konnte bestätigt werden, dass der physiologische ClpP-Komplex aus ClpP1 und ClpP2 besteht, von denen nur ClpP1 sensitiv gegenüber ADEP ist. Diese beiden ClpP-Homologe scheinen nur dann in der Lage zu sein einen proteolytisch aktiven Komplex zu bilden, wenn beide zusammen anwesend sind und es durch eine Interaktion zur Prozessierung kommt. Während ClpP2 sich ohne ClpP1 teilprozessieren und in Anwesenheit von katalytisch inaktivem *ShClpP1Cat* vollständig prozessieren konnte, zeigte sich für ClpP1, dass es in Abwesenheit von ClpP2 nicht prozessiert wird. ClpP2 schien aber nicht zum Substratabbau befähigt zu sein, da der Abbau natürlicher Substrate bei der Kombination von ClpP2 mit katalytisch inaktivem *ShClpP1Cat* zum Erliegen kam. Hier sollten in zukünftigen Experimenten durch ortsspezifische Mutagenese in *clpP1* und *clpP2* von *S. lividans* TK24 Punktmutationen zum Verlust der Funktion der katalytischen Triade gesetzt werden und der Effekt auf die Prozessierung sowie den Abbau natürlicher Substrate Seite an Seite beobachtet werden. Zu klären ist, ob ClpP1 sich in Anwesenheit von katalytisch inaktivem ClpP2 (wie ClpP2 bei katalytisch inaktivem ClpP1) prozessieren kann und somit für die Prozessierung beider ClpP-Homologe bereits ein heteromeres Komplex gebildet werden muss. Ebenso sollte getestet werden, ob der Komplex durch katalytisch inaktives ClpP2 in gleichem Maße an proteolytischer Aktivität verliert, wie durch katalytisch inaktives ClpP1 oder ob der Abbau von natürlichen Substraten weiterhin erfolgen kann.

Durch die Einführung von Mutationen der hydrophoben Clp-ATPase-Bindestellen in *ShClpP1Hyp* wurde der PopR Verdau des *ShClpP1Hyp* ClpP2lang-His Komplexes verhindert. Dies könnte entweder darauf hindeuten, dass die Interaktion zwischen *S. hawaiiensis* ClpP1 und *S. lividans* ClpP2 nicht optimal verlief oder dass die Bindung einer oder mehrerer Clp-ATPasen an ClpP1 essentiell für den Verdau von PopR ist. Mittels ortsspezifischer Mutagenese sollten diese Mutationen gleichermaßen in ClpP1 und ClpP2 von *S. lividans* TK24 eingeführt werden (ClpP1Hyp und ClpP2Hyp), um in Kombination mit einem nicht-mutierten Partnerhomolog den Effekt der ausbleibenden Clp-ATPasen-Interaktion mit ClpP1 bzw. ClpP2 zu vergleichen. Die Kombination der beiden modifizierten ClpP-Homologe sollte die Bindung jeglicher ATPasen unterbinden und es möglich machen zu zeigen, ob die Prozessierung nur durch eine ClpP1/ClpP2-Heterokomplexbildung, aber Clp-ATPase-unabhängig ablaufen kann. Durch die Erzeugung von Knockouts der einzelnen Clp-ATPasen in Kombination mit ClpP1Hyp oder ClpP2Hyp könnten Rückschlüsse auf die Affinitätsunterschiede der ClpP-Homologe zu den verschiedenen ATPasen gezogen werden. Hierbei ist zuberücksichtigen, dass ClpC1 essentiell zu sein scheint und dies möglicherweise auch für andere ClpC-Proteine zutreffen könnte (Bellier and Mazodier, 2004).

Durch die konstitutive Expression des nahe des *ade*-BGC lokalisierten *clpP_{ADEP}*-Gens in *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* A(3)2 und *S. griseus* Waksman konnte das *clpP*-Homolog als speziesunabhängig agierender Resistenzfaktor gegen ADEPs identifiziert werden. Während der kontrollierten Expression mittels eines *tipA*-Promotors wurde ersichtlich, dass die Stärke der Resistenz abhängig von der Konzentration des exprimierten ClpP_{ADEP} ist und durch konstitutive Expression eine Hochresistenz, vergleichbar mit der des ADEP-Produzentenstammes, erzielt werden kann. Diese Konzentrationsabhängigkeit ergibt sich höchstwahrscheinlich durch eine Interaktion von ClpP_{ADEP} mit ClpP1 und ClpP2, wodurch zum einen durch ADEP-überaktiviertes ClpP1 detoxifiziert wird und aus ClpP2 und ClpP_{ADEP} ein ADEP-resistenter ClpP-Komplex entsteht, der alle physiologischen Funktionen übernehmen kann.

Bisherige Hinweise für eine Interaktion von ClpP1 und ClpP_{ADEP} liegen nur in Form der in einem Bioassay ersichtlichen Aufhebung der ADEP-Sensitivität von ClpP1 in Anwesenheit von ClpP_{ADEP} vor. In zukünftigen *in vitro*-Experimenten mit isolierten Proteinen sollte die Interaktion z. B. durch isothermale Titrationskalorimetrie quantifiziert werden und die Bildung möglicher Oligomere mittels entsprechender Methoden (Native PAGE, Größenausschlusschromatographie) nachgewiesen werden.

Die Ausbildung eines ClpP_{ADEP}/ClpP2-Komplexes ist auf Grundlage der erzeugten Ergebnisse nahezu eindeutig, aber analog zum ClpP1/ClpP2-Komplex müssen auch hier in zukünftigen *in vivo*-Experimenten über die Einführung von Mutationen in die hydrophoben Bindetaschen (ClpP_{ADEP}Hyp) und die katalytische Triade (ClpP_{ADEP}Cat) Aussagen bezüglich der proteolytischen Aktivität der Partnerhomologe sowie zur Interaktion mit Clp-ATPasen getroffen werden.

Sämtliche Erkenntnisse sollten sich im besten Fall in einem *in vitro*-System mit isolierten Proteinen nachstellen und entstehende Protein-Komplexe hochauflösend darstellen lassen. Zu Bedenken ist an dieser Stelle, dass in Streptomycceten eine Clp-Multigen-Familie vorliegt, deren Komponenten vielzählig und möglicherweise noch gar nicht alle bekannt sind. Es ist unwahrscheinlich, dass alle vier Clp-ATPasen (drei in *S. hawaiiensis*) gleichermaßen eine Interaktion mit den drei hier untersuchten ClpP-Homologen eingehen und außerdem ist bisher

unbekannt, ob dazu weitere Faktoren wie das Adapterprotein ClpS oder Komponenten anderer Art notwendig sind.

Doch gerade diese Vielseitigkeit macht die ClpP-Maschinerie in Streptomyceten zu einem spannenden System und ClpP_{ADEP} zu einem bisher einzigartigen Resistenzfaktor. Neben neuen Erkenntnissen über ClpP-Proteine und ihre Interaktionen ermöglicht die Identifizierung von ClpP_{ADEP} auch die bioinformatisch unterstützte Suche nach neuen Antibiotika, deren Biosynthese einen durch ein *clpP*-Homolog vermittelten Schutzmechanismus erfordert, wie die in dieser Arbeit vorgestellte ADEP-Biosynthese.

6 Anhang

6.1 Weitere Western Blot-Analysen

6.1.1 Western Blot-Analysen von *S. hawaiiensis*-Zellextrakten

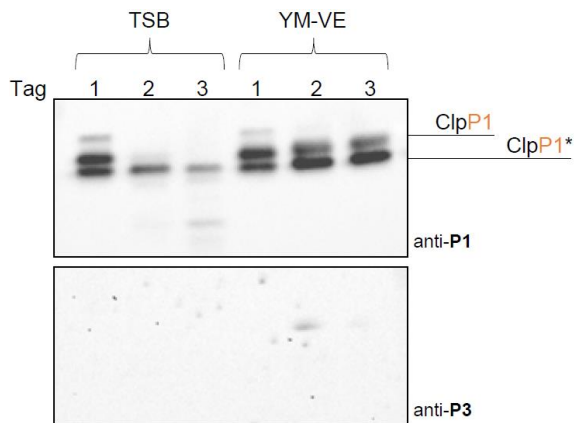


Abbildung 60: Western Blot mit *S. hawaiiensis* Zellextrakten nach Wachstum in TSB- oder YM-VE-Medium und Inkubation für ein, zwei oder drei Tage. Während in beiden Medien an Tag 1 noch eine Verzögerung der ClpP1-Prozessierung und eine mutmaßlich unprozessierte ClpP2-Bande sichtbar sind, ist die primäre Bande an Tag 2 und 3 prozessiertes ClpP1. *S. hawaiiensis* scheint in TSB-Medium schneller die Absterbephase zu erreichen als in YM-VE-Medium (vgl. **Abbildung 61**). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3).

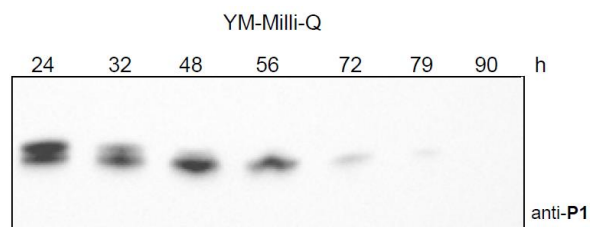


Abbildung 61: Western Blot mit *S. hawaiiensis* Zellextrakten nach Wachstum in YM-MilliQ-Medium für bis zu 90 h. Während nach 24 h noch die unprozessierte ClpP1-Bande dominiert, verschiebt sich dies bereits nach 48 h deutlich zur prozessierten ClpP1-Bande, welche nach drei Tagen fast nicht mehr detektierbar ist. Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1). Die Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper wurde ebenfalls durchgeführt, aber der Western Blot wird aufgrund des Ausbleibens eines Signals nicht gezeigt.

6.1.2 Induzierbare Expression von ClpP_{ADEP} in *S. lividans* Δ clpP1

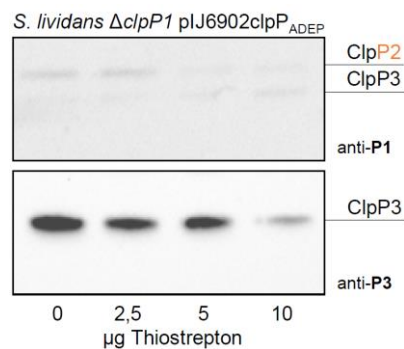


Abbildung 62: Western Blot-Analyse von Zellextrakten von *S. lividans* Δ clpP1 pIJ6902clpP_{ADEP}, die mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert wurden (0-10 µg/ml Thiostrepton). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3).

6.1.3 Induzierbare Expression von ClpP_{ADEP} und ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* $\Delta clpP1$

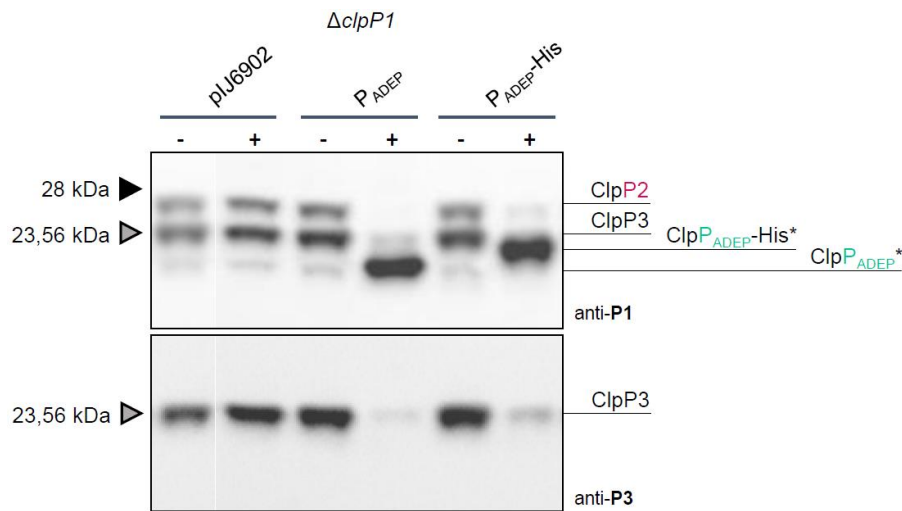


Abbildung 63: Induzierte Expression von ClpP_{ADEP} und ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* $\Delta clpP1$ ($\Delta clpP1$). Zellextrakte wurden aus Kulturen hergestellt, die für zwei Tage ohne Induktor (-) oder mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Thioestrepton (+) angezogen wurden. Stämme mit pIJ6902 dienen als Leervektorkontrolle. Obere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1); untere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Die aufgetragene Proteinmenge pro Extrakt betrug 100 μg . Die Identität der schwachen Bande auf Höhe von ClpP_{ADEP}* in den Proben pIJ6902 (-)/(+), P_{ADEP} (-) und P_{ADEP}-His (-) wurde nicht bestimmt. Abgeleitet von der Laufhöhe könnte es sich dabei um ClpP4 handeln.

6.1.4 Prozessierungstabelle

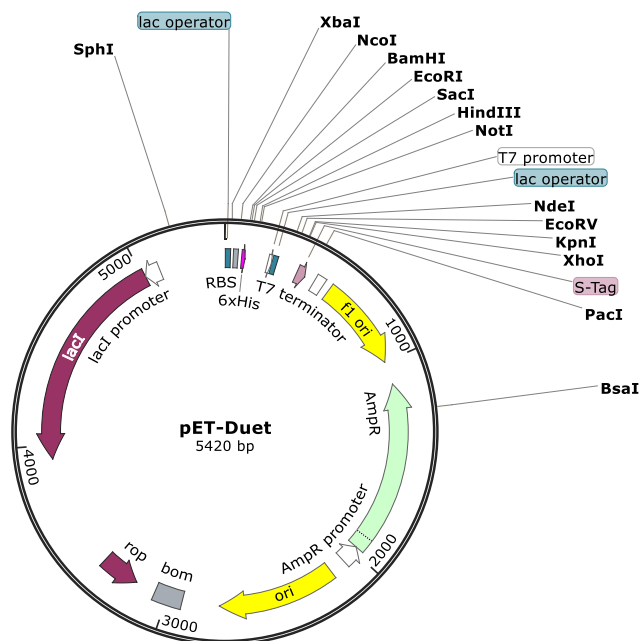
Exprimierte ClpP-Homologe	Detektion von ClpP3	Prozessierung	Kommentar
ClpP1kurz	ja	ClpP1kurz nein	
ClpP2lang	ja	ClpP2lang nicht detektierbar	
ClpP2lang-His	ja	ClpP2lang-His Teilprozessierung	
ClpP1kurz, ClpP2lang	nein	ClpP1kurz ja, ClpP2lang nicht detektierbar	
ClpP1kurz, ClpP2lang-His	nein	ClpP1kurz ja, ClpP2lang-His ja	
ClpP1kurz, ClpP2kurz	ja	ClpP1kurz unvollständig, ClpP2kurz ja	
ClpP1kurz	ja	ClpP1kurz nein	
ShClpP1Cat	ja	ShClpP1Cat nein	
ShClpP1Cat, ClpP2lang	ja	ShClpP1Cat nein, ClpP2lang nicht detektierbar	Kombination von ClpP-Homologen verschiedener <i>Streptomyces</i> -Spezies
ShClpP1Cat, ClpP2lang-His	ja	ShClpP1Cat nein, ClpP2lang-His fast vollständig	
ShClpP1Hyp	ja	ShClpP1Hyp unvollständig	
ShClpP1Hyp, ClpP2lang	ja	ShClpP1Hyp unvollständig, ClpP2lang nicht detektierbar	Kombination von ClpP-Homologen verschiedener <i>Streptomyces</i> -Spezies
ShClpP1Hyp, ClpP2lang-His	ja	ShClpP1Hyp unvollständig, ClpP2lang-His ja	
ClpP _{ADEP}	ja	ClpP _{ADEP} nicht detektierbar	
ClpP _{ADEP} -His	ja	ClpP _{ADEP} -His nein	
ClpP1kurz, ClpP _{ADEP}	ja	ClpP1kurz nein, ClpP _{ADEP} nicht detektierbar	
ClpP1kurz, ClpP _{ADEP} -His	ja	ClpP1kurz nein, ClpP _{ADEP} -His nein	
ClpP2lang, ClpP _{ADEP}	nein	ClpP2lang nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} nicht detektierbar	
ClpP2lang, ClpP _{ADEP} -His	nein	ClpP2lang nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} -His ja	
ClpP2kurz, ClpP _{ADEP}	ja	ClpP2kurz nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} nicht detektierbar	
ClpP2kurz, ClpP _{ADEP} -His	ja	ClpP2kurz nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} -His unvollständig	

ClpP2lang-His, ClpP _{ADEP}	teilweise	ClpP2lang-His ja, ClpP _{ADEP} nicht detektierbar
ClpP1kurz, ClpP2lang, ClpP _{ADEP}	nein	ClpP1kurz unvollständig, ClpP2lang nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} nicht detektierbar
ClpP1kurz, ClpP2lang, ClpP _{ADEP} -His	nein	ClpP1kurz unvollständig, ClpP2lang nicht detektierbar, ClpP _{ADEP} -His unvollständig

Tabelle 34: Funktionalitäten von ClpP-Protein-Kombinationen. Der Übersichtlichkeit halber wurde in dieser Tabelle zusammengefasst, welche Funktionalitäten bei der Expression von verschiedenen ClpP-Homologen in *S. lividans* $\Delta clpP1P2$ mittels Western Blot detektiert werden konnten. Die Detektion von ClpP3 diente als Biomarker für einen unvollständigen oder unterbundenen Abbau vom natürlichen Substrat PopR und somit für das Fehlen eines proteolytisch aktiven Komplexes. Im Western Blot konnten außerdem vollständig prozessierte („ja“) oder vollständig unprozessierte („nein“) ClpP-Homologe detektiert werden. „Unvollständig“ beschreibt das Vorhandensein der unprozessierten Form gemeinsam mit der prozessierten Form. „Teilprozessierung“ beschreibt eine Prozessierung, die aber nicht der vollständig prozessierten Form entspricht. Aufgrund der genutzten Antikörper konnten verschiedene ClpP-Homologe und ihre Prozessierung unter bestimmten Bedingungen nicht detektiert werden („nicht detektierbar“).

6.2 Vektorkarten

6.2.1 Konstrukte basierend auf pET-Duet



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

```

ggggaattgtgagcgggataacaattcccctctagaataatTTTgttaactttaagaaggagatataccatgggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatc
cgaattcgagctcggcgccctgcaggtcgacAAGCTTgcgccgcataatgcttaagtcgaacagaaagtaatcgtattgtacacggccgcataatcgaataat
acgactcactataggggaattgtgagcgggataacaattcccctcttagtatttagttaagtataagaaggagatataCATATGgcagatctcaattggatcggcc
ggccacgcgatcgtgacgtcggtagcctaccCTCGAGtctgtaaagaaccgctgctgcaaatTTTgaacccagcacatggactcgtctactagcgcagcttaattaac
ctaggctcgtccaccgctgagcaataactagcataaccctggggccttaaacgggtcctgaggggttttTgctgaaggaggaaactatataccggattggcgaatg
ggacgcgccctgtagcggcgattaagcgcggcgggtgtggtggttacgcgcagcgtgaccctacactggcagcgccttagcggcctccttctgctttctccctc
ctttctgccagcttgcggccttccccgtaagctcctaactcggggcctccttttagggttccgatttagtgcttacggcacctcgaccccaaaaactgattagggg
gatggttcacgtatggggccatgcctgatagacggttttTgcctttgacgttggagtccagttcttaaataggactctgttccaaaactggaacaactcaacc
ctatctcggtctattctttgattataaggattttccgatttcggcctattggttaaaaaatgagctgatttaacaaaaatTTTaaacgcaatTTTaaacaaatataactg
ttacaattctggcggcacgatgggatgagattatacaaaaggatcttcacctagatccttttaataaaaaatgaagttttaaatacaatcctaagatatatagtaaact
tggtctgacagttaccaatgcttaacagtgaggcacctatctcagcagctgtctatttTgctcatcatagttgctgactccccgctgtagataactacgatacggg
agggcttaccatctggccccagtgctgcaatgataaccgcgagaccacgctcaccggctccagatttatcagcaataaccagccagccggaaggcggagcgcaga
agtggtcctgcaactttatcccctccatccagctctattaattggtgcccgggaagctagagtaagtagttcggcagttaatagttgCGcaactgttGCCATTGctaca

```

ggcatcgtggtgtcacgctcgtcttggatggcttattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatccccatgttgtgcaaaaaagcggtagctcct
tcggtcctccgatcgttgcagaagtaagttggccgagctgttatcactcatggttatggcagcactgcataatctcttactgtcatccatccgtaagatgctttctgtg
actggtgagtactcaaccaagtattctgagaatagtgtatcgccgacagcagttgctcttggccgctcaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaa
agtgtcatcattggaaaacgttctcggggcgaaaaactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcagtaaccactcgtgacccaactgatctcagcatc
tttacttccaccagcttctcgggtgagcaaaaaacaggaaggcaaaaatccgcaaaaaagggaataaggcgacacggaatgttgaatactcactctctcttttc
aatcatgattgaagcatttatcagggtattgtctcatgagcgatacatatttgaatgtatttagaaaaataacaaataggctatgacaaaaatcccttaactgagttt
tcgttccactgagcgtcagaccctagaaaaagatcaaggatctcttgagatcctttttctgctgtaactctgcttgcgcaaaaaaacaccgctaccagcg
gtggttgttggcggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactggctcagcagagcagataccaaatactgtccttctagtgtagccgtagttaggccac
cactcaagaactcgtgacaccgctacatacctcgtctgtaactcctgttaccagtggtcgtccagttggcgataagtcgtgtcttaccgggttgactcaagcga
tagttaccggataaggcgacggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagccagcttggagcgaacgacctacccgaactgagatacctacagcgtgagct
atgagaaaagccacgctcccgaaggagaaagcggacaggtatccggttaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgagggagcttccaggggaaacg
cctggtatctttagtctgctggtttccacactcgtactgagcgtcgtattttgtgatgctcgtcagggggcggagcctatgaaaaacccgcaacgcccgtt
tttaccggttctggccttttctggtcctttgtcacaatgttcttctcgttatccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagttagctgataccgctcggc
agccgaacgaccgagcgcagcagcagtgagcagggaggaagcgaagagcgcctgatcggtattttctcttacgcatctgtcgggtatttcaaccgcatataggtg
cactctcagtaacatctgctgatgcccagatgtaagccagatatacactccgctatcgtcactgactgggtcatggctgcgccccgacaccgcaacaccgctga
cgccccctgacgggctgtctgctcccggatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgcagagggtttaccgctatcaccgaaacgcgcga
ggcagctgcggttaaagctcatcagcgtgctggaagcatttcagatgtcgtcctgttcatccgctccagctcgtttagtttccagaagcgttaatgtctggtctt
gataaagcgggcatgtaaggcggttttctgtttgtcactgatcctcgtgtaaggggatttctgttcatggggtaagataaccgatgaacgagagaggat
gctcacgatacgggttactgatgataacatgccgggtactggaacgttgtgagggtaacaactggcggatggatgcccgggaccagagaaaaatcactcaggg
tcaatccagcgtcttgaataacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcactcgcgatgagatccggaacataatggtgagggcgtgacttccgctt
ccagactttacaaaacacggaaccgaagaccattcatgttgtgctcaggtgcagacgttttgcagcagcagcttccagctcgtcgtatcgggtattctt
gtaaccagtaagcaaccccaccgctagccggctcctcaacgacagggagcagatcatgctagtcatccccgcgcccaccggaaggagctgactgggtggaag
gctctcaagggatcgtgagatccgggtcctaagtagtgagtaactacattaatgctgtgctcactcccgttccagctgggaaacctgtcgtccagcgtg
cattaatgaatcgccaacgcggggagagggggttgcgtattggggcggggggttttcttaccagtgagacgggcaacagctgattgcccttaccgct
ggcctgagagagttgcaagcgggtccacgctggttggccccagcaggcgaatacctgtttgatggtggttaacggcgggataaacatgagctgtctcgtatcg
tcgtatccactaccgagatgtccgaccaacgcgcagcccggactcgttaatggcgccattgcgcccagccatctgatcgttggcaaccagctcagctggga
acgatgccctcattcagcatttgcaggtttgtgaaaaccggacatggcactccagctcctccgttccgctatcggctgaatttgattgagtgagatattatgcc
agccagccagacgcagacgcgagacagaactaatggcccgtaacagcgcgatttctggtgacccaatgagaccagatgtccacgcccagctcgtaccg
tcttcatgggagaaaaataactgtttaggggtgctggtcagagacatcaagaataaccgcccgaacattagtgacggcagcttccacagcaatggcactcgtgcat
ccagcggatgtaataatgaccccactgacgcttgcgcgagaagattgtcaccgcccgtttacaggcttgcagcccgttcttaccatcgacaccaccagcgtg
gcaccagttgatcggcgcgagatgtaacgcccgcacaatttgcgacggcgcgtgcagggccagactggaggtggcaacccaatcagcaacgactgttccccgc
agtgtgtgcccacggttgggaatgtaatcagctccgcatcgcgcttccacttttcccgttttgcgaaaaagtggtggtcctggtcaccacgcccggaaacg
gtctgataagagacaccggcactctgagacatgataacgttactggttccacattaccaccctgaattgactcttcccggcgctatcatgccataccggaag
gttttgccttccaggttccgggatctgcagcctccttattcgcactcctgactcattaggaagcagcccagtaggttagggcgtttagcaccgcccgcgcaa
ggaatggtgatgcaaggagatggcgcacaacagctccccggccacggggcctgcccacataccacgcccgaacaagcgtcagagcccgaagtggtgagcccg
atctccccatcggtgatgctggcgatagggcggcagcaaccgacactgtggcggcggatgcccggcagatcgtcggcgtgagagatcagatcagatcgtat
cccgcgaaattaacgactcactata

6.2.1.1 pET-Duet_Adel

Das Insert *adel* wurde mit den Primern MtbH_for-Nco und MtbH_rev-Hind amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *HindIII* in pET-Duet kloniert.

CCATGGgtgactatcgttccaatccctttagggacaacgacagcgaatactggcgtgtcaacgacgaaggacaatactcactctgcccgcgtataccgctgc
cctgagggatggcatgtagcaccagaaggctggcctcaggtctcctggaatacattgaggcgaatggacggacatcgtccccggagccttcccgaagcgtc
acgaggccacgacggcaactcagtagAAGCTT

6.2.1.2 pET-Duet_Adel_HisA3

Das Insert HisA3 wurde mit den Primern A-Domain_for-His und A-Domain_rev1-Xho amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in pET-Duet_Adel kloniert.

CATATGcatcatcatcatcatcatgatccgggtgtcgggtcgggtcgggtgagctgctgctcggcggacgagcgtgccagatcatcaggctcggatccaccga
ccggaggatgatcctccgagcgtcctcggaggcgttcgaggcgcaggtgcccgtgacgcccgggggtggcgtggtgtgtgacgaggtcagggttccgatgc
ggagtgaatgagcgggcaatcggctggcgcggttctggttgcgcggggcggggcggagcgggttgggtgggctggttccggtcgggtggagttggtggtg
gcggtctggcgttgaaggccggggcggcgtatctccgttggatgaggatccgcgcgagcgggttggcgttcatggtggggatcggcgcccgttctgctggt
gtccaccgagggcgggtggtgcccggcgtgcccggggatgtgagcgggtgctggtgacgatccggcgggtgctggaggagctggcgggtcgtcccggggcagatgctg

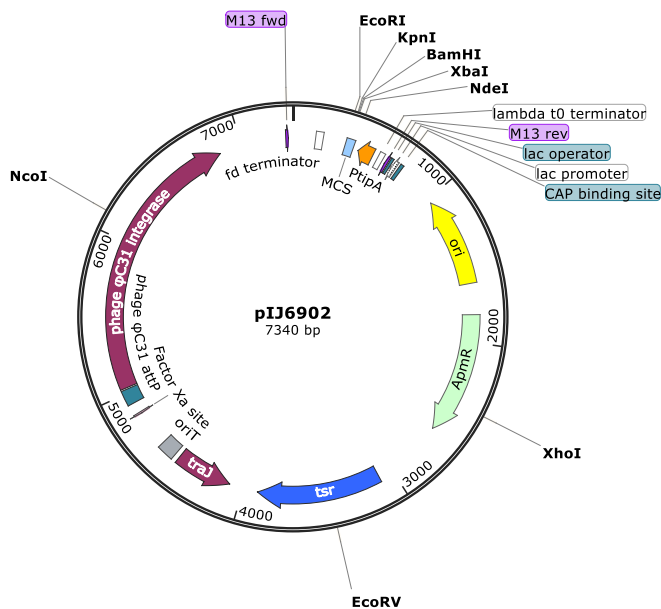
agctggtgagcggctgggtgtggtggggccgagtcgccgctatgtgatctacagctccggttcaccggcacaccaagggcgtggtgatgacggtgaggcgc
 tggccaatctgattgcttggcatgtggcgacgatcggggcggggccggaggcgtcggtggcgagttcacggcgatcagtttcgatgtgtcgggcagggatctgga
 gacgctggggctcgggtaagcgtctggtggttccggatgctgatgtgcccggggacggcgcggttcgcccgggtggaggatcgaatcacggaactgtacgc
 gccaacgtcatggtggaagcggctcgaagccgctcgaacaaccgacccttcccctccaccacatcgccaggccggtgaagcactcgactgagttc
 cgggctcaggacttttctccgatcctccgaccgccgatgcacaaccactacggccccgctgagacgcacgtcgtcacggctcactcctgtcggacgatgtacgg
 gatggcggggcagcgctccgattggtcggccgatttgaatacggggtgtatgtcgtgatgccggctggcgccggtgcccgggtggttgcgggtgagttgtacatc
 gcggcgccgctggcccgccgtaccacgacgtcctggtctgacggcgagcggtttgtggcgaatccgttactcctggtgagcggatgtatcgactggggatc
 tggcgggtggaatccgagggtgagctggagtatctggcggggcactcccaggtgaaggtcggggttccggatcgagctgggtgaggtcgagacggtgctgg
 ctggccggccgaggttggcaggcggcggtgatggtgctgaggaccgtcccgggtgatcagcgcatcgtggcctatggtgcccgggtcggggcgtggtggatg
 agcgtgtcgtcgtgggctctctggaggttgcggagtagatggtgcccgtcggcggtggtgctggacgcgctgccgttgaccccagcgcaaggtggaccg
 gcgggccttcccgcgccgttatcgacactgagtcctcgggcccaggccccggacaccccaggaggagatcctctcgggagtttcgccaatgctctgggagttcc
 agggtcgattgaCTCGAG

6.2.1.3 pET-Duet_Adel_HisA6

Das Insert HisA6 wurde mit den Primern A-Domain_for-His und A-Domain_rev2-Xho amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* in pET-Duet_Adel kloniert.

CATATGcatcatcatcatcatcatgatccgggtgctgggtcggtgagctgctgtcggcggacgagctgcccagatcatcaggctcggatgccaccga
 ccggagggtgatctccgagcgtctcggaggcgttcgaggcgcaggtgcccggtagcggccgggggtggcggtggtgtgacgaggtcgaggttctgatgc
 ggagttgaatgagcgggcaatcggctggcggttctggttgcgcggggtcggggccggagcggttggtggggctggctgttcccggtcggtaggttgggtg
 gcggtctcggggttgaagccggggcggcgtatctccgttggatgtggagtatccgcgcgagcggttggcgttcatggtgggggatcgccgcccgttctggt
 gtccaccgaggcgggtggggcggcgtgccgggggatgtggagcgggtgctgctggacgatccggcggctcggaggagctggccggctcggcggcgatgctg
 agtctggtgagcggctgggtgtggtggggccgagtcgccgctatgtgatctacagctccggttcaccggcacaccaagggcgtggtgatgacggtgaggcgc
 tggccaatctgattgcttggcatgtggcgacgatcggggcggggccggaggcgtcggtggcgagttcacggcgatcagtttcgatgtgtcggcgagggatctgga
 gacgctggggctcgggtaagcgtctggtggttccggatgctgatgtgcccggggacggcgcggttcgcccgggtggaggatcgaatcacggaactgtacgc
 gccaacgtcatggtggaagcggctcgaagccgctcgaacaaccgacccttcccctccaccacatcgccaagggggaggctcggggctcacc
 ctgcccgtgcgagttcatcagcggctgagcccgtcgtcggctccacaaccactacggacctccgagaccatctggtcacggccattcctgtcggacatgtgacg
 ggatggcggggcagcgctccgattggtcggccgatttgaacacggggtgtatgtcgtgatgccggctggcgccggtgccggtgggtgttgcgggtgagttgaca
 tcgcccggcggccctggcccggctaccacgacctctggtctgacggcggagcgggttggcgaatccgttactcctggtgagcggatgtatcgactgggga
 tctggtcgggtggaatccgagggtgagctggagtatctggcccgggactcccaggtgaaggtcggggcatacgcgtgaaactaggcgagatcaggcggctct
 cgctggcaccggcagctgccaggcagcgggtgattgcgcgtgaggccccggcggtggacccccctcgatacgtcctggtcgggctcgacgtgga
 cgttccggcgtcgcacttacctggccgcggtgccggagcacatgatgccctccgcatcgtgatgctggacgcttccgttgacacctagcggcaaggtggac
 cggcggcccttctgcgccgttatcgacactgagtcctcgggcccaggccccggacaccccaggaggagatcctctcggcgtgttcgccaatcttggggatg
 cccgggtcgattgaCTCGAG

6.2.2 Konstrukte basierend auf pIJ6902



(Huang et al., 2005)

Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

gatcagccccgaaaagcggcctttgactccctgcaagcctcagcagccgaatataatcggttatgcgtggcgatggttggcattgtcggcgcaactatcggtatca
agctgtttaagaaattcacctcgaagcagctgataaacgatacaataaaggctctttttggagcctttttttggagatttcaactgtaaaaaattattatcgca
attcctttagttgctctttctactcctcgaactgttgaagtgttagcaaacctcacaagaaattcattactaactgctggaagacgacaaaactt
agatctggggaattcgagctcgtaccggGATCtctagagtcgacctgaggcatgcaagcctCATATGtccgctcctctctgacccgtccagctgcctc
ctcagtgacgtgaggtcaagcccggacttccgctgccacccgtgagccgctgctgctcctcagcccagatcccgcgtccagtaacgacct
cagaactccatctggatgttcagaacgctcgtggtccgcccggcgtttttattggatgaattcgaatcatgcatagctgttctgtgtgaaattttaccgctca
caattccacacaacatacagccggaagcataaagtgaagcctgggggtcctaataagtgagctaaactcacattaattcgctgcgctcactgccgcttccagctg
ggaaactgtcgtccagctcattaatgaatcgccaacgcgcccgggagaggcgttgcgattggcgctcctcgcctcactgactcgtcgcctggct
gttcggctcggcgagcgtatcagctcaaggcggtaatacggtatccacagaatcaggggataacagggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaa
aggccaggaaaccgtaaaaaggccggtgctggcgttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgagcctcaagtcagaggtggcgaaccgca
caggactataaagataaccaggcgttcccctggaagctccctgtgcctcctgtccgacctccgcttaccggatcctgccccttctcctcgggaagcgt
ggcgttctcatagctcagcgttaggtatctcagttcgttaggtcgtcctcaagctgggctgtgacgcaaccccccttcagcccagcctgcgcttacc
ggtaactatcgtcttagtccaacccgtaagacacgactatcgcactggcagcagcactggtaacaggattagcagagcaggatgtaggcgtgctacagag
tcttgaagtgtggcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctgcgctcgtgtaagccagttacctcggaaaaagagttgtagcttgcggca
aacaaccaccgctgtagcgtggtttttttgtaagcagcagattacgcgcaaaaaaggatctcaagaagatccttgcattctttctacggggtcagcctc
agtggaacgaaaaactcagtttaagggttttggctagagattcaaaaaggatctcacttagatcctttggttcagtgcagctccatcagcaaaagggtgata
agttatcaccaccgactattgcaacagtgccgtgctgctatgctgactgctatcagcggggagtgcaatgctgtgcaatacgaatggcgaaaaggccgag
ctcatcggctcagcttctcaacttgggggtaccgccggcgtgctgctggtccacagctcctcctgtagcgtccgccccctgaagatggccacttggactgatcag
gccccgtgctgctgggtcccggaggacgctcgtcagccctggtgctgaggtcggcagcagagccgttcgatcctgccagctgcccgttaccggacctgg
agttgtctgacacattctggcctgcaaatgtaaacgcagcagccatcatttgccttgcgagcggggccacaggcagagcagatcatctgatcattgc
ccctgccactcactcctcgaagcccggcctgcccgtgctcatgaactcagtgaggcaggtactctcctcggcgtgggacacagatgccaacacagcgtgcatctggc
gagttgagggcaaggtccctatgggggtccgagacactgcacattctcaggtaggcaagttggtagcgtcgtattatcagagaatgacctgctgtgagccttt
gccttggcggacaggtggcctaaggagaagagcctcagaaggaaggtccagtcggctcagcttctcgtggtgatccgctcccgcagacttggcgacagccctgg
gtcaactgggccgagatcgttgcctcctgcacccagagccgggatgcgaagaatgcgagccgctccagtcgattggctgagctcatgagcgggaaacga
gatgacgttggggggcaaggtcgcgctgattgtggggcaacagctggagccgatcggggatgcttcttccagctcgtgatgatgctgacgtcaatgccgttt
ggcctccgactaacgaaaaatcccatttggacggctgatccgattggcagcggcagcggcaatggcgggagcagagcctcgtccggggcaatgagatgaaaa
gcctgaactaccgcagctatgggccccggcagctagcagcgaataactcatatagcgggagcagccgcccgggtcccggacgggaagagcggggagcctt
gccagagagcagcactccccctgctgttggattgccggtcagggcagccatccgcatcgtcgtgtaggtgtcacccccaggaaatcgtcactgacacagca
gcccgttaggacgacactgaggtggacacatcgaaatccgtccgatcccggctgagcggatcatcagtgaccagaacccgtccgacccaataaagaca
acgttgatcagggagctgagccctcatgacagcagcagcggccgggtggagttcatcaggttctagggcagcagcagcagctcttccatctgagttgctggatc
gtcgggcccagcaacataaccggtccgctcatgactcctcagctcgtcaaccagttgttaagggggagcggaaaggccaagacattcggcatgcccgcgtccctc
cccggccaggttcggcgatcgcgagccggcgtggggaactcgtcttcgacggggtgaagatcgtcgggaacatcggcgatagtagcacgctcgtcgcgct
cggagctcggggatcatcctggtcgacagtgacatcaccagctcgcggaccggcgtctccaaaggccagccgaggttactcctccccctcgttctcctccg
gtcgcgagggagccatcgctcattcgggacagcgtatgcagctgacgctcaaggccgatggcagacattccgtgaaaggaactcgggacaatccggatcggc
tggccttctgttcgagcgaaaaagggtggccttccgactgttcagggagcgtctccgctcggtttccatccccatgatgagcagaccagctctcaacgctt
ccgttccccggaatcgctgcacgagaggatcagaggaatcgcggcaaccgataagcctcgttctcggagcctcgttctcgttagctgagctgacct
gcaggtccccgggagcgttcttgcctgctcgtggtgatgtactcaccagctcccgaagtcgtccttctgatggagcagcagggacgctgttggcaatcagcgc
acccccggcgttttagggcgtaaaaaagtcagctcgtcctcggggaccaccgccatcatgaccttgcgaagctgctcgtctctctctgatctcgcagcag
ggcagagatcgtggcatcaccgaaccgctgctcgggtcgtcggtaggacaggttccagaggcccccagggcggccaggtcgcattgatcggggccagct
cgggacgtgctcatagtcacagcagcccgtgattgtagccctggccagcggccagcaggtaggccagaggtcagcggcccccaggtcgcattgatcggggccagct
ctcgttctgctggaaggcagtagacattgataggtgggtccttctcgttgggttccatcagccatccttgcctcctcgttaccctcagctgttaccggcgtgacggcc
agcctcgcagagcaggttccgctgagaccgccaggtgcaataagggaagtgagaagaagaaaccccgtcgggtgggctacttaccctatcctcccggct
gacccgttggataaccaaggaaagtcacagaccccttggcaaatcctgtatctcgtcgcaaaaaggatggatataccgaaaaatcgctataatgacccgga
agcaggggtatgcagcggaaaagatccgtcagctcagggcagcagcagcttagcagctccgaaggcgtggcgggctccccgtcgggagcaatcgc
cctgggtgggtacacgacgcccctctagcccctgactgagggacacccgaagcccggcggcaaccctcagcggatgccccgggctcacgtttccaggtcag
aagcgttttgggagtagtgcctaacctgggtaacctttagttcctcagttggggcgtagggtcccagatgacacaaggggttggaccgggtggacagcgt
acgcgggttctacagcctcagctgcgagcgcgaaaaatcagcgcagcaagcccagcagcagcagcgttagcggcaacgagaagacaaggcggccgacctcagc
cgaagtcagcgcagcggggccggtcaggtcgtcgggcatttcagcgaagcgcgggacagcgtcggcgttcgggacggcggagcggcggagttcgaacgcatcc
tgaacgaatcccgcggggccggtcaacatgatcattgtctatgacgtgtcgccttctcgcgctgaaggtcagtgacgcttccgattgtctcgaatgtctcgtccc
tggcgtgacgattgttccactcaggaaggcgttccggcagggaaacgtatggacgtgattcactgattatcgggctcagcgtcgcacaaaagaattcgtcgt

aagtcggcgaagattctcgacacgaagaaccttcagcgcgaattgggcggtacgtcggcgggaaggccttacggcttcgagcttcttcggagacgaaggagatc
acgcgaacggccgaatggtcaatgtcgtcatcaacaagcttgcgactgcaccctccctaccggacccttcgagttcagcccagcgtaatccggtggtggc
gtgagatcaagacgcacaacaccttccctcaagccggcagtcgaaccgcttaccggggcagcatcacgggcttgaagcgcagtgacgctgacccgtgc
cgacccggggcgagacgattgggaagaagaccgttcaagcgcctgggacccggcaaccgttatcgcaatccttcgggacccgctattgcccgtgagg
tgatctacaagaagaagccggcagccacccgaccgaagattgagggttaccgacttcagcgcgaccgacacgctcggcggctgagcttgattgggaccg
atcatcgagcccgtgagtgatgacttcaggcgtggtggagcggcagggggcgggcaaggggcttccgggggcaagcattctgcccacatggacaagctg
tactgagtggtggcgcgtcatgacttcgaagcgggggaagaatcgatcaaggacttaccgctcgcgctcgggaagggtgctgaccgtccgacacgtggcag
cacgaaggcagctgcaacgtcagcatggcggcactcgacaagttcgttgcgaacgcatctcaacaagatcaggcagccgaaggcgacgaagagacgttggcgt
tctgtgggaagccgcccagccttcggcaagctcactgaggcgcctgagaagagcggcgaaacggggcaaccctgttcggagcgcgacgacccctgaacccctg
aagagctgtacgaagaccgcccggcagggcgcgtacgacggaccgttggcaggaagcacttccggaagcaacagggcagcgtgacgctcggcagcaaggggcgg
aagagcggcttgcgaactgaagccggaagcccgaagcttcccttgaccaatggttccccgaagacgacgctgacccgacggccctaagctggtggg
ggcgcgctcagtagacgaagcgcgttctgctgggcttctgtagacaagatcgttgcacgaagtcgactacgggacggggcagggaaacccatcgagaag
cgcgcttgcacgtggggaagccgaccgacgacgaagacgaccccaggacggcaggaagacgtagcggcgtgacgagacacccgggaagcctga
tctactgctgcgagaagttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggaggggcaagaatctcgtgcttctcagcttcgatgtaggaggcgt
ggatagtctcgggtaaatagctgcgagctggttttcaaaaagatcggttatgtttatcgccacttgcacgcccgcctcccattccggaagtgcttgacattggg
aatttatcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcaggcgcattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcggtcggg
cctcttcgctattaccagctggcgaagggggatgctgctcaaggcattaagttgggtaacgcccagggttccagtcacgacgttgaacacgacggccagctg
caagcttgggctcaggtcagctctag

6.2.2.1 *pIJ6902clpP_{ADEP}*

Das Insert *clpP_{ADEP}* wurde mit den Primern pGM_Nde und pSET_BamHI amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in pIJ6902 kloniert.

GGATCCctactctgctccccgatattgccaggaacggtagggctacatattcaaccctgtcggcaggccgtactcactgcttctgctcagcggagaaccacctgtc
gcggtctgaatccccttaatctcctcgacagtcctcgggtgtgctgagccgtgatgtcaatcatgctcttttgacacgaatgagtcgctcggcatgaatcttgatgtca
ctggcagagccgagacggcagaggctggtgatgaggatttccgcatgaggcagaacgatgcgcttgcctggggtgcccgagtcaggaggaattggccat
cgaggctgcggtccccatcgtactgtgactacatcttctcgtatgattcatggtgctgtagatagccattcccgggtgacggaccacccggtgagttgatataag
gctgatgtcggaggggaatcctcgaacagaagcagttgagcgaatcgattgcttccggcgtcatgaccttggaccagcataataacgctcgtccatga
ggcagtcattacctggtcgttcagggtccaccgtgatgcgaggggtgcgaccctcagttccttaatgctcttCATATG

6.2.2.2 *pIJ6902clpP_{ADEP-His}*

Das Insert *clpP_{ADEP-His}* wurde mit den Primern *Nde_{clpPA_for}* und *BamHI_{clpPA-His_rev}* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in pIJ6902 kloniert.

GGATCCctaatgatgatgatgatgcttctgctccccgatattgccaggaacggtagcggctacatattcaaccctgtcggcaggccgtactcactgcttctgca
gcggagaaccacctgtcgcggtctgaatccccttaatctcctcgacagtcctcgggtgctgagccgtgatgtcaatcatgctcttttgacacgaatgagtcgctc
gcatgaatcttgatgactgagcagccgagaccggcagaggctggtgatgaggatttccgcatgaggcagaacgatgcgcttgcctggggtccccgagtc
aggaggaattggccatcagggctcgggtccccatcgtactgtgactacatcgttctcgtatgattcatggtgctgtagatagccattcccgggtgacggaccacc
cggtagttgatataaaggctgatgtcggaggggaatctcctcgaacagaagcagttgagcgaatcgattgcttccggcgtcatgaccttggaccagcata
ataatacgtcgtccatgaggcagtcattacctggtcgttcagggtccaccgtgatgcgaggggtgcgaccctcagttccttaatgctcttCATATG

6.2.2.3 *pIJ6902PROL*

Das Insert *si-adeA* wurde mit den Primern *PROL_Gibs_for* und *PROL_Gibs_rev* amplifiziert und mittels Gibson Assembly in pIJ6902 kloniert.

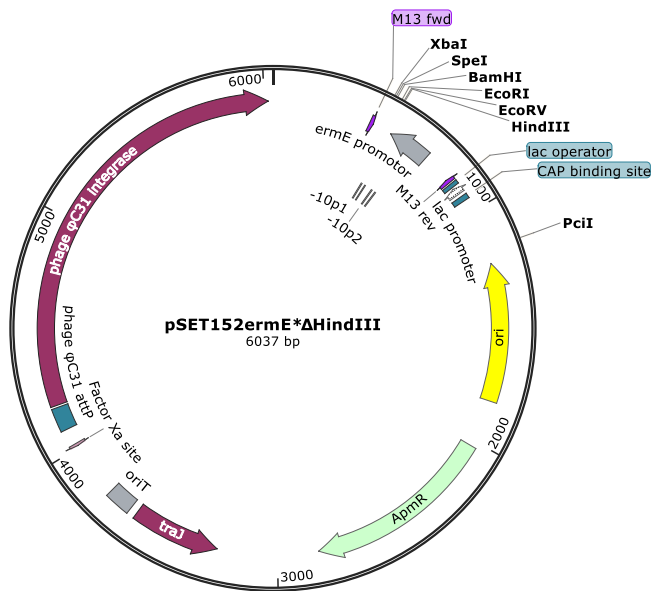
CATATGcagtggtggtggtggtggtgctgcatgcatctcggcaggagaaaaggccccgggacgaggacgaaccatcgcggtcactgatccagcagccttttgc
cagctgcacgcaatcccctaattgggaaaaatcgaataactgactgcaggcaccaccaccaccactgCATATG

6.2.2.4 *pIJ6902NRPS*

Das Insert *si-adeG* wurde mit den Primern *NRPSneu Fwd* und *NRPSneu Rev* amplifiziert und mittels Gibson Assembly in pIJ6902 kloniert.

CATATGcagtggtggtggtggtggtgctgcatgcccacttcgctgagccgaggacaatggcaggacaattccggcggccactggacaacgtaagtctccctg
cttcacgcatttgaaccagctgttgagaagcgcagacagcgcattcagatggtctgcaggcaccaccaccaccactgCATATG

6.2.3 Konstrukte basierend auf pSET152ermE*ΔHindIII



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

atctacgtctgtcagaagtttctgatcgaaaagttcgacagcgtctccgacctgatgcagctctcgagggcgaagaatctctgtcttcagcttcgatgtagggaggc
 gtggatagtctctcgggtaaatagctgcgccgatggtttctacaagatcgttatgtgatcggcactttgcatcggccgctcccattccggaagtgttgacattg
 ggaatttatcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccgcatcagggcgcattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgatcggcgc
 ggctcttcgtattacgccagctggcgaagggggatgtgctgcaaggcattaagtgggtaacgccagggtttccagtcacgacgtttaaaccgacgccagt
 gccaaagctcgggctcaggtcactctagaactagtGGATCCcccgggctcaggaattcgatacAAGCTTatcgataaccgctgatcctaccaaccgacgatt
 gtgccacaacagcatcgggtccacgtgtggaccgctcggctcagatcctcccgcacctctccagccgcaagatcgaccgctgacactcgatcggcgaatc
 accgactagatcggcgcaagccgactcgaacggacactcgcagctgccccttctggacctgcaagccgctacactgaaactccggtccgacatcgacc
 aggcgtgccggcgtgctcgggctgggctggacctcagggggggcccggtacaattcgaatcatgcatagctgtttctgtgtgaaattgtatccgctcacaattc
 cacacaacatcagcgggaagcataaagtgtaaagcctggggctcctaagtgtgagtaactcacattaattgcgttcgctcactgcccgtttccagctgggaaa
 cctgtcgtccagctcattaatgaatcgccaacgcggggagagcgggttgcgtattgggctcttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcgttgc
 gctcggcgagcggatcactcactcaaggcgttaacggttatccacagaatcaggggataaacgaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggcc
 aggaaccgtaaaaaggcggctgtggtggttttccataggctcccccctgacgagcatcacaataatcgacgctcaagtcagagggtggcgaaccggcagcga
 ctataagataccagggctttcccctggaagctccctcgtcgtctcctgttccgacctccgcttaccgatacctgtccgcttttccctcgggaagcgtggcgc
 tttctcatagctcagctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcccaagctggcgtgtgacgcaacccccgttcagcccaccgctgccttatccggtaa
 ctatgctttagtcaaccggtaagacacgactatcgcactggcagcagccactgtaacaggattagcagagcgaggtatgtaggggtgctacagagttctg
 aagtgtggcctaactacggctacactagaagaacagatttggatctcgcctcgtgtaagccagttaccttcgaaaaagagttgtagcttctgatccggcaaa
 aaccaccgctgtagcgggttttttggttgcaagcagcagattacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatcttttctacgggctcgcgctcagtg
 gaacgaaaaactcagttagggtttttggtcatgagattcaaaaaggatcttcaactgatccttttggttcatgtgcagctccatcagaaaaagggatgataagtt
 atcaccaccgactatttgaacagtgccgttgcgtgatcactgatcagctgatcagcgggtgagtcgaatgctgtgcaatacgaatggcgaaggccgagctcat
 cggctcagcttcaaccttggggttaccgccggcgtgtgctgctggtccacagctcctccgtagctccggcccctcaagatgggaccattggactgatcagggccct
 gcgtcgtcgtgggtcgggagggacgctcgtcatgcccctggtgaggtctggacgacgagccgttcgatcctgccagctcggcgttacaccggaccttggagttg
 tctctgacacattctggcctgccaatgtaaagcagcgcgccatcatttgccttccgagcggggccacaggcagagcagatcatctgatccattgccctg
 ccactcactcgcctgcaagcccgtgcccgttccatgaactcagtgaggcaggtactctcctcggcgtgggacagatccaacacgacgctgatcttccgagtt
 gatggcaagggtccctatggggtcggagacactgcaccattctcaggtggcaagttggtacgctcagatattctcagagaatgaccactcgtgagcgtttgctt
 ggccgacaggtggctcaaggagaagagcctcagaaggaaggtccagctggtcatgcttctcgtggtgatccgctcccgcagattgtggcagacccctgggtca
 ctggccgagatcgttgcattcctcgtatccgagggggatgcaagaatgcgactcgcctcgcagctgattggctgagctcatgagcggagaacgagatga
 cgttggaggggcaaggtcgcgtgattgctggggcaacacgtggagcggatcgggattgtcttctcagctcgtgatgatgctgacgctcaatgccgtttggcctc
 cgactaacgaaaaatcccgcatttggacgctgatccgattggcagcggcgaatggcggagcagacgctcgcggggcaatgagatgaaaaagcctga
 actaccgcgactatcggccctggcagccagctagagctgacactcaggtccccggggatcggcttgccttgcctcgtcgtcgtgtagtactcaccagctccgga
 tcgcttcttgatgagcgcagtggtggcaatcacgcgacccccggcgttttagcggtaaaaaagtcaggtcctgcctcggggcggaccagccca
 tcatgaccttccaagctcgtcgttctctctgatcttcgcagcagggcgagatcgtggcatcaccgaaccgcccgtgcgcccgtcgtcgtgagccagagttc
 agcagggcccagggcggccaggtcgcattgatcgggcccagctcgcggactgctcatagtcacgacgcccgtgattttagccctggccgacggccagcagg

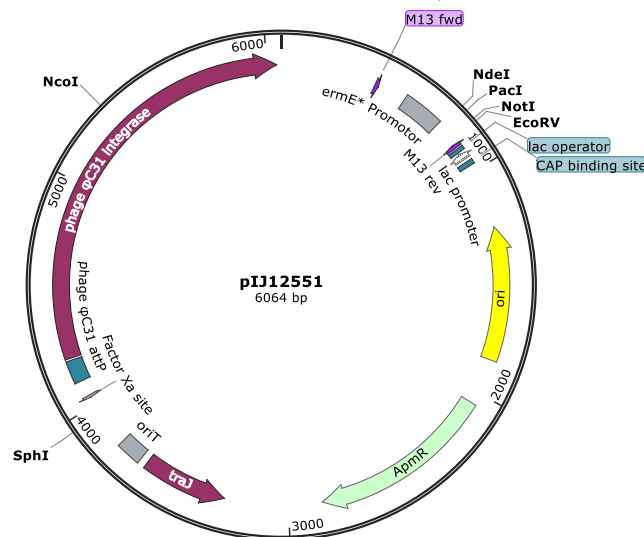
taggccgacaggctcatgccggccgccgcttttctcaatcgtcttctgctgctggaaggcagtacacctgatagtgggctgcccttctggttgcttggttc
 atcacccatccgcttccctcatctgttacccggcggtagccggccacctcgagagcaggattccggttagcaccgccagggtcgaataaggacagtgaa
 gaaacaccgctcgggggggctacttacctatctcccggctgacgcttggatacaccaaggaaagtctacacgaaccttggcaaaatctgtatctg
 cgaaaaaggatggataaccgaaaaatcgctataatgccccgaagcagggttagcagcggaaaagatccgtcgacctgaggcatgcaagctctagcattca
 gactccgaaggcgtggcgcgcttcccgtgccggagcaatgcctgggtgggttacacgacgccccctctatggcccgtactgacggacacaccgaagccccggc
 ggcaacctcagcggatccccggggctcacgtttccaggctcagaacggttttcgggagtagtcccccaactgggtaacctttagttctctcagtggggcgt
 agggctccgacatgacacaagggtgtgaccgggtggacacgtacggggtgcttacgacctcagtcgagcgcgaaaattcgagcgcagcaagcccagc
 gacacagcgtagcgaacgaagacaaggcggccgacctcagcgcgaagtgcagcgcgacggggccggtcagggtcgtcgggcatttcagcgaagcggggc
 acgtcggcgttcgggacggcgggagcggcgaggtcgaacgcatctgaacgaatgcgagcggcggtcaaatgatcattgtctagctgtcgccttctgc
 gcctgaaggctatggacgcgattccgattgtctcgaattgctcgcctgggctgacgattgtttccactcaggaaaggcttctccggcagggaacgctatggacctg
 attcacctgattatgcggctcagcgtcgcacaaagaatcttcgtaagtgcggaagattctgcacgaagaacctcagcgcgaaatgggggggtacgtcggcg
 ggaaggcgccttacggttcgagctgttctggagacgaaggagatcacgcgcaacggcgaatggtcaatgctgcatcaacaagctcgcgactcagaccatccct
 taccggaccttcgagttcagcccagcgaatccggtgggtgggtgagatcaaacgacacaaacaccttcccttaagccgggagctcaagccgacctcaccgc
 ggagcatcacgggcttgaagcgcagctgacgacctgcccagccggggcgagacgattgggaagaagaccgttcaagcgcctgggacccggcaacctg
 tatgcaatcctcgggaccgcgtattcgggcttgcgctgagggtatcaagaagaagccggacggcacgccaccgaagattgagggttaccgattca
 gcgacccgatcacgctccggcggctcagcttattcggacgcatatcagcccgtgagtggtatgagctttagcgtggtggagggcaggggcgggcga
 ggggcttccgggggcaagcattctgtccgcatggacaagctgactcagagtgggcgcgctcatgacttgaagcgcggggaagaatcgatcaaggacttacc
 cgctcgcgtcgggaagggtgcaccgtccgacctgggacgacgaagcagctgcaactcagcatggcggcactcgaagaagctggtcggaaacgcatctc
 aacaagatcaggcagccgaaggcgaagagacgttggccttctgtgggaagcccccagcgttccgcaagctcactgaggcgcctgagaagagcggcgaac
 gggcgaacctgttggagcgcggcagccctgaacccctgaagagctgacgaagcgcggcaggcgcgtacgacggacccttggcaggaagcacttc
 cggaaacacaggcagcgtgacgtccggcagcaaggggcggaaagagcggcttccgaactgaagccgcaagccccgaagcccccttgaccaatggttcc
 ccgaagcgcgacgctgaccgaccggccctaagtctgttggggggcgcgctcagtagacgacaagcgcgtgtctcgggctctctgtagacaagatggttca
 cgaagtcgactacgggagggggcagggaacccccatcgagaagcgccttcatcagctgggcaagccgaccgacgacgagaagacgacgccaggagc
 gcacggaagcgtagcggcgtagcagacacccgggaagcctg

6.2.3.1 pSETclp_{ADEP}

Das Insert *clp_{ADEP}* inklusive der natürlichen RBS wurde mit den Primern pSET-HindIII und pSET_BamHI amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *HindIII* und *BamHI* in pSET152ermE*ΔHindIII kloniert.

AAGCTTggtaaggattacagtgaaagacattaaggaactgacgggtcgcacctcggcgcacacggtggaacctgaacaccaggtaatgcatgcctcatgga
 cgagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgtatgacccggaagcaatgcgattgctcgaactgcttctgttggcaggagattcccctcgcgacatcagccttata
 caactcaccgggtgggtccgtcaccgcggaatggctatctacgacacatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcgtatggggaccgacgacctcgtatgg
 ccaattcctctgactcgggacccccaggcaagcgcacgttctgcctatcgggaatcctcatgaccagccctcgtccggctcctcgggctctccagtgcacatca
 agattcatccgagcactcattgctgtaaaaagcgcagattgacatcacggctcagcacaccggagcagctgtagggagattaagcgggattcagaccgcgaca
 ggtggttctccgctgacgaagcagtagtacggcctcggcaggggtgaaatgtagccgctaccgttctggcaatatcggggcagcgaagtagGGATCC

6.2.4 Konstrukte basierend auf pIJ12551



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

atctactgtctgcagaagtcttctgatcgaaaagtctgcagacgtctccgacctgatgacgtctcgcagggcgaaagaatctctgctttcagcttctgatgtaggagggc
gtggatatgtctctgcggttaaatagctgcccagatggttctacaagatcgttatgtgatcggcactttgcatcggccgctcccattccggaagtcttgacattgg
ggaatttatgcggtgtgaaataccgcacagatgctgaaggagaaaataccgcatcaggcgcattcgcattcaggctgcgcaactgttgggaaggcgcgatcggctgcg
ggcctcttgcctattacgcccagctggcgaaaagggggatgtctgcaaggcgttaagtgggtaacgccagggtttcccagtcacgacgttgaaaacgacggccagt
gccaagcttgggctgcaggtcactctagaggatccagcccaccgagcagcgcggccacgctggtcgtatcggaccggagtgcaggtacgcgcttgcaggt
ccaggaaggggacgtccatgcgaggtcctgtcagtgggccttgcgcccagatcgtatcgcggttgatcggcgcaggtgcagcggctcgtgacggtg
cgagaggtgccccgggaggtatgaccgacgggtccacacgtggcaccgogctgctgttgggcaacaatcgtcgggttggtaggactcgtagaacaggagcccC
ATATGagatctcagtgataaataactagatgcacctgcatagatcaagcttggatccCGGCCCGcgcatatcgaaatcgtaatcatgtcatagctttc
ctgtgtgaaatgttatccgctcaacaattccacacaacatacagccggaagcataaagtgtaaaagcctgggggtcctaagtagtgagtaactcacattaattgcttg
cgctactgccgcttccagtcgggaaacctgctgctccagctgcattaatgaatcgcccaacgcggggagaggcggttgcgtattggcgctcttccgcttctcc
ctactgactcgtgctcgctcgctcggctcggctcggcgaaggatcagctcactcaaaggcggtaatcggcttatccacagaatcaggggataacgagaaagaac
atgtgagcaaaagccagcaaaagccaggaaccgtaaaagggcgctgttggcgtttttccataggtccgccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctca
agtacagggtggcgaaaccgacagactataaaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctctgctcctcttccgacctgcccgttaccggatacctgct
cgcctttctccttccggaaagctggcgcttctctatagctcagctgtaggtatctcagttcgggttaggtcgtcgtcgaagctgggctgtgacgaacccccgctt
agcccagccgctgccttaccgtaactatctcttgagccaaccggtaagacacgactatcccaactggcagcagccactgtaacaggattagcagagcag
gtatgtagggctgtcacaggttctgaagtggtgacctaaactcggctactagaagaacagtattgtatcgcctctgctaagccagttaccttccgaaaaa
gagttggtagcttctgaccgcaaaacaccgctggttagcgggttttttggttgcaagcagcagattacgacgaaaaaaaggatcgaagaagatcctttg
atctttctacgggctgacgctcagtggaacgaaaactcagttaaaggtatgggtcatgagattcaaaaaggatcttacctagatcctttggttcatgtgcagc
tccatcagcaaaaggggatgataagttatcaccaccgactattgcaacagtccgcttctgctatgactgactgactcagcggtgagtgcaatgtcgtg
aatcgaatggcgaaaagccgagctcatcggtcagcttctcaacctggggttacccccgggctgtgctgctggtccacagctcctccgtagcctcggccccctgaa
gatgggcacttgactgatcgaggccctcgtgctgctgctgggctcgggagggacgctcgtatccctcgtggtcaggtcggacgacgagccgttctgatcctcca
cgtcggccttaccgacgcttgagttgtctctgacacattctggcgcttcccaaatgtaaacgacgacgccccatccatttgcttggcagcggggccacagga
gagcagatcatctgatccattgccctgccacctcactcgcctgcaagcccggctgcccgttccatgaactcagtagggcaggtacttctctcggcgtgggacacga
tccaacacgacgctgatcttccgagttgatggcaaggttccctatggggctcgcagacactgacatttctcaggtggcaagttggtacgctcgtatctc
agaatgaccactgctgtgagccttgcctggcgagaggtggtcgaaggaagagccttcagaaggaaggtccagtcggtcatgcttctgctgggtgatccgctcc
cgacattgtggcgacagccctgggtaactgggcccagatccgttctctcgtatccgacagggcgggatgcgaagaatcagtagccgctcggcagctgattg
gctgagctcatgagcggagaacgagatgacgttggaggggcaaggtcgcgctgattgctgggcaacacgtggagcggatcggggattgctttctcagctcgtg
gatagctgacgctcaatgcccgttggcctcggactaacgaaaaatcccatttggagggctgatccgatggcagcggcggagcggcaatggcgagcagacgctcgtc
cgggggcaatgagatagaaaagcctgaactaccgcgacgatcggggcctggccagtagctagagctgacctgcaggtccccggggatcggcttgccttctgctc
tcgggtgatgtactcaccagctccgcaagctcgtcttcttgatggagcgtatggggcagctgcttggcaatcagcgcacccccggccttttagcggtcaaaaaagt
atggcttgcctcggcgaccacgccatcatgaccttccaagctcgtccttctctctgatcttccgacagggcgaggatcgtggcatcaccgaaccgcg
gtgcgcgggctcgtcggtagccagatttcagcaggccgcccagggcgccaggtcgcattgatgcggcagctcgcgacgctgctatagccacgaccccgtg
atthgttagcctggcgacggccagcaggttagccgacagggctcatcggcgccggccgctttctcaatcgtctctgctgctggaaggcagtagaccttgata
ggtagggctccttctggttggcttggcttcatcagccatccgcttccctcactgttacgcccggtagccggcagcctcgcagacagggattcccgttgagcacc
gcccaggtgcgaataaggagcagtgaaagaagaaaccccgtcgcgggtgggctactcactatcctgcccggctgaccccgttgataccaaggaaggtcaca
cgaacccttggcaaaatcgtatctgctgcaaaaaggatggatataccgaaaaatcgtataatgaccccgaagcagggttatgacgcgaaaagatcctcga
cctgcaggtatcaagcttagcattccagacgtccgaaggcgtggcgggcttccccgctcgggagcaatgcctgggtgggttacacgacgcccctctatggc
cgtactgacggacacaccgaagccccggcggcaaccctcagcggatccccgggcttcagctttccaggtcagaagcgggttccggagtagtgccccactggg
gtaacctttagttctctcagttggggcgtagggctgcggacatgacacaaggggttggaccggggtggacacgtacggggtcttacgacctcagctcgcgag
cgcgagaatcagcgcagcaagccagcagacagcgtagcgaacgaagacaagggcgccgacctcagcgcgaagtgcagcgcgacggggcggtttagg
ttcgtcggcatttcagcgaagcgcgggacgctcggcgttcgggacggcgagcgcggcgaagtgcgaacgcatcctgaaacgaatcgcgcccgggcggtcaaatg
atcattgctatgactgtcgccttctcgcctgaaggtcatggacgacttccgattgctcggaaatgctcgcctgggctgacgattttccactcaggaaggcg
tcttcggcagggaaaagctcatggacctgattaccctgattatcggctcgcagcgtcgcacaaaagaatctcgtgaaagtcgggaaagattctcagacgcaagaacctt
cagcgcgaatggggggtagctggcgggaagggccttacggctcagctgttccggagacgaagagatcacgcgaaccggcgaatggtcaatgtcgtcctc
aaaagcttgcgactgcacccttaccggaccttcagttcagcccagcgaatccgggtggtggtgagatcaagacgcacaacaccttccctca
agccgggagcaagccgcttaccgggacatcaggggcttgaagcgtatggcggcttccgctgaggtgatcaagaagaagccggacggcacgccc
accacgaagattgagggttaccgcatcagcgcagcccgatcagcgtccggcggctgagctgattgaggacggatcagcagcccgtgagtggtatgactcagg
cgtggttggacggcagggggcgggcaaggggcttcccggggcaagcattctctccatggcaagctgactcagagtggtggcggctcagactcaagc
gcccgggaagaatcagcaaggtacttaccgctcgcgcaaggtgtgaccccctccgacctgggacacgaaggcagctgcaacgctcagatggcggca
ctcacaagtctgtgcggaacgcatctcaacaagatcaggcagccgaagggcagcaagagacgttggcgcttctgtgggaagcccccagccttccgcaagctc
actgagcgcctgagaagagcggcgaacgggcaaccttgttcggagcgcggcagcccctgaacccctgaagagctgtacgaagaccgcggcagggcgct

acgacggaccgttggcaggaagcacttccggaagcaacaggcagcgtgacgctccggcagcaaggggcccgaagagcggcttcccgaactgaagcccgaagc
cccgaagcttcccttgaccaatggttccccgaagacgccgacgctgacccgaccggcctaagtctggtgggggccccgtcagtagacgacaagcgtgttctgc
gggctcttctagacaagatcgttgcacgaagtgcactacggggcagggggcagggaaaccccatacgagaagcgcgtctgatcacgtgggcccgaagcccggaccga
cgacgacgaagacgacccccaggcagggcacggaagacgttagcggcgtagcgagacacccccggaagcctg

6.2.4.1 *pIJ12551clpP1kurz*

Das Insert *clpP1kurz* wurde mit den Primern *Nde_livClpP1_short_for* und *Not_livClpP1_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGacgaatctgatccctcagccgcgggcgacccctctatcggggcggcctccggcaccaggtctacaaccgactgctcgcgagcgatcatcttctcggc
cagccggctcgacgacatcccaacaagatcaccgcacagctgctgctccttgcctccgaccggacaaggacatcttctgtatcatcaacagcccgggcttgc
atcagccggcgcagtcgacacatcagctacatcaagaacagctggagacgacgctgacgctgctcgcggcctcctgggagcagcttctgctcagcgc
ggacccccggcaagccttccgctgccgaacggagctgctgaccacgacccctcggcggctgcccggctcggcctcggacatcaagatccacggcagcgg
ctgctgcaccaagcggcgcagtgagcctcggcagcacccggcagacgacgacgacatcaccgcgatcgaccgacggcggcgttctgacgaccttc
gaggccaaggagtagcggcctcagcagctcctgaccgcccggcgcggcgccgacggcgccctgaGCGGCCGC

6.2.4.2 *pIJ12551clpP1lang*

Das Insert *clpP1lang* wurde mit den Primern *Nde_livClpP1_long_for* und *Not_livClpP1_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGagacggccccggcggcctgtaagacgagcaggtggatagcgaatctgatccctcagccgcccggcagccctctatcggggcggcctcggcggc
aggtctacaaccgactgctcggcggcgatcatcttctcggccagcggcgacgacgacatcccaacaagatcaccgcacagctgctgctcttgcctccgacc
ggacaaggacatcttctgtatcatcaacagcccgggcttgcagcggcgcggcctcagcggcgcgacgacacatcagctacatcaagaacagcgtggtgacgatcgc
gatgggctctcggcctccatgggacagttctctcagcgggcccaccccggcaagcggcctcggcggcctcggcaacggcagatctgaccagccctcggcggc
ctggcgggttcggcctcggacatcaagatccacggcagcggcgtgctgcaccaagcggcgcagtgccggagctgacctcccagcaccggccagacgatcagga
gatcaccgcgatcgaccgacccgctgggtcagccttcgaggcaaggagtagcggcctcagcagcgtcctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcgg
cggcagggcggcctgaGCGGCCGC

6.2.4.3 *pIJ12551clpP2kurz*

Das Insert *clpP2kurz* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_short_for* und *Not_livClpP2_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGcgccgcccctccagggcgctacaccgcccagcggagctccgctacgtcatcccggccttgctgagcgcacctcgaggcggtgctgagctgac
accctgacggaagcttctcagggcgggtgatcttctcggcgtccagatcgacgacgcctcggccaacgacgtcatggcgcagctgctgctggagctgatgg
accccgaccgggacatcctggttctacatcaacagccccggcggcctcctcaccgcgctcacggccatctacacacgatcagtagcgaagcggagctccagacg
gtctgatggccaggccgctcggccggcctctgctggcggccggtagcggcggcaagcgcagtgccgctcggcaacggcctcctgatccaccagcctgac
agcgagaccggccggcgtcaggctccgactggagatcgccccaacgagatcctcgggatcgctcgcagctggaggagatctggccaagcactccaccacgccc
ggcaggaagatccggagacatcgagcggacaagatcctcagcggcggagcgcgctgagctacggcctgatcgaccagatcatcaccaccggaagatggac
aactcttctcggtagGCGGCCGC

6.2.4.4 *pIJ12551clpP2lang*

Das Insert *clpP2lang* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_long_for* und *Not_livClpP2_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGaacgacttccccggcagcggcctgtacaccgctgaacgcgcagacatgcgcccggcctccaggggcggcctacaccggcccaggcggcggcgtcc
cgctacgtcatcccgcgttctcagcgcacctcgaggcggtgctgacgaccccagtagcagacgctcctcagggagcgggtgatcttctcggcggctccagatc
acgacgctcggccaacgacgctgatggcgcagctgctgctcggagctgatggaccccagggacatctcgggtacatcaacagccccggcggcctctcaccgc
gctcacggccatctacgacacagtagcagtagcgaagcggacgtccagcggctcgtatggccaggcccctcggcccggcctcctgctggcggcgggtagcgc
ggcaagcgcagtgccgctcccgaacggcggcgtcctgatccaccagcgtacagcggagaccggcccggctcaggctcggactggagatcgccccaacgagatcc
tccggatgctcgcagctggaggatgctggccaagcactccaccagccggcggcagagatcggaggacatcgagcgcgacaagatcctcagcggcgggagga
cgcgctgagctcggcctgatcgaccagatcatcaccaccggaagatggacaactcctcctcggtagGCGGCCGC

6.2.4.5 *pIJ12551clpP1clpP2*

Das Insert *clpP1clpP2* wurde mit den Primern *Nde_livClpP1_long_for* und *Not_livClpP2_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGagacggccccggccgctgtaagacgagcaggtggatactgacgaatctgatccctcagcccgccggcagccctctatcggggcgcctcggcgacc aggtctacaaccgactgctcggcgagcgatcatcttctcggcagccggctcagcagcagacatcgcaacaagatcaccgcacagctgctccttgcctcggacc ggacaaggacatcttctgtacatcaacagccccggcggttcgatcagccggcgatggcgatctacgacacatgacagatcaagaacgacgtggtagcgc gatgggtctcggccctcattgggacagttcctgctcagcgcgggacccccggcaagcgttcgctgcccgaacccgagatcctgatccaccagccctcggcgcc ctggccggttcggcctcggacatcaagatccacgccgagcggtgctgacaccaagcggcgatggccgagctgacctcccagcaccggccagacatcgagca gatcaccgcgattcggaccgacccgctggttcgacccctcaggccaaaggagtagccctcagcagcgtatcgccacggccgcccgatccggcgccggcgg cgccacggcgctgagccatcctcccccagcggaccgctcagcccttacaggagacactgtgaacgactccccggcagcggcctgtacgaccgctgaac gcccacaggacatgcgccgctcccaggccgctacaccggcccagccgagtagcctcagctacatcccgccttcgtagcgcacctcagggcgctgccc gtagtagcaccgtagcgaagctcttcgaggagcgggtatcttctcggcgtccagatcgacgacccctcggccaacgacgtatggcgagctgctgctcctggagt cgatggaccccgaccgggacatctcgtctacatcaacagccccggcgctcctcaccgctcagccatctacgacacagtagcagtagcgaagccggagctcc agacggtctgatggccaggccgctcccggccgctcctgctggccgctgacggcgcaagcgtggcgtcggcaaccccgctcctgatccaccagc cgtacagcagaccggccgctcaggtctccgacctggagatcgccccaacagagatcctcggatcgctcgcagctggaggagatgctggccaagcactccacc acgcccgtcgagaagatccgagggacatcgagcgcgacaagatcctcagccggaggacgctgagctacggcctgatcaccagatcaccaccgggaaga tggacaactcctcctcggctagGCGGCCGC

6.2.4.6 *pIJ12551clp_{ADEP}*

Das Insert *clp_{ADEP}* wurde mit den Primern *Nde_{-clpPA_{-for}}* und *Not_{-clpPA_{-rev}}* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGaaggacattaaggaactgacgggtcgaccctcggcgatcaggtggaacctgaacgaccaggtaatgcatcgcctcatggagagcgtattattatgct gggcaagaggtcgatgacccggaagcaatgagattgctcgaactgcttctgttggcaggagattcccctcgcgacatcagccttataactcaccgggtgggt ccgctaccgcccgaatggctatctacgacacatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcagtaggggaccgagcctcagtagggccaattcctcctgactgc gggcaccacaggcaagcgcacgttctgctcctcagcgaatcctcagcaccagccctcggcgtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatgccgagcga ctcatctgtcaaaaagcgcagtagtagacatcagggctcagcaccggagcagctgtagggagattaagcgggattcagaccgagcaggtggttctcggctgacg aagcagtagtagcggcctcggcagcaggggttaatatgtagccgctaccgttctggcaatatcggggcagcgaagtagGCGGCCGC

6.2.4.7 *pIJ12551clp_{ADEP}kurz*

Das Insert *clp_{ADEP}kurz* wurde mit den Primern *Nde_{-clpPA_{-short_{-for}}}* und *Not_{-clpPA_{-rev}}* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGcattcgcctcatggagcagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgatgacccggaagcaatgagattgctcgaactgcttctgttggcaggagattccc ctcgcgacatcagccttataactcaccgggtgggtccgtcaccgcccgaatggctatctacgacacatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcagat ggggaccgagcctcagtagggccaattcctcctgactcggcgaccacccagcgaagcgcacgttctcctcagcgaatcctcagcaccagccctcggcgtctc ggcgctctgccagtacatcaagattcatgccgagcactcattcgtgcaaaaagcgcagtagtagacatcagggctcagcaccggagcagctgtagggagatta agcgggattcagaccgagcaggtggttctcggctgacgaagcagtagtagcggcctcggcagcaggggttaatatgtagccgctaccgttctggcaatatcggggc agcgaagtagGCGGCCGC

6.2.4.8 *pIJ12551clp_{ADEP}-His*

Das Insert *clp_{ADEP}-His* wurde mit den Primern *Nde_{-clpPA_{-for}}* und *Not_{-clpPA_{-His_{-rev}}}* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGaaggacattaaggaactgacgggtcgaccctcggcgatcaggtggaacctgaacgaccaggtaatgcatcgcctcatggagcagcgtattattatgct gggcaagaggtcgatgacccggaagcaatgagattgctcgaactgcttctgttggcaggagattcccctcgcgacatcagccttataactcaccgggtgggt ccgctaccgcccgaatggctatctacgacacatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcagtaggggaccgagcctcagtagggccaattcctcctgactgc gggcaccacaggcaagcgcacgttctgctcctcagcgaatcctcagcaccagccctcggcgtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatgccgagcga ctatctgtcaaaaagcgcagtagtagacatcagggctcagcaccggagcagctgtagggagattaagcgggattcagaccgagcaggtggttctcggctgacg aagcagtagtagcggcctcggcagcaggggttaatatgtagccgctaccgttctggcaatatcggggcagcgaagcatcatcatcatcattagGCGGCCGC

6.2.4.9 *pIJ12551His-clp_{ADEP}*

Das Insert *His-clp_{ADEP}* wurde mit den Primern *Nde_{-His-clpPA_{-for}}* und *Not_{-clpPA_{-rev}}* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGcattcgcctcatggagcagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgatgacccggaagcaatgagattgctcgaactgcttctgttggcaggagattcccctcgcgacatcagccttata ctcaactcaccgggtgggtccgtcaccgcccgaatggctatctacgacacatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcagtaggggaccgagcctcagtagggccaattcctcctgactgc gggcaccacaggcaagcgcacgttctgctcctcagcgaatcctcagcaccagccctcggcgtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatgccgagcga ctatctgtcaaaaagcgcagtagtagacatcagggctcagcaccggagcagctgtagggagattaagcgggattcagaccgagcaggtggttctcggctgacg aagcagtagtagcggcctcggcagcaggggttaatatgtagccgctaccgttctggcaatatcggggcagcgaagcatcatcatcatcattagGCGGCCGC

agattcatccgagcgactcattcgtgtcaaaaagcgcatgattgacatcacggctcagcacaccggacggactgtcaggagattaagcgggattcagaccgcgaca
 ggtgttctcctgacgaagcagtcgagtacggcctcggcagcagggtgaatatgtagccctaccgttctggcaatatcggggcagcgaagtagGCGGCCGC

6.2.4.10 pIJ12251ShclpP1Hyp

Das Insert *ShclpP1Hyp* wurde mit den Primern *Nde_livClpP1_short_for* und *Not_livClpP1_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

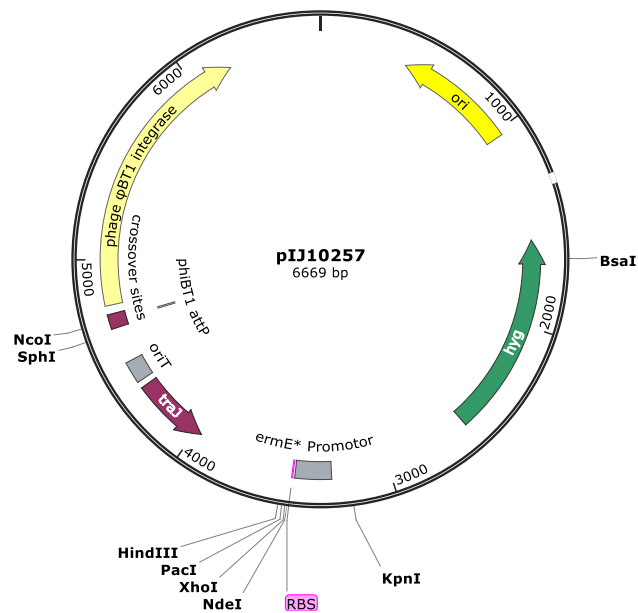
CATATGacgaatctgatccctcagccgcccggcgcgaccttccatcgggtgggtgctcgggtgaccaggctcacaaccggctgtcaacgagcgggatcatcttctcggc
 cagccggctgcagcagacatcgcgaacaagatcaccgcacagttgctccttgcctccgaccggagaaggacatctcctggatcaacagccccggcggttcg
 atcagcggcggcatggcgatctacgacacatcaggtcatcaagaacgacgtgggtgaccatcgccatggcctggcagcctcgatggccagttcctgctcagcgcg
 ggacccccggcaagcgttcgctgcccgaacgccgagattctgatccatcagccctccggcctcggcctcggcctcggacatcaagatccacgccgagcgg
 ctgctcacaccaagaagcgcattggccgagctgacctccagcacaccggccagacgatcagcagatcaccgcgactcggaccgcgaccgctggttcgacgcctt
 cgaggccaaggagtacggcctcatcagcagcgtgatgacgacggccgctgatccggggcggcggcggcagggcgctgaGCGGCCGC

6.2.4.11 pIJ12551ShclpP1Cat

Das Insert *ShclpP1Hyp* wurde mit den Primern *Nde_livClpP1_short_for* und *Not_livClpP1_rev* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in pIJ12551 kloniert.

CATATGacgaatctgatccctcagccgcccggcgcgaccttccatcgggtgggtgctcgggtgaccaggctcacaaccggctgtcaacgagcgggatcatcttctcggc
 cagccggctgcagcagacatcgcgaacaagatcaccgcacagttgctccttgcctccgaccggagaaggacatctcctgtacatcaacagccccggcggttcg
 atcagcggcggcatggcgatctacgacacatcaggtatcaagaacgacgtgggtgaccatcgccatggcctggcagcctcgatggccagttcctgctcagcgcg
 ggacccccggcaagcgttcgctgcccgaacgccgagattctgatccatcagccctccggcctcggcctcggcctcggacatcaagatccacgccgagcgg
 ctgctcacaccaagaagcgcattggccgagctgacctccagcacaccggccagacgatcagcagatcaccgcgactcggaccgcgaccgctggttcgacgcctt
 cgaggccaaggagtacggcctcatcagcagcgtgatgacgacggccgctgatccggggcggcggcggcagggcgctgaGCGGCCGC

6.2.5 Konstrukte basierend auf pIJ10257



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

gatccgcccggcgcgagatcgaattcgaatcatgtcatagctgttctcgtgtgaaattgtatccgctcacaattccacacaacatacagccggaagcataaagt
 gtaaagcctggggcctaatgagtgagtaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcgggaaacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggcc
 aacgcgcccgggagaggcgtttgctattggcgccttccgcttctcgtcactgactcgtcgcctcgttccgctcggcgcgagcggatcagctcactcaaa
 gcgtaataacggttatccacagaatcaggggataacgcaggaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaacctgaaaaggccgcttgcggcgt
 tttccataggctcccccctgacgagcatcaaaaaatcagcgtcaagtgcagagtgaggcgaaccgacaggaactataaagataaccaggcgtttcccctggaa
 gctccctcgtgcgctcctgttccgacctcggcctaccggatactgtccgcttttcccttcgggaagcgtggcgtttctcatagctcacgctgtaggtatctcagtt
 cgggtgagctgcttcccaagctggcgtgtgcacgaacccccgtcagcccaccgctgccttatccggttaactatgcttgcagtaaccggtaagacac
 gacttatccgactggcagcagcactggttaacaggattagcagagcaggtatgtagcgggtgctacagagttcttgaagtggcctaactacggctacactagaa

gaacagtatttgatctgcgctctgctgaagccagtaccctcggaagagtggtagctctgatccgcaacaaaccaccgtagcggtggtttttttgttgc
caagcagcagattacgagcagaaaaaaggatctcaagaagatccttggatctttctacgggctgacgctcagtggaacgaaactcacgttaaggattttgttc
atgagattatcaaaaaggatctcacctagatcctttgggtcatgtgcagctccatcagaaaaaggggatgataagttatcaccaccgactattgcaacagtgccgtt
gatcgtgctgatcagctgatgatcagcggaggagtgcaatgtcgtgcaatacgaatggcgaaaagccgagaacnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnccggggtccgagctgggatggaagctcgccgaccaccctggaggagatgatcaggagatccaggggcctttcaccccgcgc
tgctgagcgtccgccccggggcccaccgctcgccggcccctcggggctcgcagcagcgggcttcggcgggcccggggctcccagcggggcggggctc
cgggcggcccggggggccggggcgcgccggggggccggggggctcagggcggggggggcgggttcggcgggcccagaggaaactcgccaagtctccggatc
ggggaagccggagagatccagcgggggtctcctgaacacctcgaagctgtcaggaagggaaggcgagcagttcggggcgaagtctcggtccggtccactgcgc
cccgtcagcagcgccggcaggatctcgggctcggcgggaaggcgttagatgcaagttgaccagggctgttagcggagctcccgcatagactcggtgaaagtcag
gatcccgggtgacctcggtcggccaggtccacgaagatgttggtcccgtgagctcgccgtggaggaaccgggggttcggcgggccagcagcgtgtccacgtccgg
cagccagttcctcagggggtccagcagccggggcgagaggtagccccaccccggtggtctcagcaggtcggcgggcgttccgcagcagttccgggaagacct
cggaatggggggtgagcacggtgttccgggtcagggcaccctgtgacggcgagcaccggcgagttccggggcaggggcagcagcgttccggctggct
gtccgtccatcgccgaccgaggtgggtccggtcatccgggtcatcaccaggtaggggccaccggcaggctccgggtcggggcgagctcggcgggcagggag
gccccggcaccggcaccggggcgtccgaccggaccggtacgtccgactccgacggaggtctcgggaccgaccaggtgctcggcaacagcttgatcaccgggt
cgggctcgccgaccaggtaccggggtgggtctcggggcaccggcagcaccggcgaccggcagcccagctccagggtcggggggccagcggctccag
aattcctggtcgtccgaggtcgttaggaatcaccgaataacaggtcagagaagtaacagggtatcttgtgtcagcggaccttattcacagggtaccggggcgc
gcttaattccgacggcgggtcgcgacacggcctgtcgcaccgggtcagggcgttagcagatgacgggctggtcggccacgtcggggacgttctcggtggtgctgcggt
cgggatcgcgaatctacggggcggaccgagggcgaggtgtacgcccggcctggtctgagggcggagggcgcggtcccaggccccgagatcccgtcccccggt
cgtcagcggcggtgcccagcagaccggcggtgctcgtcagggggcgtccccggcgtcgcnccggcgaggagtgggcccagcaccagcgttccggtggtcg
aggcagatggcgaggtggcccgcctccagcagctcgggtgggaggtgccccctcagaccggcgtcagcggcggtcggcagggccccggcggaaagtcgcc
gagggcctggtggacctcagcagaccgatgtgtgctcagatcaccggcaggtgtttatgtcaaacccgagagataatttaccgagatggttacctgcctc
tgacctcagccgctcagcctgaggtgaaaacgctcactgggtaccagcccaccgagcagcgccggcagcctgggtgagtgccgaccgaggttcaggttacg
cggttcgaggtccaggaagggagcgtccatgaggtgtcgttccgagtgggcgttcgcccagtgatgtagcggttgatcgcgatcagcaggtcacggggtgag
cttgagcgttcggagaggtgccccgggaggatctgaccgacgggtccacacgtggcaccggatgctggtggggcacaatcgtccggttggtaggatcgttagaa
caggaggcccCATATGagatctcaggtattaattaactagagctcgtcatAAGCTTggatcccctagggttctcagcagcggagaaacagatgactggaggg
gcaaggtcgcgctgattgctggggcaacacgtggagcggatcggggattgtcttctcagctcgtgatgatgctgacgctcaatgccgttggcctccgactaaacg
aaatcccgcattggagcgtgatccgattggcacggcggcagcgaaatggcgagcagcagctcgtccggggcaatgagatgaaaagcctgaactaccgagc
acgtatcggggcctggccagctagtagtgacctcaggtccccggggatcggtctgcttgcctgctcgtcggtgagtagtactcaccagctccgcaagtcgcttctt
gatggagcagatggggagcgttggcaatcagcgcacccccggcgttttagcggctaaaaaagtcaggtctcctccggggcggaccacgcccacatgacctt
gccaagctcgtctcttctcagatcttccagcagggcggaggtatggtcagacccgcccgtcggcggtgctgggtgagccagagttcagcagggccg
cccagggcggcccaggtcgcattgatcggggcagctcgggagcgtcagatgccagcagcccgtgattttgagcctggccgagccagcaggtagggcggac
aggctcatcggggcccgcctttcctcaatcgtcttctgtctggaagggcagtcacacctgagtagggggctgccttccggttgggtggtttcatcagccat
ccgcttccctcatctgttaccccgggtagccggcagcctcgcagagcaggattcccgttagcaccgcccaggtgcgaataagggacagtgaaagaaggaaaccc
gctcggggtgggctacttcacatcctcggcggtgacggctggatcaccaaggaaagtcacacgaacccttggcaaaatcctgtatcgtcgaaaaag
gatggatataccgaaaaatgctataatgaccccgaagcaggggtatgacgagcgaagagatccgctcagcaggtgctggcgccggcaggggcttcagagctt
tcgggtgctgggttgtgtctgagcaggtgatccatgggaaactactcagcaccacaatggtcccaaaagaaagcgaggtagcagccatgagccaagatctaggc
atgtcgccttcatcgtcccagcgtccctgagcacctttagacactgttcgcgttcttctgacgcgctcagtcgaaggccggctccgagcgtcagagctgacg
gaagcacagtagcggccggctgctgctgtgctcgcgaacggccaggggggctgcgctggtgctggcaggtgagttcgtggagcgtcggcgctccggctgg
gaccgaaagtgaccctgcccactcagcagcagatgagggcgaagtcggcgccggcgaaggtgacgttgcgttgatgagcttcccggctcactcgaagggcg
ccatgagcgcctgaaatcgaacaagaattgaagaagcagggcgtgctctcagcttctgagcgttctttagacagcgtcaccctatcgccgtcgcattttcg
cgctgagctgccccttgcgaacagggagcagcctgaaaggcggagcgtgaaagggtgcaaaagcagagattcccgctgggtggcgttactcgtctccgcc
cgttggaaagtcgcccgtgcgaagaaggtcgaatactcgtgatcctgctttagcgggagcaagacaaccgggatcacgtcagcagtagtgagcagtaggca
aatgctgttgaagggcgttcgacaacccattgcaacgacctcagaaggaaagatcccgtcgggaatggctgagagacgcgccaggaagcgtcttg
cgtccatcaaggcagctgcctgaaagggcgtgaaaagccgatcatgtggcgctcaaacgggtccgatgattctcaacctcccgaatcgggggttccgattcga
gcgtggaagcagcgaagggcagacatcaactcagcagcagcccggcggaagccgctaacccccacaggcattctcagggcctcgaagtggtgagc
ttcaagagaagcgttcggggaagaatctcagcagcaggaagcctggggcgaagtcgaaccgagcgttctgagcgggtggcgttccctgggggtccgaatctcggcg
gctcaatgggtcagtcagggtggcgtaagcgaacggcgaccttgcgaaggcaattacatgtcgccaaccgaaagggcagcggcgcttgcgtgcaagcgc
agcgaactggagcaattcgttctgaagggtggggcacggctcccagcagcagatggaagatgaacagatcagcagtgagattcccccgtcgggagcgttc
gcccttcagcagcagctagcgggggtggcagtgagcggcgcaaacagggcagcactagacaactgccccgtcctcaatcaggacctcagcgggaccgtaag
ccggtgtgactcggcgtgaaagcgtggaaacgtggcgctcaacgggtgctcaatcaccggtcctcgaagcggaggtcagcagcgtcgggaggttc
ctgagcttctcctgactccgtcatggtgcaccggggggccaccctgagagcaagaaatacctcccctgaaggaccgtgtagcgtcaagtgggcgagctgtag
aggaggaagcgaagcagcgaagccactgagcgggagcttcggcgctgtagcgcacaggggaggggctgagcggcgaggttcggcccctttttggccttg
aaatcgttagttaggctACTAGTAgttccttctcaccatagcgggagggagc

6.2.5.1 *pIJ10257clpP2kurz*

Das Insert *clpP2kurz* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_short_for* und *liv-clpP2_rev_Hind* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in *pIJ10257* kloniert.

CATATGcgccgctcccagggccgctacaccggcccagggccgagtcctcctacgtcatcccgccttcgtcgagcgacctcgagggcgtgcgagtagc acccgtacgcaagctcttcgaggagcgggtgatcttctcggcgtccagatcgacgacgctcgccaacgacgtatggcgagctgtgtgctggagtcgatgga ccccgaccgggacatctcggctacatcaacagccccggcgctccttcaccgctcacggccatctacgacacgatgacgtacgtgaagccggacgtccagacggt ctgcatggggccagggccgctccgcccggcctcgtcgtggccggtacggggcaagcgatggcgctccgaacccccgctcctgatccaccagccgtacag cgagaccggccggcaggtctccgacctggagatcgccccaacgagatcctccggatgctcgcagctggaggagatgctggccaagcactccaccacgcccgg tcgagaagatccgagggacatcgagcgcgacaagatcctcacggccgaggacgctgagctacggcctgatcgaccagatcatcaccaccgggaagatggacaa ctctctctccgctagAAGCTT

6.2.5.2 *pIJ10257clpP2kurz-His*

Das Insert *clpP2kurz-His* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_short_for* und *liv-clpP2-His_rev_Hind* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in *pIJ10257* kloniert.

CATATGcgccgctcccagggccgctacaccggcccagggccgagtcctcctacgtcatcccgccttcgtcgagcgacctcgagggcgtgcgagtagc acccgtacgcaagctcttcgaggagcgggtgatcttctcggcgtccagatcgacgacgctcgccaacgacgtatggcgagctgtgtgctggagtcgatgga ccccgaccgggacatctcggctacatcaacagccccggcgctccttcaccgctcacggccatctacgacacgatgacgtacgtgaagccggacgtccagacggt ctgcatggggccagggccgctccgcccggcctcgtcgtggccggtacccgggcaagcgatggcgctccgaacccccgctcctgatccaccagccgtacag cgagaccggccggcaggtctccgacctggagatcgccccaacgagatcctccggatgctcgcagctggaggagatgctggccaagcactccaccacgcccgg tcgagaagatccgagggacatcgagcgcgacaagatcctcacggccgaggacgctgagctacggcctgatcgaccagatcatcaccaccgggaagatggacaa ctctctctccgcatcatcatcatcattagAAGCTT

6.2.5.3 *pIJ10257clpP2lang*

Das Insert *clpP2lang* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_long_for* und *liv-clpP2_rev_Hind* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in *pIJ10257* kloniert.

CATATGaacgacttccccggcagcggcctgtacaccgctgaaccgcccagggacatcgccgcccctcccagggccgctacaccggcccagggccgagtc ccgctacgtcatcccgccttcgtcgagcgacctcgagggcgtgcgagtagcaccgctacggaagctcttcgaggagcgggtgatcttctcggcgtccagatcg acgacgctcggccaacgacgtatggcgagctgtgtcctggagtcgatggaccccgaccgggacatctcggctacatcaacagccccggcgctccttcaccg cgtcacggccatctacgacacgatgacgtacgtgaagccggacgtccagacggtctgcatggggccagggccctccgcccggcctcctgctggtggccgggtacgcc gggcaagcgatggcgtcccgaacccccgctcctgatccaccagcgtacagcgagaccggccggcaggtcaggtctccgacctggagatgccccaacgagatcc tccggatgctcgcagctggaggagatgctggccaagcactccaccacgggctgagaagatccgagggacatcgagcgcgacaagatcctcacggccgagga cgcgctgagctacggcctgatcgaccagatcatcaccaccgggaagatggacaactcctctctccgctagAAGCTT

6.2.5.4 *pIJ10257clpP2lang-His*

Das Insert *clpP2lang-His* wurde mit den Primern *Nde_livClpP2_long_for* und *liv-clpP2-His_rev_Hind* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in *pIJ10257* kloniert.

CATATGaacgacttccccggcagcggcctgtacaccgctgaaccgcccagggacatcgccgcccctcccagggccgctacaccggcccagggccgagtc ccgctacgtcatcccgccttcgtcgagcgacctcgagggcgtgcgagtagcaccgctacggaagctcttcgaggagcgggtgatcttctcggcgtccagatcg acgacgctcggccaacgacgtatggcgagctgtgtcctggagtcgatggaccccgaccgggacatctcggctacatcaacagccccggcgctccttcaccg cgtcacggccatctacgacacgatgacgtacgtgaagccggacgtccagacggtctgcatggggccagggccctccgcccggcctcctgctggtggccgggtacgcc gggcaagcgatggcgtcccgaacccccgctcctgatccaccagcgtacagcgagaccggccggcaggtcaggtctccgacctggagatgccccaacgagatcc tccggatgctcgcagctggaggagatgctggccaagcactccaccacgggctgagaagatccgagggacatcgagcgcgacaagatcctcacggccgagga cgcgctgagctacggcctgatcgaccagatcatcaccaccgggaagatggacaactcctctctccgctagAAGCTT

6.2.5.5 *pIJ10257clpP_{ADEP}*

Das Insert *clpP_{ADEP}* wurde mit den Primern *Nde_clpP_A_for* und *pGM-HindIII* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in *pIJ10257* kloniert.

CATATGaaggacattaaggaactgacgggtcgaccctcgccatcacgggtggaacctgaacgaccaggtaatgcatcgctcatggacgagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgatgacccggaagcaatgcgatttctcgcaactgcttctgttggcaggagattcccctcgacatcagcctttatatcaactaccgggtgggtccgctaccgcggaatggctatctacgacacccatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcgatggggaccgagcctcgatgggcaattcctcctgactcgggacccccaggcaagcgatcgttctgctcatcggaatcctcatgaccagccctcgccggtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatccgagcgactcattctgtcaaaaagcgatgattgacatcaggctcagcacaccggagcactgtcaggagattaagcgggattcagaccgacaggtggttctccgctgacgaagcagtcgagtagcggcctcgccgacaggttgaatatgtagccgctaccgttctggaatcggggcagcgaagtagAAGCTT

6.2.5.6 *pIJ10257clpP_{ADEP}-His*

Das Insert *clpP_{ADEP}-His* wurde mit den Primern *Nde_clpPA_for* und *clpPADEP-His_rev_Hind* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in pIJ10257 kloniert.

CATATGaaggacattaaggaactgacgggtcgaccctcgccatcacgggtggaacctgaacgaccaggtaatgcatcgctcatggacgagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgatgacccggaagcaatgcgatttctcgcaactgcttctgttggcaggagattcccctcgacatcagcctttatatcaactaccgggtgggtccgctaccgcggaatggctatctacgacacccatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcgatggggaccgagcctcgatgggcaattcctcctgactcgggacccccaggcaagcgatcgttctgctcatcggaatcctcatgaccagccctcgccggtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatccgagcgactcattctgtcaaaaagcgatgattgacatcaggctcagcacaccggagcactgtcaggagattaagcgggattcagaccgacaggtggttctccgctgacgaagcagtcgagtagcggcctcgccgacaggttgaatatgtagccgctaccgttctggaatcggggcagcgaagcatcatcatcatcattagAAGCTT

6.2.5.7 *pIJ10257His-clpP_{ADEP}*

Das Insert *His-clpP_{ADEP}* wurde mit den Primern *Nde_His-clpPA_for* und *pGM-HindIII* amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *HindIII* in pIJ10257 kloniert.

CATATGcatcatcatcatcatcataaggacattaaggaactgacgggtcgaccctcgccatcacgggtggaacctgaacgaccaggtaatgcatcgctcatggaagcagcgtattattatgctgggtcaagaggtcgatgacccggaagcaatgcgatttctcgcaactgcttctgttggcaggagattcccctcgacatcagcctttatatcaactaccgggtgggtccgctaccgcggaatggctatctacgacacccatgaactacatcgagaacgatgtagtcacagtagcgatggggaccgagcctcgatgggccaattcctcctgactcgggacccccaggcaagcgatcgttctgctcatcggaatcctcatgaccagccctcgccggtctcggcggtctgccagtacatcaagattcatccgagcgactcattctgtcaaaaagcgatgattgacatcaggctcagcacaccggagcactgtcaggagattaagcgggattcagaccgacaggtggttctccgctgacgaagcagtcgagtagcggcctcgccgacaggttgaatatgtagccgctaccgttctggcaatcggggcagcgaagtagAAGCTT

6.2.5.8 *pIJtsr*

Das Insert *tsr* wurde mit den Primern *pIJtsr_Spe_for* und *pIJtsr_Spe_rev* amplifiziert, wobei pIJ6902 als Template diente, und über die Restriktionsschnittstelle *SpeI* in pIJ10257 kloniert.

ACTAGTcggggatcgaccgcggggtcccggacggggaagagcggggagcttggcagagagcagcagactccccttgcgttggtgattgcccgtcaggcgagccatccccaatcgctgtaggtgtcacacccaggaatcgctgactgaacacagcagccggttaggacgacccatgactgagttggacaccatcgcaaatccgtccgatccgcggtgacgggatcatcgatgtcacaagccgtcgcatccaataaagacaacgttgatcaggagcgtcgagccctcatgacagcatcgccggccgggtgagttcatcgaggtctacggcagcagcagcagtccttttccatctgagttgctggtatgtgctgggaggcagaacataccggtccgctcatgactcctcgtatgcaaccagttgttcaaggggagcggaaaggcaagacattcggcatcgccgctccctcgccggcaggttcggcagatcgcgagccggcgtggggagcgtcgtcttctgacgggtgaaagatcgtcgggaacatcgccgcatagtagcacgctgctcgctcgagcgtcgggagatcatcctgtgacagtgatcaccagatcgccgaccggcgtctcaaaagggccagccaggttacgttcttcccttcccgtcttctcggctcgagggagccatcgcttattcgggacagcggatgacagctgatgacgctcaagggcgatggcgacatttccgtgaaggaactcgggacaatccggatcggtcgttctgcttccggcagcgaaggggtggccttccgacctgttcgaggagcgcttcccctcggtttccatcccatgatgagccagaccaggtcttcaacgtttccgttccctggatcgctgacgagaggatcgacaggaatcctcggccaccgataaACTAGT

6.2.5.9 *pIJtsr_si-adeA*

Das Insert *si-adeA* wurde mit den Primern *siNRPS_fdterm Fwd* und *siNRPS_fdterm Rev* inklusive der sich wiederholenden Enden (unterstrichen) und des *tipA*-Promotors (fett) amplifiziert, wobei pIJ6902PROL als Template diente.

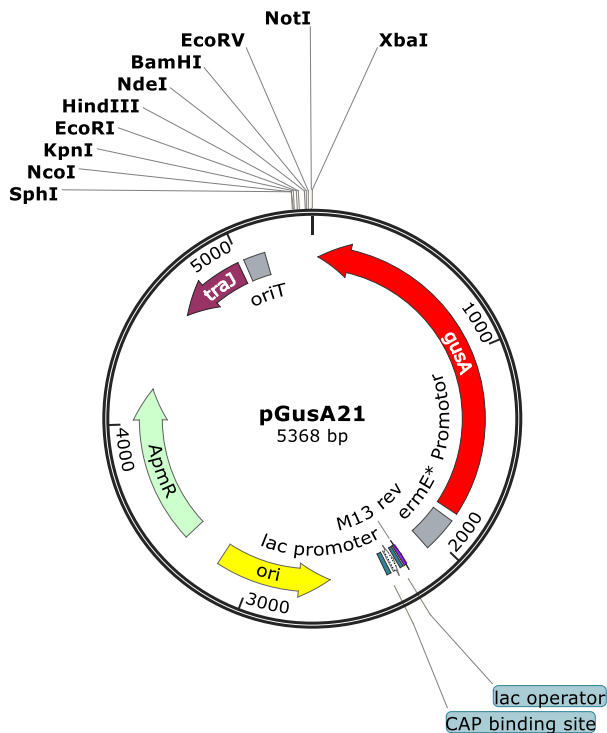
GTCATTACTGGAC**CCGGATCGGGGATCTGGGCTGAGGGAGCCGACGGCACGCGGGCTCACGGCGTGGCACGCGGAACGTCCGGCTTGCACCTCACGTACGTGAGGAGGCA**GCGTGGACGGCGTCAGAGAAGGGAGCGGACATATGcagtgggtgggtgggtgggtggcatgcatctcggcaggagaaaagggccccgggacgaggacgaaccatcgcggtcactatgaccagcagccttttggcagctgacgcaatccccctaaatgggaaaatcgaataactgcactgcaggcaccaccaccaccactgCATATGAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTTCCAGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTTCCAGACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAATTTCAACAGTTTCAGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAATAAAGGAATTGCGAATAATAATTTTTTTCAGTTGAAAATCTCCAAA
AAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTAATTGTATCGGTTTATCAGC

6.2.5.10 *pIJtsr_si-adeG*

Das Insert *si-adeG* wurde mit den Primern *siNRPS_fdterm Fwd* und *siNRPS_fdterm Rev* inklusive der sich wiederholenden Enden (unterstrichen) und des *tipA*-Promotors (fett) amplifiziert, wobei pIJ6902NRPS als Template diente.

```
GTCATTACTGGACCGGATCGGGGATCTGGGCTGAGGGAGCCGACGGCACGCGGGGCTCACGGCGTGGCACGCGGAACGTCCG
GGCTTGACCTCACGTACGTGAGGAGGCAGCGTGGACGGCGTCAGAGAAGGGAGCGGACATATGcagtggtggtggtggtggtggtggc
atgccacacttcgctgtagccgaggacaatggcaggacaattccgcgccgactggacaacgtaatgctcccgtcttcacgattttgaaccagctgttgagaag
cgagacagcgattcagatggtctgtagccaccaccaccaccactgCATATGAAGCTTGCATGCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCCG
GGTACCGAGCTCGAATTCCCCAGATCTAAAGTTTTGTCGTCTTCCAGACGTTAGTAAATGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGCTAA
ACAACTTTCAACAGTTTCAGCGGAGTGAGAATAGAAAGGAACAACTAAAGGAATTGCGAATAATAATTTTTTACGTTGAAAATC
TCCAAAAAAAAGGCTCCAAAAGGAGCCTTTAATTGTATCGGTTTATCAGCT
```

6.2.6 Konstrukte basierend auf pGusA21



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

```
actagggataacagggtaatgcttactcactgcttcccgcctgctgcggttctccccgaagttcatcccgtccaccgcttctggagcaggaaacccgcccacttgggct
tgcggtcccgggtgaagatgcccttctgttggccccgacgcggaaggatgcccctgggaggtggcgaagtggcgaagttccacactgctgccgacgaccgctgac
gcggtcgaacacgcggtggtacatgtccagccacgcgactggtactcttcgaccacatgtcgggtgacatggagtgcagaccggccagcgtgtccacgctgactcg
gtgatgatcgctggtgagcttctcctgccacgccagcagctcttctccaggaccttccggcgttccagggtcccggactgcacgtaccagccgtagtagcgg
ttcaggcacaggacgtcgaagaggtcggagatggtgtccgtgtggcgctgcagaacatcacgttcacgcaggtgatgggcccgggtggggtcgagcttccgggtggcc
tcggccagcggggcgaagtactcccggcaccctgcggccgggtgtccggctcgttggcgatgaccacatcacgcagcaggggtggttcttctgctgggctgatgac
tcttgatcgctgaggtgggctgctgggttccgcttgacggcctcttcggagtagacttctcggcttgttccggcctcgaagccgatgccgaggacaggtg
aagcccaccgcccgttctgctgatgacgacgatcccgtgctgctcccagctccagcatcttccgctacgggtagtgaggttccggttacggttggcggat
ccagttcatcaggcgctggtgctggaccatcaggacgttgcgaagcccttccgcccggaggtcggcgtcctcgtgccaccgaagcccgtgaagtagaacgcttgtgg
ttgatcaggaaactgctgcccttgaccgccagggaccgatccgacgcgcaggggtagatgctgcactcggctggtcttccgctcagccacagcgtctacaggt
agccctcaccggctgccagaggtgggggttcacgacctggagggtccccagggtccctgcccggctgccacgacctgctgctcggcgtcgcggagctccacgtca
cgtcgcggttggcgacacctgccagtcacggacgcgtggttcagctcctggccacgtgggtgaccaccgtgatgctgcgaccaggttctcggcgtcgtgtacag
catgaccgagcgtggtgacggcgtagttgaagaagctggaagtagctcgttcttctcggcttctcgtcctgatccatccgggcccggatggtctgcccagtt
gagctcgttctgacgcagacctgatgcccggaccacttcccggcgatgacgtacggggtcacgtccgctcgaagggcgtgtagcccccctggtgctccatcacttct
ggttgtgaccagaccttccgtagtgggtcaccgctcgaagcgcagcacgatgcgctgaccggcccagcccttggggatgaacacctcccgtgataccagacgtt
```

ccccgctagttgaggatgcccgcgactccggaactggtcgttgaagctgccccgggacggcgatggcgcgactcctggaggcgctctcccaccaccgctggtcgata
ccgcagttctccggctgaggctgaacccccacagccgctccagcttcttgatctcgggctggggttcgacgggcccagcagatgctccgtacccgttctcacta
gcttatcgataccgctgatcctaccaaccggcacgattgtcccacaacagcatcgcggtgccacgtgtggaccgctcgggtcagatcctcccgcacctctcggcagc
gtcaagatcgaccgctgcacctgcatcggatcaaccgactagcatcggcgcaagccgactcgaacggacactcgcagtgacgtcccttctggacctg
caagccgctacctcgaactccggtccgacatcgaccaggcgtgccccgctgctcgggctgggctggacctcagggggggcccggtacaattcgtaatcatgtcat
agctgttctgtgaaattgttatccgctcacaattccacacaacatacagcgggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgctaatgagtgagtaactcacatta
attcggttgcgctcactgcccgttccagtcgggaaacctgctgctccagctgattaatgaatcgccaacgcgccccgggagagcggttgcgtattgggctccttcc
gcttctcgtcactgactcgtcgcctcggctgctcggcgtgagcggtatcagctcactcaaggcggtaatcgggttatccacagaatcaggggataacgcag
gaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggcggctgtgctggcgttttccataggctccgccccctgacagcattcaca
cgacgctcaagtcagaggtggcgaacccgacaggactataaagataaccaggcgtttccccctggaagctccctcgtcgtctcctgttccgacctgcccgttaccg
gatacctgtcccttctccttccgggaagcgtggcgttctcatagctcacgctgtaggtatctcagttcgggtgtaggtcgttcccaagctgggctgtgtgcacga
acccccctcagcccagcctgctccttaccggttaactatgctttagtcaaccggtaagacacgactatcgcactggcagcagccactggtaacaggatta
gcagagcgaggtatgtaggggtgctacagagttctgaagtggtggcctaactacggctacactagaagaacagatattggtatctcgcctcgtcgtgagccagttacc
ttcggaaaaagagttgtagctttagtccggcaacaaccaccgctgtaggggtgggtttttgttcaagcagcagattaccgagcaaaaaagagatctcaag
aagatcctttagtcttctacggggtctgacgctcagtggaacgaaactcagcttaagggttttgggtcatgagattcaaaaagatcttccactagatccttttgggt
catgtgcagctccatcagcaaaaagggtatgataagttatcaccaccgactattgcaacagtgccgtgtagctgtagtcatcagcgggtggagtc
aatgtcgtcaatacgaatggcgaaaaggcagctcatcggtcagcttctcaaccttggggttaccgccggcggtgtgctgctggccacagctcctccgtagcgtccg
gccccgaagatgggcccacttggactgacgagccctcgtgctgctcgggtccgggagggacgctcgtcatgcccctcgtggtcaggtctggacgacgagccgttc
gatcctgccacgtcggcgttacaccggaccttggagttgctctgacacattctggcgcctgcaaatgtaaacgcagcggccatccatttgccttggcggcaggggg
ccacaggcagagcagatcatctgtgacattgccctgccacctcactcgcctgcaagcccggctgcccgtgtccatgaactcagtgggcaggtacttctcctggcgt
gggacacgatgcaacacgacgctgcatcttgcgagttgatggcaaaagttccctatggggtgccgagacactgcaccattctcaggatggcaagttggtacgctc
gattatctcgagaatgaccactgctgtagcgttgccttggcggacaggtggctcaaggagaagagccttcagaaggaaggtccagtcggtcatgcttggctgggt
gatccgctcccgcacatttggcgcagacccctgggtcaactgggcccagatccgtttagcttctcgtcatccgacagggcgggatgcaagaatgcatgcccgtcgc
cagtcgattggctgagctcagcgggagacagatgagcttggaggggcaaggtcgcgctgattgctggggcaacacgtggagcggatcggggattgcttcttca
gctcgtgtagatgctgacgctcaatgccgttggcctccgactaacgaaaaatcccatttggcagcgtgatccgattggcagcggcggagcggcaatggcgggagca
gacgctcgtccggggcaatgagatgaaaaagcctgaactcaccgacgctatcggccctggccagcagctagagtcgacctgacgttccccggggatcggct
tgccttgcctcgtcgggtgatgacttaccagctccgcaagtcgcttctttagtggagcgcagtggggacgtgcttggcaatcacgcgccccccggcgttttagcggc
taaaaagtcaggtctgcccctgggcccagccacgcccacatcatgaccttccaagctcgtcctcctctcgtatcttccagcagggcgaggatcgtggcatcacc
gaaccgcccgtcgcgggtcgtcggtagccagagttcagcagggcccagggcccaggtcgcattgatcgggcccagctcgcggacgtcgtcagatgctccac
gagcccgtgattttagccttggcccagcggccagcaggttagccgacaggtcatgcccggcccggccttttccaatcgtcttctgcttggaaaggcag
acacctgtaggtgggctgccccttgggttggcttcatcagccatcggcttccctcatctgttacgcccgggtgagccggcagcctcgcagagcaggtatccc
gttggaccggccaggtcgaataaggacagtgaaagaaggaaaccccgtcgggggtggcctacttaccctatcctgcccggctgacggcgttggatacacaagg
aaagtctacagaaaccccttggcaaatcctgtatctgctgcaaaaaggatggatataccgaaaaatcgctataatgccccgaagcaggggtatgacgggaaaa
gatccgtcagcctgacggatgcatggtaccgggagctcgaattcgaagcttctcagacgcgtcagctCATATGGATCCgatatcgcggtggcggcgcIC
TAGA

6.2.6.1 Vorkonstrukte

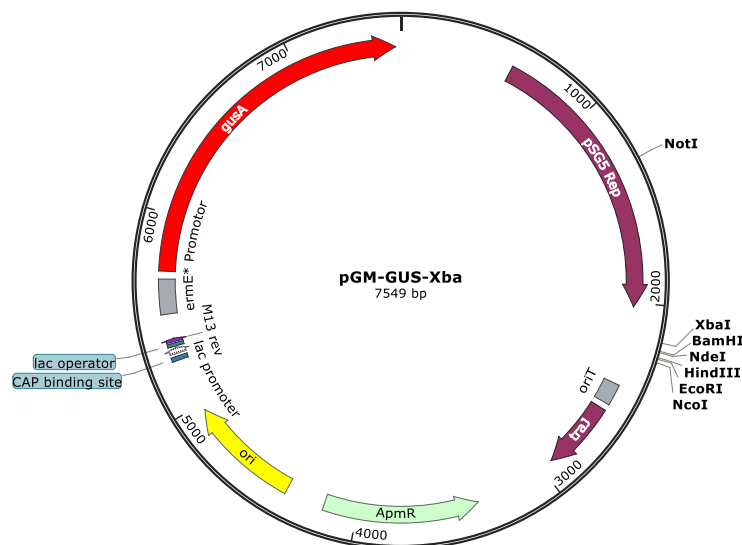
Da die geplanten Knockouts in *S. hawaiiensis* mit den auf pGusA21 beruhenden Konstrukten nicht erfolgreich waren, wurden diese Plasmide als Vorkonstrukte genutzt und die Inserts in pGM-GUS-Xba kloniert. Die Sequenzen der Inserts sind in Kapitel 6.2.8 zu finden.

gcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttccgaagtaactggcttcagcagagcgcagataccaatactgttcttctagtagcgttagtgcc
 accacttcaagaactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggtcgtcagtgccagtgccgataagtcgttctaccgggtggactcaagac
 gatagttaccggataaggcgcagcggctcgggctgaacggggggtcgtgcacacagcccagcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgag
 ctatgagaaagcaccgctcccgaaggagaaaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctggaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaac
 gcctggtatctttatagctgctcgggttccacacctgactgagcgtcgtatcttctgctgattttgtgatcgtcagggggggggagcctatgaaaaacgcccagcaacgccc
 ttttacggctctggcctttgctggcctttgctcacatgttcttctcgttatcccctgattctgtggataaccgtattaccgcttggagtgagtgataaccgctcgcg
 cagccaacgaccgagcgcagcagtgagcagtgagcaggaagcgggaagcggcaataacgcaaaccgctctcccgcgcttggcggattcattatgagcgtggc
 acgacaggttcccagtgaaagcgggcagtgagcgaacgcaataatgtgagttagctactcattaggcaccggccttacactttatgcttccggctcgtatgt
 tgttggaaatgtgagcggataacaatttcacacaggaacagctatgacatgattacgaattgtaccgggccccctcagggtccagcccagccgagcacgcgccc
 gcacgctggtgatgctggaccggagtccaggtacggtcaggtccaggaaggggagctccatgagtgctcgttcgagtgccggttgcgcccgatgtag
 tcggttgcagcgtcaggtgacggtcgtatctgacggtggcagaggtcggggaggatctgaccgacggtccacacgtggcacgcgctgctgtt
 gtggcacaatcgtccggttggtaggatcgacggtatcgataagctagtcgagcaacggaggtacggacatgctcggcccgcgaacccccagcccgagatca
 agaagctggacggcctgtgggctgacgctgacgggagaactcggctatcagcagcgggtgggagagcgcctccaggagtcgcgcacatccgctcccc
 ggacgttcaacgaccagttcgggacgagacatccgcaactacggggaacgtctggtatcagcgggaggtgttcatccccagggtggccggtcagcgcac
 gtgctcgttcgacgcgctgaccactacggcaaggtctgggtcaacaaccaggaagtgatggagcaccagggcggctacacgccttcgaggcgaactgacccc
 gtacgtcatcgcggcaagtccgtccgatcaggtctcgtcaacaacgagctcaactggcagacatcccgccggcatggtgatcagcagcagaacggcaaga
 agaagcagagctactccacgacttctcaactacgcccgcacaccgctcgtcatgctgtacacgacgccgaacacctgggtcagcagacatcacggtggtcaccca
 cgtggcccaggactgcaaccacgctcgtggactggcaggtcgtcgaacggcagctgagcgtggagctccgcgacccgagcagcaggtcgtggcagccggg
 agggcacctcgggaccctcaggtcgtgaacccccacctcggcagcgggtgagggctacctgtacgagctgtcgtgacggcgaagagccagaccgagtcgac
 atctaccctcgcgctcggcatccggtcgtggcgtcaaggcagcagttcctgatcaaccacaagccgttctacttcagggttcggtcggcagcagggacgccc
 acctccggcaaggcttcgacaacgtcctgatggtccacgaccacgcctgatggactggatcggcgaactcgtaccggacctcgcactaccgctacgggaag
 agatgctggactggcggcagcagcagggatcgtcgtcatcagcaaacggcggcgtgggctcaactgtccctcggcatcggcttcgagccggcaacaagccga
 aagagcttactccgaagaggcgtcaacggcgaaacccagcagggcccacctccagggcgtcaaaagagctatcccgcgacaagaaccaccgctcctcgtgatg
 tggctgatgccaacgagccggacaccggcggcaggggtcccgggagtaactcggcccgtggcggaggccaccgggaagctcagcccacccggccatcacctg
 cgtgaacgtgatgttctgcagcccacagggacacatctccgactcttcagcgtcctgtgactgaaccgctactacggtggtacgtgagtcggggacctggaaa
 cggccgagaaggtcctgggagaagagctgctggcgtggcagggagaagctgaccacggatcatcatcaccgagtagcggcgtggacacgctggcggctgctcactcc
 atgtacaccgacatggtccgaagagtagcagtcgctggctggacatgtaccaccgctgttcgaccgctcagcgcggctcgtcggcagcaggttggaaactccg
 ccgacttcgacactccagggcatcctcgcgtcgggggcaacaagaaggcgtctcaccgggaccgcaagcccaagtcggcggcgttctcgtccagaagcgg
 ggaccgggatgaactcggggagaagccgacgagggcgggaagcagtgataagcattaccctgttaccctagtt

6.2.7.1 pGM-GUS-Xba

In pGM-GUS wurde durch ortsspezifische Mutagenese mit den Primern SM-Xba-2-for und SM-Xba-2-rev eine *Xba*I-Schnittstelle eingeführt (6.2.8).

6.2.8 Konstrukte basierend auf pGM-GUS-Xba



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

ctagatcggacgtctatcggcgcgtcaggagcgcagcaggcgcaatgaacggccacacaaatgccaggatcaacaggaccagaatggcacgagcccggattgg
cctcccgggctcgcgcccccgaaccggcgcagcatgccagtgaggacgttctctgtgacgagcgtacgagagaacagcgcgtgacaccaccgccccggc
gaccgaagtccactcggcaccatcctccatccccgggaagcgcacaaaatctactgctcggacgcctgccaaaagcgcgaaagcgtctcattcggacc
agtacgcagcgtagcaagcacgactacagcggtaatccggacgcggtttagtagtaagggaatctccgtccactgaggtcagagcgtgtaactggaacg
ggttctacccaaacaggggtcgcgcagacccggcgaggagaccgcgcgacgagcggttcccccgggaccggcaccagacgggtgctgtaaacgaggcgt
tcaagggtcgggaccggctcactcgggacggcggagctgatgtggaagcggcgaggcagctggggcaacacgtgccgtgcaacaacgtccacacctg
cccgtggtgcatgagccatcctggcgtacgggctcgaacgtgagctcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gcccacttcgagcgcagcgttggcaccgtccgcaagggaatgaggcagcggcctgctcggctttgacgacggctggaaggcgctacggctcgtccggccg
ccgctggcgcagcagtgccgacactcgggatcagcggctacgagcggcctcggagacacctcggctggggctccggctggcaccctgacggcacacgctcgg
gtcaccgcgaggtgctcggcccggaccccaggccggttccgcagcactcgcggagcctggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gacgtgacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cgctacctcaaaagacggcgaagaccaaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gaccgctcagctgggagcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gcaagcactaccggtcgcagaacctgaaccggctgatcaaggaaactcggatccagcaggacgtccgcaccaggaggagatcaccgacgacaccggggcctggt
cgccatcgcggtcatccggcctacatctgtaccgatacatgcccgcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cggcggcgtcgtgagctcctgggctggtgtggggcaaggacgtcctggaccgcccccggaaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ggtcagaggtcatgcccaggaggagcgtcttccgcgagcgcgcggcaaggccaaacaggcccacgagggagctggcggcctcgtcgcgaccgagtgctcagc
cgaagaaggaggcagatcccccagcagcctcggaaagcgcctgaaagcgaaggcggctaccgctcagcgaagactccccgccggcggcggcggcggcggc
tgccgcgtcgaagggaagcgtccccggactcagcctggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cgccatgagaccgcccccagacatccgggtggcggctcatggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctggaatcccgcgccagtcgagcCTAGAcggcgtttcactggctcaattgtacatggatCATATGacgtcagcgtctgcagaagcttcaattcga
gctcccgggtaccatggatcctcaggtcagcggatctttccgctgataaacctcctcggggtcattatagcgtttttcggatatacctcttttcgacgat
acaggattttccaagggttctgttagacttcttgggtatcaacggcgtcagccggcaggataggtgaagtaggccaccgccgagcgggttcttcttctact
gtcccttattcgacactggcgggtctcaacgggaatcctgctcgcgaggtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ccaaccaggaaggcagcccacatcaagggtactgcttccagacgaacgaagagcgttaggaaaaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gctggcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
actcggctcaccgacgaccgcgcagcgcgggtcgggtgatccacatctcgcctcgtggcgaagatcgaagagaagcaggacgagcttggcaaggtcatgat
ggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
actcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gagttcagcgtttttatctcattgccccggcagcagcgtcctccgacatccgcgtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
aggccaaaggcattgagcgtcagcagatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cgtatctcgttctcgtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ttgaccagggtcgtcccacaatgctcgggagcggatcaaccgagcaaaggcatgaccgactggaccttcttctgaaggcttcttcttagccactgtccc
aggcaaggcgtcacagcagtggtcattctcagataatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
caactcggcaagatgagcgtcgttggcatcgtgtcccagcggaggagaagtagctccatcaggtcatggacacgggagcggcggcggcggcggcggcggc
tggcaggggcaatggatcagagatgatctcgtcctggtggcccgcgtcggcgaaggcaatggatggcggcgtcgcgcttaccattggcaggcggcggcggc
gagacaactcaaggcgggtgaacggcgcagctggcagggatcgaacggcgtcgtcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
agcagcagggcctgatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gaagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cgggtggtgataaactatcctcttctgctgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gtttcgttccactgagcgtcagacccttagaaaagatcaaggatcttctgagatctttttcgcgctaatctgctgcttcaaaaaaaaccaccgctacca
gcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactctttccgaaggtaactggtcagcagagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
accactcaagaactgtagcaccgctacatacctcgtcgtcctaactcgttaccagtggtcgtcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gatagttaccggataaggcgcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctatgagaaaagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gcctggtatctttagctcgtcgggttccacactcgtcagcgtcagcgtatcttctgagctcgtcagggggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ttttaccggtcctggcctttgctggcctttgctcagatgttcttctcgttatcccctgattctgtgataaccgtattaccgctttagtgagcgtgataccgctcgg
cagccgaacgaccgagcgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
acgacaggtttccgactggaaggcggcagtgagcgaacgcaattatgtgagttagctcactcattaggcaccggcgttacactttagcttccggctcgtatgt
tgttggaaattgtgagcggataacaatttcacacagaaacagctatgacatgattacgaattgtaccggccccctcagggtccagccgaccggcagcgcggc
gcacgctggtcagtgccgaccgaggtcaggtacggcctgacggtccaggaaggggacgtccatgcgagtgcttccgagtgggcgttgcggcggcggcggc
tcgcggtgatcggcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gtgggcaaatcgtccgggttggtaggatcagcggatcagataagcagtagtcagcaaccgaggtaccgacatgctcggccctcgaacccccgaccggcagatca
agaagctggacggcctgtggcgttgcagcctgaccgggagaactcggatcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
ggcagctcaacgaccagttcggcagcggacatccgcaactcgggggaactcgtggtatcagcgggaggtttcatcccaagggtggcggcggcggcggcggc

gtgctgccttcgacccgtgacccactacggcaaggtctgggtcaacaaccaggaagtgatggagcaccagggcggtacacgcccttcgagggcagctgacccc
gtacgtcatcgccgcaagtcggtccgcatcaggtctcgtcaacaacgagctcaactggcagaccatcccggcggatggtgatcacggacgagaacggcaaga
agaagcagagctactccacgacttctcaactacggcggatccaccgctcggtcatgctgtacacgacccgaacacctgggtcagacatcacgggtggtcaccca
cgtggccaggactgcaaccacgctcgtggactggcaggctcgtccaacggcgacgtgagctggagctcccgacggcggagcagcaggctggtggcagccggg
agggcacctcggggaccctccaggctgtaacccccacctggtcagcggggtgagggctacctgtacgagctgtcgtgacggcgaagagccagaccagtgctgac
atctaccctcgcgctcggcatccggtcgtggcgggtcaaggcgagcagttcctgatcaaccacaagccgttctacttcagggttcggtcggcagaggacggc
acctccgggcaagggttcgacaactcctgatgggtccacgaccacgcctgatggactggatcggcggcaactcgtaccggacctcgcactacccttacgggaag
agatgctggactggggcggacgagcagggatcgtcgtcatcgacgaaaccggcggtgggctcaacctgtccctcggcatcggcttcgagccggcaacaagccga
aagagcttactccgaagggcgtcaacggcgaaaccagcagggcccacctccaggcgtcaagagctcatcggcgcaagaaccacctcctcgtgtagt
tggctgatgccaacgagccggacaccggcggcagggtcccgggagtagtctcggcggctggcggaggccaccgggaagctgacccaccggcccatcacctg
cgtgaactgatgttctgacgcccacacggacaccatctccgacctctcagctcctgtgctgaaccgctactacggctgtagtgcagtcggggacctggaaa
cggcggagaaggtcctggagaagagctgctggcgtggcaggagaagctgaccagccgatcatcatcaccgagtagcggctggacacgctggcggctgctcactcc
atgtacaccgacatggttccgaagagtagcagctgctggcgtggcagatgtaccaccgctgttgcaccgctcagcggctcgtcggcggagcagggtggaacttcg
ccgacttcggccacctccaggggcatcctcggcgtgggggcaacaagaaggcgtctcaccgggaccgcaagcccaagtcggcggcgttctcgtccagaagcgtg
ggaccgggatgaacttcggggagaagccgacgagggcggaagcagtgataagcattaccctgttaccctagtt

6.2.8.1 pGM-GUS-clpP1

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern links-flank_fwd, links-flank_rev, rechts-flank_fwd und rechts-flank_rev amplifiziert und mittels Gibson Assembly nach Linearisierung von pGM-GUS-Xba mit *NdeI* in den Vektor kloniert.

CATATGacatcagcaggagctgaaggacggcgaacgctgaactcaccgcccaggctgacatccgccctccatcagatcccggactactccggcatcaggtcga
ggtcagcgcctcagaggtcaccgacgaggacgtcagaagtcggtggagcagctcgcgagcgttcctccacctccccggtcgagcgcggccggacggcg
acgtgctcaccctcagctcagggcaaggtcagcggcagatcctcagggacggcgtcggcagggctgtctacacctcggctcggcggagctgctggacggca
tcgacgaggcgtgaaaggcctggaggccggtggcgaaggccacctcactccgagctcaaggcggtcggcggcggcaaggaggccgaggtcaccgtcaaggt
ctcccaggctcggcgcgagctgcccagctggacgacgacttcgagcagctcgtcggagttcgacacgctggaggagctcaggccgacagccgcaagccct
ggccaacatgaagcagtagcaccagggccacgagccaggagcgcgtcctggacaagctcgtcagctggtcaggtcccggcggagaagctcctcagggacg
agatcaaccaccgcaagcacaacctcagcaccaccagctcggccagatggccctcagctcgaagaactcctcagctcaggggcaagaccggcggaggttca
gaccgagaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cacctcatcgcggctcggcctcctcggcatgtccccgaccagttcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
aggccttggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
acggccaccgaggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gacgttcgacgcccggggcccgttctgataggcaggacagcccggggggcgggggaaccgcgacggggccacggacggccggcggcggcggcggcggcggc
aatccgcccagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gaatcaggggacggggagtcctcggaaagcggcctcagccccgagggaaacgtgagacggccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cgagcagatcaccggtattcggaccgacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gcccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cgtgaaccggcagggacatcgcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
cgtgcgcgatcagaccctcagcgaagcttctcagggagcgggtatctcctcggcgtccagatcgacgacgctcggcgaacgagctatggcggcggcggcggc
ctggagtcagtgaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gacgtccagacggctcgtatggccaggccctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
caccagcgtacagcagaccggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctccaccacggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ggaagatggacaactcctcctcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ggacgagggggcccggcaaggtaccgtcggacataaggcagcaccaggagtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
acaccgtggcagcagcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gagcagagtcacacctcgaacagatcagcagggagagctggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
ctcagagactacgtggtcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggcggc
gcccggaggacccatcaggttggcgaagtcacaacctcctcgtggtCATATG

6.2.8.2 pGM-GUS-clpP2

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern ClpP2flank-links Fwd, ClpP2flank-links Rev, ClpP2flank-rechts Fwd und ClpP2flank-rechts Rev amplifiziert und mittels Gibson Assembly nach Linearisierung von pGM-GUS-Xba mit *NdeI* in den Vektor kloniert.

CATATGcctcgagaagtacctcgagctcagggaagaccgcccaggagttcagagaccgagaccgagggccggtcaaggcatcaagaccagttcgtctcgcagagctggtcaagcaggagaagctcaacgtcagccaggaaagagctgaccgagacctcatcgccgtgccctcctccggatgtccccgaccagttcggccgctcgtcgagcagggccagggtcccgtcctcgtcgtgaggtgcccgcggcaagccctggcccccgtgagagaagccaggtcaaggacaccaacggcagatcgtcgacctggagcagcaggagagcaggagagcggagcccccaggccgacccaggccgcccagcggagaagccgacgacaaggccagggaagaaccgagggtgatccccctcgcgcccgtccccgacggatgtgaaacgggccccggagctccgacgcccgggcccgttctgtataggcaggacagcccaggggcgccggggaaccgcgacgggcccacggacggcccgcgcccgggaaccggccaatccgccacggcggtggcgatccgcgacccccggagcgctacgccccggcgaaccaccgcagaaccgggatggcaccggagggtaccggttagggccatgaatacagggcaggggagtcgggaaagcggtccagccccaggggaaacgtgagacggcccgcgctgtaagacgagcaggtggatacgtgacgaatctgatgccctcagccggcgagccctctatcggtggcgccctggcgaccaggtctacaaccgactcctcggcagggatcatctcctcggccagcggctgacgacgacatcccaacaagatcaccgacagctcctccttgcctccgaccggacaaggacatctcctgtacatcaacagcccggcggttccgatccggccggcatgctacgacacccatgacgtacatcaagaacgagctggtgacgatcgcatgggtctcggccctcatgggacagttcctgctcagcggcacccccggcaagccttcgctgcccgaaccccagatcctgatccaccgcccctccggccctggccggttcggcctcgacatcaagatccacgcccggcgtctgcaaccaagcggcgatggccgagctgacctccagcacaccggccagacgatcgagcagatccccgcgattcgaccgacccgtgttcgacgccttcgaggccaagagatcgccctcatcgacgacgtatgccacggcccccggatgcccggcggggggcgacggggcctgagccatcctcccccaggccgaccctcagccccttaccaggagacactgtgaacgactccccggcagcggcctgtacgaccgctgaacgacagatcaccaccggagaagatggacaactcctcctcgcgtaggcaagggctgtatcgtcgtccgctccttggcagcgtttgacgctcagctcaaaagggaacgtgccaaggggggcccggcagggggcccggcaaggtaccgtcggacataaggcagcaccaggagtcgcccgcggttgacgtgacgtcagctcgggagttccaggcgaagggggaagcaccctggcagcgtcgtgacggcgccgatctgctcaagtgtcgttctcgggaaagaccagaagcaggtcaagaagctcatcgcaaggcccgggtgtacatctcgacgagtgcatcgacctgcaacagatcatcgaggaggagctggccgagaccagcgaggtgctgctgggaggagctccccaaagcccgagatctacgagttcctcagagactcgtggtcggccaggagcggccaagaagccctcctcgtcgggtgtacaaccactacaagcgggtccaggccggcagaacggcgcccaagccgcgaggacccatcgagtggcgaagtccaacatcctcgtggtggcccacgggtccggcaagaccctcctcggcagaccctccccgatgtaagctcccgttgcgcatcgccgacgcccggcgtcaccgagggcgtcaccgagggcgggtacgtcggcgaggacgtcgagaacatcctgctgaagctgatccaggccgactacgactcaagaagccgagaccggatcatctacatcgacgagatcgacaaggtcgcgaggaagtgagaacccctccatcacgcccagctgtcggcgagggcgctccagcggccctgctgaagatcctggaggggcaccaccgctcctcggccgagggcgcccaagcaccgacaccaggatctccagatcgacacgcaaacgtgctgtatcgtggcggtcctcgcgggctgaggaagatcatcgaggccggcggcgccaaggccatcggtcggctcggctcggctcagatccgctcaagcgggagatcgagaccagttcagcaggtatcgccgagccctcctcagatcctggtcgaagcgcgcaacgctcgtcaagcagtagcagcctcctcgaactcgacggcggtggagctggacttcgagcgcgagggccctggaggccatcgccgaccaggcgtatcctcgcgacaccggcccgcggcctcgcgcatcatggaggaagctccaggcgctcatgtacgaggtcccctcccgaaggagctgcccgcgctcgtcatcaccgcccagctggtcctcacaactcaaccgacgtgatccccgggattcCATATG

6.2.8.3 pGM-GUS-clpP3

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern ClpP3flank-links Fwd, ClpP3flank-links Rev, ClpP3flank-rechts Fwd und ClpP3flank-rechts Rev amplifiziert und mittels Gibson Assembly nach Linearisierung von pGM-GUS-Xba mit *NdeI* in den Vektor kloniert.

CATATGcgcgctcagctcggcagcggtaagtagacgttgatggtggggcgggacctcgggcccgggaagtccctcctcatggccatgcccagggacggggctcgcgaggtcgaagaggcggaaagtcacctggtcgtcctgcatctcggggcccggtaggagaagaccgcccgggaagaaagcgctccgactcggggctcggggtgaaagacctggcccagcagtagcgcgggggacggcctcgcctcgaagccctcgtgctgtcgcctcgcagactccgaagaccaccgctcgggtcggggccagacatggtgccaagctcggacctcagcagcagctcggccggcctcgggatcccggcggctcggcggcgtcggggaggcgaagtagaggcaccactgggactggtcctcgtgaccggggggggggaccacggcggccaccgcttccgtcggctgtagcactgggtgtagttgccaactcctcgcagactcgcgaaggtccagcggagcgtcggtagaagctcttggctccctcagctcggtagaacatcgctcggcccagcaaggggccccttgggggtgacggccatgactgcccctcctgtagcacaagtggtcggactcggggggggaacgggatgaccggggcccgggtcgggtccgggtccgggtcctcagcccggcgtcactcctccgctcctcgcgcccggcgtcactccccggctacgctgctccagtgcggcgtatgtagcttgcgatcagatcatggccttgtggcccgcaccaccctggcggggtcggggtcgggaacatcctcagaccggcgggacgactccaggacacgccaaccggtccttgagccagcggcggcctcctcgcgcccgcctcgggtgagcctggtccaagtagtggtcgaacctcgtcctgctcgcaggtgatctggaaggagatgcctcgttgaactgaactcggggcggcgttggggcccaactcctggccttggcggtgaaactcgacggtagcaccgagccggcgggctcgggagctcctcggggtagcgggtgacggcggatgcccggagtcttgaagacggagacgtagaagtgggcgctcctcggcgtcggctgaaccacaggcaggtggtgaatcctcgtgctcatgagtagctccaggagcggaaacaggtcaccactgtcagcggcggaccgccaactcatcgtcctcgggtggcgaatctcccggggcagagaagttcccctgctcggggcccggggggcggcggcgaagtggaaaaaccggcggcgcgttccggccacaccggcaccacccgcacgaccggccacgaccggccacgactcgacaaggagcggcggatgtctcattaccggccccggcccccggcccgaagcccagggccgagggatggaccaggtcgtgacgtcctcgcggacgtgcccggcccaccaggcggacggatgggactgtgacatggggagctacacgattccgaactgctgagcggaccggcaggggcaacggctctacagctgttcagccggctgctgcccagcggatcatctcctggggaccgagatcgacgacggcgtggcaactgctgatcgacagctcctgacactggagctcgtcggccccgagagcggatgcgcttcatcaactcctcccggcgtcgttaccgtcgtgatggcgatctacgacagatgacctgtgacggcggcggatctcagacttctgctgctgggacggcggcgtccacggcggcggcctgctgctgcccggggggggaccggggggggggtcgtgctgaacacgcccgggtcctgctggggcagccggccagcggcggcccagggcacgggttccgacctggcactccaggccaaggagatgggtgcatccgctcccaggtggaggaggtgctggcccacacgaccacgactcgcgacgctcgcgcccggacatggaccgcaaggtttaccggcccaggagcgggtggcctaaggctggccgacaggtgctcgcgcccggcctgacggggtcgtagctgcccaggcggcgtcccgggtgcccggggcgccggcccctacgctcctcaggcggcc

aggcacatcccgtgaaccgcgccggacccccggcccggggcggtgtccggatcagctcgcctcgcgcgggagcaggtgcccagggcca
gtccgagggcgcccggcgccgacttccggaggacgctccttgcggcgcgctccacctccgagaggtaggatcgagatccggcgccctcggcgacc
tccttcagcgtgctcctgctccaggcgttacgcccagggacgtctccgaccaggtcgcgccacaggggctctcgcgcggcgggcctcctgctccggggaaaccg
gtgaggcgggccgccccggggcgctggcctcggggcgcgccgctcgggacgctggcctcggggcgagcggaaatgacggggcttctgctggcgacgtgg
ctggtcacctcctcagcctagggttccggccgctcccgtagggtgctggcctcggcctcaggagaatccgcccgcctcggcgaagcggcccggatccgcccggaccg
tcgggggactaggtgctcggaaatgggagggcatgagccgcccgaccgggtaccgcaagcgcgaaaaacctaggagagccgtgacttctgaggagagcca
atgacagaccgctggtccgccaagcaggttgcgggaagaccgcccggagcggaaacggggagggatcagcgcgggacgtctgaggacccccgagcgtgg
caccgcgacgcgcccagttgctcccagttctcCATATG

6.2.8.4 *pGM-GUS-clpP1clpP2*

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern *delta1.2_left_for*, *delta1.2_left_rev*, *delta1.2_right_for* und *ClpP2flank-rechts Rev* amplifiziert und mittels Gibson Assembly nach Linearisierung von *pGM-GUS-Xba* mit *NdeI* in den Vektor kloniert.

CATATGgacatcacggagctgaaggacggcgaaacgctgaactcaccgccaggtcgcacatcccccctccatcgagatcccggactactccggcatcaggtcgc
aggtcgacgcccgtcaggtcaccgacgagcgtcgaagaagtcggtggagcagctgcgcgagcctcctccacctccccggctcagcgcgcccgcggacggc
gacgtgctcacctcgaactcgaggccaaggtcgaagcgcagatcctcaggacggcgtcgcgacggtgtgtcctacaccatcggctccggcgagctcgtggacggc
atcgacgagccgtgaaggcctggaggccgggtggcagggccacctcaccctcagctcaaggcggtcggcgggcggcaaggagccgaggtcaccgtcaagg
tctcccaggtcggcgcgagctcggcagctggcagcactcgcgcagctcgcctggagttcgaacgctggaggagctcaggccgacacggccaagcggc
tggccaacatgaagcagtagcaccaggccacgagggcccagggcgcgtcctggacaagctgctcagctggtcaggtcccgggtccccgagaagctcctcaggac
gagatcaacaccgcaagcacaacctcagcaccaccagctcggccagatgggctcgcacctcagagaagtacctcagctcaggcccaagaccgcccaggagttcg
agaccgagaccggcgaggccggcgaaggcagcacaagaccagttctcctcagcagctggtcaagcaggagaagctcaagctcagccaggaagagctgaccga
gcacctcagcgcgctcggcctcctcccggatgtccccgaccagttcggcccagggcgtcgtcagcagggccaggtcccgcctcctcgtcggtaggtcggcccggc
aaggccctggcccggtgctgagaaggccaggtcaaggacaccaacggcagatcgtcgcacctggacgacgaggagcagggagacggaggcccccaggcc
gacgcccaccgagggccgacgcccgaagaagggcagcagaagggccagggagaagaccgagggtgatccccctcgcgcccgtcccgcagggatgtgaacggggccc
ggacgttcgacgcccggggcccgttctgataggcagggacagcccggcccagggcgcggggaaaccgcgacggggccagggacggcccggcccgggaaccggc
caatccgccacggcggtggcgatccggcaccggcggagcgtcagccccggcgaacacccgcagaaccgggatggcaccggaggggtcaccgcttaggggtcca
tgaatacagggcgaggaggtcccggaaagcggctcagccccgaggggaaactgagacggcccggcgctcgaagcagcagcaggtggatcagctggaccaga
tcatcaccaccggaagatggacaactcctcctcctcagctaggcaagggctgatcgtcctcggcctcctggcagggtttgacgcgattcacgtcaaagggaaccgtgcc
aaggggggcccggacgagggcccggcaaggtaccgtggacataaggcagcaccagggagtcggcccggcttgacgtgacgtcagctcgggaggtctcccaggc
gaaggggaaagcaccggtggcagcagcaggtgacggcggcagatcgtcctcaagtgctcgttctgcccgaagaccagaagcaggtcaagaagctcagcagggccc
ggtgtgatcagctcgcagcaggtcagcagctcgtcaacagagatcagcagggaggagctggccgagaccagcaggtgctgctgggaggaggtccccaaagccccgga
gatcagcaggttctcagagactacgtggtcggcaggagggcgaagaaggccctcctcgtcgggtgtaacaacctacaagggttcaggccggcgagaaccg
gcccgcgccaaggccgagggacccatcagttggcgaagtccaacatcctcctcgtggccccacgggtcccggcaagacctcctcggcagacctcggcccgca
tgctgaacgtcccgttcgcatcgcgcagccacggcgtcaccagggcggggtacgtcggcgaggacgtcgaagaacctcgtgaagctgacagccgcccgact
acgagctcaagaaggccgagaccggatcctacatcagcagatcgacaaggtcgcgcggaaggtgagaacctcctcagcgcgacgtgtcggcgagggg
cgtcagcagggcctgctgaagatcctggaggcaccaccgctcctcccggcagggcgccgcaagcaccgaccagaggttaccagatcagacagcaga
acgtgctgtcagctggcggtgcttccggcctggagaagatcagcagggccggcgccgcaaggcagcaggtcgtcggcagatccgctcaagcggg
agatcaggtcaaggaccaggtcagcaggtcagcggaggacgtgtaagttcgcatgatccccagttcagcggcggctgcccctcagcactcctcagcagc
cctcagaccgagggcctcctcagatcctggtcagcggcgaacccctcgtcaagcagtagcagcctcctgaaactcagcagcgtggagctggactcagcagc
cgaggccctggaggccatcggcaccagggcagctcctgcccagaccggcggcccggcctcgcgcccagcagcaggtcagggagagctcctcaggggcgtcagtagcaggtcc
cctcccgaaggagctcggcgctcagcagcagctggcctcctcaacgtcaaccgacgctgatccccgggattccCATATG

6.2.8.5 *pGM-GUS-clpP3clpP4*

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern *ClpP3flank-links Fwd*, *delta3.4_left_rev*, *delta3.4_right_for* und *delta3.4_right_rev* amplifiziert und mittels Gibson Assembly nach Linearisierung von *pGM-GUS-Xba* mit *NdeI* in den Vektor kloniert.

CATATGcgctcgcagtcgcccaggtgaagtagactgtgatggggcgggacctcgggggggaagtcctcctcagcagcaggtgcccagggacgggggtgctc
ccgaggtcgaagaggcgaaggtccacctggtcgtcctcagcagctcggggcccggtaggagaagaccgggggaagaagggcgtccgactcggggctcgggggtgaa
gacctcggcccagcagtagcgcgggggacggcctgcctcgaagccctcgtgcttgcctcggcagactccgaagaccacccgctcgggtcggggccagaca
catgggtccgaagtcgcccacttcagcgtccagcagcagctcgcggcggcctcgggatccgcccggcgtcggcgccgctcggggagggcgaagtagaggc
accactgggactggtcctcgtgaccgggggggggggaccaccggcggccaccgcttgcctcggcgtagcactgggtgtagttgccaactcctgacgactcgc
cgaaggtccagccgagagcgtcgcgtagaagctcttggctcctcagcagctgggtaacatcgcgtcggcccagcaaggggccccttgggggtgacggccatgactg
ccgctcctgtagcagaagtggttcgactcgggggggaaacgggatgaccggggcccggctcgggtcgggtcgggtcgggtcctcagcggccctcagcctcccgc

gagcctcgtcgttccctcccctgcccgatgtccgaatgccatggaagcagtgcccaacggcaccgtcatcaaggcctcctcagtcggcctgacatccattctgtg
gtccgatttcccgccaccagtcgctgctgctgcccgttgaggagcagacatgcatggcacccctggaggcaccgaggggttcggtgacgaggatgacaggatgc
attcgtcgcgaaagacgggaagcggcgcccaaaccttgactcagcaacgactcgcgttccgggtgccaccggtcatctcgaactcccgaatccccctgccg
agcgacacactccgcgatggcccaaggctggccggcgtggccagcctaggaggtgtggcaagcCATATG

6.2.8.7 pGM-GUS-Xba-AlcoDe

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern AlcoDe_links_for_XbaI, AlcoDe_links_rev_BamHI, AlcoDe_rechts_for_BamHI und AlcoDe_rechts_rev_NdeI amplifiziert und zunächst nacheinander über die Restriktionsschnittstellen XbaI, BamHI und NdeI in den Vektor pGusA21 kloniert. Durch Restriktionsverdau mit XbaI und NdeI konnte das vollständige Insert ausgeschnitten und in pGM-GUS-Xba kloniert werden.

TCTAGAgctgcacaccttggtcgaagtattgcaactgatcgatccgaggctatggtcaaccagcgggaaggaggctcagaaggggcgaccacgtgaactcg
ccctgtgctgaggtgagatgcttccgacggttcggtcagcgtgcaagcgtgagggtggtcgttaactacaaggggaccctggtgaaggcggaggcgcatactg
gctgatcagattactagcgtgaagatctactgtcaagctgcgccttccctgcccagggttctgcttgcacccctcggggggcgggtgtggtgctgctcctctcgtg
ccgagctcggcctcgcctgggtgcggaagtttctgtgatccgttgcggcgccattggtgtcacccttgagtcgcccagcagtggtcgcgaaaattctggcgt
tgtctcctcgtcccagtcggtcaccctcctgggtcattgaattccggctcgtgttcggtaaagcctggcgtggcgccgctagggcagcatcgttcggtcggcc
ctggcggcagggtgcctcaagtcgaatcgccttagtgacacttgcgaatcgcattgactattcgtcagttatttcgaatttcccaattagggggattcgtgcag
ctggcaaaaagcgtgctggatcagatgaccgcgatgggtcgtcctcgtcccggggccttttctcctcggagatggactgcttaaggggcgatggccgaggagc
tggcctcagtaagggtccgcatctgatcacggaggatgacggtgcgacactcggggcctttacgctcacacaccggcatcgcctctcagtacgttggtttctcc
gcgactcctcggcggatgacgttgggtgctcaggacctctacgtgaccaatcaagatcaacacgaagcggcctcggggcgatcatgggatggcac
caggactacccgtggtggcgcgacccgaccgtatgccgaaccagtcgctcaacgtggcgtatctcctggacgaggttaaccagttcaacggccccgtgggttcc
tgcggggctcgcacaggctcgggtcgggaagcagttctcgcagcaggccaaccaggcgggggagcacatcgatccgatgactacgcgctgccaccggtgacctg
ccaagctcgcggaagtgcacgagatgacgagcccaaggggccggcgggaaccgtcgtcttctccaccggagatcatgcatggatcagcaccaacatctccccct
tccgcgcgactcgtgattgtgactgacaacgcctccactaatgcgcctcgggggggagaaccgcgccccgaatctcgtggcgggagcgtcacgccctcgt
ggcaactcgtggacactggagactattggggcatccatagcggcggaatcgtgacacactgggaattcggcagcggcggtactcaggaggattcGGATCCg
tcatcaaggcctcctcagtcggcctgacatccattctgtggtccgatttcccgccaccagtcgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctgctg
gaggcaccgaggggttcggtgacgaggatgacggatcgtcgtgaaagacgggaagcggcgcccaaaccttgactcagcaacgacttcgcttccggtgcc
caccggtcctcgaactcccgaatccccctcggcagcgcacactcgcgatggccaaggctggcggcgtgcccagcctaggagggtggtggcaag
catcgtggccatggggcggctacctcacccgatcgcggacaagcgcgaacccctcgtaccaacctcctcgtacactcagtcaggtcagcagcagcggta
ccggctggatctcgtcctatgacgatgctccttctgctggtcagcagaccacgatcaatctcagcgaacgggctgctcgcgctcgtcgcctatgacaccagc
gtcgggactggccggcagcagacccctggcccgggtcggctgatgaactgattgaaccttttccgcttggcagaacctcagacagcgaagaatcaggga
atcagatgggaatcagggaagcggatgacgccaatcggacagggtaagaagatcgtgctgcatcggctggagctcagcaggagcaagtgacctgacgag
cctcttccatgaggagcaggttcggactcctccagatcgaatcctcgtcctcggaggcggattcagatcagatcagatcagctccagcttctagaatg
tcaatgtaaggcgtctacaggtttagcggagaccatcggtggtaatccccactgccccgcttattcaaccccagggagactcatgcaacggcccccttgc
gactatcaggcgtcctcgtcggcagtggttctgaccggcctggcgtagtgcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
gcccgcggggccgatcagcaggttcgacacgacaggttcgccactcgaacggctgtgaggtggtggattcgaacccgagcaatggatctgaacctcagctgg
agaactgggacgagccagcgggttctcctgtagcctcgcggatgcccgtcgggacggcgtcggaaagcgaagagcctcagcgaacccggactggtcgt
ataggaccaccgagcggcaatcacacgacctggatcaactcgtggagatcagctcgggagggacacgagagatgcccacagcgtcgtgaggggtcagtc
cctcgggttgcactcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cctcgggttgcactcctcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc

6.2.8.8 pGM-GUS-Xba-NRPS2

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern links-Xba-for-pGUS, rechts-NdeI-rev-pGUS, links-BamHI-rev-pGUS und rechts-BamHI-for-pGUS amplifiziert und zunächst nacheinander über die Restriktionsschnittstellen XbaI, BamHI und NdeI in den Vektor pGusA21 kloniert. Durch Restriktionsverdau mit XbaI und NdeI konnte das vollständige Insert ausgeschnitten und in pGM-GUS-Xba kloniert werden.

TCTAGAccgttgcgttcgctcagcggcgttgggtcctgcacaggctggaggggccgagtgacgactacaacatccgatggcagatccggctgctgggtgagctg
gaccgggacgcgctgaggctggcgtgggtgatgtgtcagcggcagcagagactcgggacgggtttcccagggtgatgggggtccgagcagagggtgctgag
gtctcgtcggcggcgtggggttgcgtggtgctgacgggtggaggaagagctgctgagaggctggcggccggtgctccgatggtttgacctggcgaacgatctc
cttgcgtgacgcttccgagctgctcggaccgaacatgctcgtgcttctgactgaaccattgctggcagcggttggtccctcggccttctcgcgcgactcac
agaggctatgtggcgggggtgggtggcgtgtcgggggtggcggagttcgggtgagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc
cgatccgagagtgctacagcctcaggtcagttactggaagacagccctgacggacatccccaccgctggagcttccggtggaccgtccgctcggcgggtggc

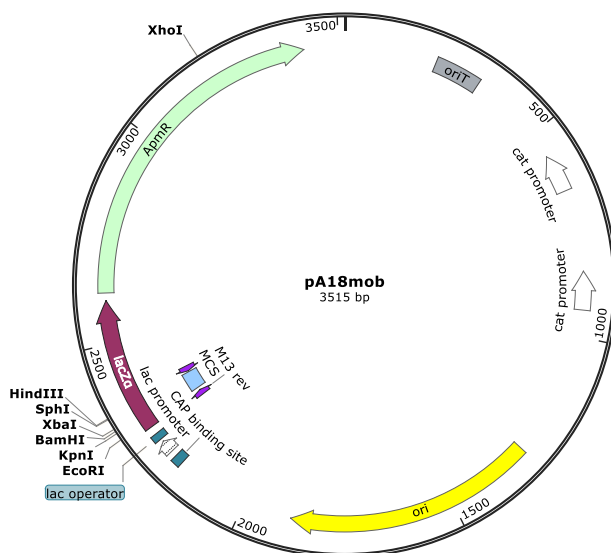
ttgaggtcgcggaccaggaggttcgcgctcggggtgtagccagcttccttatctctcccagcagttggttacaggaactcccgttcagcccccgggggtgcgacag
atggtcgcggtaggggtcaacgagcgtgggcccggtaggcggggcgatgcgcagagcctgggcttgggcatcgggctagcgttCATATG

6.2.8.10 pGM-GUS-Xba-PutProt

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern PutProt_links_for_XbaI, PutProt_links_rev_BamHI, PutProt_rechts_for_BamHI und PutProt_rechts_rev_NdeI amplifiziert und zunächst nacheinander über die Restriktionsschnittstellen XbaI, BamHI und NdeI in den Vektor pGusA21 kloniert. Durch Restriktionsverdau mit XbaI und NdeI konnte das vollständige Insert ausgeschnitten und in pGM-GUS-Xba kloniert werden.

TCTAGAGcctcatcaaccgcatccaggacctgtagcgtggaacttcgattcgtagttgttgaagcggcaccgtggcgggctggccgaacacctgggctgg
acaccaaggaaggcgcctcagctcctgctcgggtgaggactaacggtgacagaccctctctgcatccatcccggcggctcagctggtgctatgcggg
actgctaaagcatctcggaccggccctccgatctacgggctgcaggctcgcggctcggcagcccaggaactaccgaagaccatcgtggagatggccggcact
acctggagcagatgagggcggtagcagccgacggcccgtaccacctgctgggctggtccttcggcgggatggtcgccatgtcatagccacgagctgcaggataagg
gagagagcgtcgcgctcgtggcgatgctcagcctatccgatcgtccggaacaggccgacagagaacggcggttgagaaggaaactgctcagacactcatc
cacttcgtgggaaatcgatgcccagcaccgggacaaattggaccggtcagctgcctggacatcctcggcaggaaaggcagcgcctcggcgtcagcaccg
agcagctcagcgttatggacatctcatcaacaacaagaattgctgacaggttcaaccctcggctcctcgggagctcctgcacttcacggccacgctggccg
ggacgagaggacaccgacggcggagttggcggaccgcatgcaaggcgtatcgaggaccaccgacgcctcggcagcaccgggacatggtcagccaggccg
cttgcgaaatcgaaagatcgtggcgcacaagcttgaccaggccctgaagaaacaagagcagacaagaaaacgaaaggtagctatcgttccaatcccttga
ggacaacgacagcgaatacctggcctgtcaacgacgaaggacaatactactctggcccgcgtacatcggcgtccctgagggatggatgtagcgcaccagaagg
ctggcctcaggtctgcctggaatacattgaggcgaatggacggacatgctccccggaccttcccgaagcgtcagcaggccacgacggcaactcagtagccgg
aagcatcgtgctttccagattcgtgtgatcaatccccctgcgtcctccgcgcagggggcttctcctccctgtgagtgatggtcaatattggtatattaagggattc
ggatgacggtcgcagcagctcagccacgaggccttGGATCCatcgggcccgtcctgcttctgcatgatcctcctaagcagggttgcacacctcgtgccc
gttggtagggcaaggtagggcggcgtccacggcggaccggtagtcttcgaggcgttggtaagctcgcaggtgggtagttcagcgggtggtggcggcctgat
ccactcgtgagtttccctcgttgcctcggcgggttttggcagggtggcaagccgcgtacgggatcggcaatgtggtcatctcgggcaggccgcgacatcttctc
cagcagggtcgtttcctcgggcgacggttttcgggctcgtgagcaggaggcggctggcgtggcgtgggtagtgacggagcggctgccttcggcgcggcctggtg
aggctcgcggaccaggaggttcgcgctcggggttagcccagcttcttatctctcccagcagttggttgacaggaactcccgttcagccaccggcgggtgcgagat
ggtcgggttaggggtcaacgagcgtggccggtaggcggggcgatgcgcagacctggccttgggcatcgggctgtagcgtttgacggtgtagggctactccgag
gcggcgggagcagtcgagcaggccgacaccctggcgcgaggtcgtggtatctgttcagcttctcggggtggtctgctcgcgactccggggggcgggtcggattg
atggtggccagatccgatgtcgcgacacctcagctggacttgtgcgagaggtgcgcagaggtccatcgtcgtgactcgcacccgctggacaggggcc
ggcggatggcctcggcgtagatggccgagccgctcgcggtacacgatctcggcaacagagtgctcgcgacgaggactccagagtgccctcgcggctcgggcagg
accgcgacgcccggcggcttccgcatctgtgatctggtgtaacggtggcggcggcgcagggcgaaatcatccacgccgatcaccgcgggaccgctgctgt
ggcagcggcaggcgtcagatggcgtagcgcggtcgtcgggagacgggcacggccagcaggccggcaggcgtcggcccccggaccataactcctccgcca
cctgggatatctgcaggaagccgaccgtcggctctgatggcgttcagcagtcctgacacctcgcctcagcgtccggcacaccggacacggcaccgcccacat
cccgcgtcgggcccgtgaccaccaccgctcaccacagcctccacgtcctcacaacgagcaccggcCATATG

6.2.9 Konstrukte basierend auf pA18



Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung genutzt wurden, sind in der Sequenz mit Großbuchstaben und unterstrichen markiert.

ctcgcggacgtctcatagtcacacgacccccgattttgtagcctggccgacggccagcaggtaggccgacagcctcatccggcgccgcccctttctcaatc
gctcttctgtctggaaggcagtagacacctgataggtgggctccctctctgttggcttggtttcatcagccatccgcttgcctcatctgttacgcccgggtagccg
gccagcctcgcagagcaggattcccgttagcaccgcaaggtgcgaataaggacagtgagaaggaaacacccgctcgcgggtggcctacttccatctctccc
cgctgacccgttgatacaccaaggaaagtctacacgaacctttggcaaatcctgtatatcgtgcgaaaaaggatggatataccgaaaaatcgctataatgac
cccgaagcagggttagcagcggaaaagcgtcttccctgctgtttgtggaatatctaccgactggaaacaggcaaatgcaggaaattactgaactgaggggaca
ggcgagagacgatccaaagagctcctgaaaatctgataactcaaaaaatagcccggtagtgatcttattcattatggtgaaagtggaaaccttactgctccgat
caactctctattttgcaaaaagttggcccagggctcccggtatcaacagggacaccaggattatttattctgcaagtgatcttccgtcacaggtatttattcggcg
aaagtgcctgggtgatgctccaactactgatttagtgataggtgtttttaggtgctccagtggtctgtttctatcagctcctgaaaatctcgataactcaaaa
aatagcccggtagtgatcttattcattatggtgaaagttggaaccttactgctccgatcaactgctctattttgcaaaaagttggcccagggctcccggtatcaaca
gggacaccaggattatttattctgcaagtgatcttccgtcacaggtatttattcggcgcaaaagtcgctgggtgatgctccaactactgatttagtgataggtgt
ttttaggtgctccagtgcttctgtttctatcagggtggatgatcctccagcgcggggatctcatgctggagttcttcccacccaaaaggatctaggtgaagatcc
ttttgataatctcatgacaaaatcccttaacgtgagtttcttccactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaggatcttcttagatcctttttctgctgct
aatctgctgttgcacaacaaaaaccaccgctaccagcgggtgtttgttggcggatcaagagctaccaactctttttcgaaggaactggctcagcagagcgcag
atacaaatactgcttctagtgtagcctgtagtagccaccactcaagaactctgtagcaccgctacatactcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgctcc
agtggcgataagtctgtcttaccgggtggactcaagacgatagttaccgataaggcgcagcggctgggctgaacgggggttctgacacagcccagcttggga
gcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaagcgcacgcttccgaagggagaaggcggacaggtatccgtaagcggcaggggt
cggaacaggagagcgcagggagcttccaggggaaaacgctggatctttatagctgctgggtttccacctctgacttgagcgtgcatttttgtgatgctgct
cagggggcgggagcctatgaaaaacgccagcaacgcgctttttacggttctggccttttctggcctttgctcacatgttcttctcgttatcccctgattctgt
ggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcgcagccgaacgaccgagcgcagcagtgagcagggagcgaagcggagagcggcaaatagc
aaaccgctctcccgcgcttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggtttccgactggaaaagcgggagtgagcgaacgaataatgtgagttagctc
actcattagcaccacagcctttacactttatgcttccgctcgtatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagctatgacatgattcGA
ATTCgagctcGGTACCggggatccTCTAGAgctcagctcagcagcatgcAAGCTTggcactggcctgctgtttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcg
ttaccaactaatcgcttgcagcacatcccctttcgcagctggcgtaatagcgaaggcccgaccgatcgccctccaacagtgctgcagcctgaatggcga
atggcgagatcctttgttcatgtcagctccatcagcaaaagggatgataagttatcaccaccgactatttcaacagtgccgttgatcgtgctatgatcactga
tgtcatcagcggtagtgcaatgtcgtcaatacgaatggcgaaaagccgagctcatcggctcagcttcaaccttggggttacccccggcgggtgctgctggtcca
cagctcctccgtagctccggccctcgaagatgggccaactggactgatcagggccctgctgctcgcctgggtcgggagggagcctgctatccctcgtggtca
ggtctggacgacgagccttgatcctgcccacgtcggcgttacaccggaccttggagttgtctctgacacattctggcgcctgcaaatgtaaagcgcagcggccatc
catttgcctttgcgagcggggccacagggagagcagatcatctgattcccttgcacactcactcgcctgcaagcccggctgcccgttccatgaactcgtat
ggcaggtacttctcctggcgtgggacacgatgccaacacgacgctgacttccgagttgatggcaaggttccctatggggtccgagacactgcaccattctc
aggatggcaagttgtacgctgattatctcagaatgaccactgctgtagcgttctccttggcggacaggtggctcaaggagaagagcctcagaaggaaggtc
cagctgctatgcttctgctggttagctccgctcccgcgacattgtggcgacagcctgggtcaactgggcccagatccggtgatcttctgcatcccgagagggggg
tgcaagaatgcagctccgctcgcagctgattggctgagctcatgagcggagaaacagatgacgttggaggggcaaggtcgcgctgattgctggggcaacacgtgg
agcggatcggggattgtcttcttc

6.2.9.1 pA18-NRPS2_LRtsr

Die Inserts Flanke-links und Flanke-rechts wurden mit den Primern links-Hind-for, links-Xba-rev, rechts-Kpn-for und rechts-Eco-rev amplifiziert bzw. das Insert *tsr* mittels Restriktionsverdau aus dem Plasmid pSLE61 ausgeschnitten und alle nacheinander über die Restriktionsschnittstellen *HindIII*, *XbaI*, *KpnI* und *EcoRI* in pA18mob kloniert.

AAGCTTatgattccgttctgctcagcggcgttggcttctgacagcgtgagggggcagtgacgctacaacatccgatggcagcctgctcgggt
gagctggaccgggacgcgctgagcgtggcctgggtgatgtgtcagcggcagcagagctcgcggacgggtttcccaggttgatggggtccgcagcagaggg
gctgagtgctcctcggcggcgttgggttgcgggtgctgacgggtgaggaagagctgctgagaggtggcggccgctgctgaggtttgacctggcgaac
gatcttcttctgctgacgctgttcgagctgctcgcgaccgaacatgctcgtgcttctgactgaaccacattgctggcagcgggtggctcctcggcctttgctcgcg
acgtcacagaggctatgtggcgggtgggtggcgctgtcgggggtgctggaggttccgggtcagtagtggtattacacgctgtggcagcaggaactgctcgggt
atgagagcagatccgagagtgctatcagcgtcaggtgattactggaagacagccctgacggacatcccgcacggctggagcgttccggtggaccgtccgctcgg
cgggtggccagctatcagggcagatctatcagacatccagatgagcgcggaggtgcatggtcggattgtggcctggtcggagtggtggcgagtggttcatggtgt
gcaggccgctgctgggttctgtaagcggctgggtcggggctggacattgcttgggttcccaatcgcggggcggatggacgagcgcctcagatgctggtcgg
gttcttctgcaacactctgtgctgaggaccgactcctccggtgatcctgcttccgggagttgctggggcgggtgctgggagacggatcggccgcttattgccatcagg
atgtccgctttgagcatctggtgaggtgctaatccggcgcggtcgtgttcacatcaccctgttccaggtgatgctggcgttcagaacacgcctgaggggtgctttg
ttctcccgggttggagagctgatcagcgggtggggacgggaactgcgggttgcattgttcttcaatcgcggagcgggttctggcctgaggtgtggcgttggggc
ttgaggggttggaggtcagcagcggatctgttaccggggcagcgggtgctgttggggaacgctggtgctgggtgctggagcaggtggtggcggatccgggtgt
cggggtcgggtggagctgctgctcggcggcagcagcgtcccagatcatcaggctcggaatccaccgaccggaggtgatcctccgagcgtgctcctggaggc

gttcgagcgaggtgcggtgacccgcccgggtggcggtggtgtgtgacaggtcgagtttctgtatcgaggattgaatgaggggcaatcggtgcgcggtt
 gctgTCTAGAggatcatcactgacgaatcgaggtcgaggaaccgagcgtccgaggaacagaggcgcTTATCGGTTGGCCGCGAGATTCCTGTCGAT
 CCTCTCGTGCAGCGGATTCCGAGGGAACCGAAACGTTGAGAGACTCGGTCTGGCTCATCATGGGGATGGAACCGAGGCG
 GAAGACGCCTCCTGAACAGGTCGGAAGGCCACCTTTTCGCTGCCGAACAGCAAGGCCAGCCGATCCGGATTGTCCCGGAGT
 TCCTTCACGGAATGTGCCATCCGCTTGAGCGTATCAGTGCATACCGCTGTCCGAATGAAGGCGATGGCCTCCTCGCGAC
 CGGAGAGAACGACGCGGAAGGGAAGACGTAACCTCGGCTGGCCTTTGGAGACCGGGTCCGCGATGCTGGTGTACT
 GTCGACCAGGATGATCCCCGACGCTCCGAGCGGAGCGACGTGCTACTATCGCGCCGATGTTCCCGACGATTTACCCCGTC
 GAGAACGACGACGTCCCACGCGGCTCGGATATCGCGAACCTGGCCGGGCGAGGGACGCGGGCGATGCCAATGTCTTG
 GCCTTCGCTCCCTTGAACAAGTGGTGTGACGATCGAGGAGTCGATGAGGCGGACCGGTATGTTCTGCCCGCCGACAGATCC
 AGCAACTCAGATGAAAAGGACTGCTGTGCTGCGTAGACCTCGATGAACCTCACCCCGCCGATGCTGTGCATGAGGGG
 CTCGAGTCTCGATCAACGTTGCTTTATGTTGGATCGGACGGCTTGGTACATCGATGATCCGCTGCACCGCGGGATCGGA
 CGGATTTGCGATGGTGTCCAACCTCAGTTCATggtcgtcctaccgctcgtgttctcagtgacgcgattcctggggtgtgacaccctacgcagcatggcgga
 tggctccctgaccgcaatcaccacgcaaggggaagtctcgtcctctgcaaaagctccccctctccccctccgggaccgcgcggtcgatccccgcatatgaag
 tattccttgatccccGGTACCGaaacaagagcagacaagaaaacgaaaggtgactatcgtgtccaatcccttgaggacaacgacagcgaatacctggcgct
 tgtcaacgacgaaggacaatacactctggcccgctacatcggcgctcctgagggatggcatgtagcgcaccagaaggctggccgctcaggtctgctggaatacatt
 gaggcgcaatggacggacatgctccccggagccttcccaagcggtcacgaggccacgacgcaactcagtagccggaagcatctggtcttccagattcgtgtct
 gatcaatgccctcgtgctccgcgcgagggcgcttctccctgtgagtgatgtggtcaatattggtatgaaggattcggatgacggtgacgacgtcagccacg
 agggcttgcatcctgctccgcaagaaggcgtctcttcaacggctgaagacctgggagacctaacgcatccggactacgccaagaaggaccggatcga
 acatcagcagcaatcgccgacagcaaggtcataccgaggacgacgaaccgaagcgctctctcagggacgagttcgggcccgttctgatccccaccgggccc
 aacagtgggctgcccgtactcgtgtagctccaccgcttgagaccgcatcgcatcgttcaacaacttctccccacactgaccacgaagagctgcccagggct
 ggcaactgggcccgcgaacagctcgagatccctacaccgcaacaacagctcctggctccaccggatagaagcgagttcaccacctgctacttaccctc
 gacggcaccgaccacgcaaccacaaggaaacagggcagcatgacggcgaatacctatctggcgaaccgcatggcgacgaccagcctacgcccgtctg
 aaaggggtctgtagcagcttggatctgctcgtagctgggtgacgcccgggtctctgtagggcaggagcatcggtggcgaggagggccaatcgggcgctcc
 gtctctgctgcatgactcctcaatgaggtgtgccccttggctggcgctgtgtagggcaaggtgaggccggcgtccacggcgaggaccgtagtctcgaggc
 cgttggtgaagctgacgaggtgggttagtgcaggggtgaggcggcctgacactcgtgagtttcccgtcgttgcctcggccggttttggcagggtgggaagccc
 cgtacgggatcgcaatggtgatcctccggcagggcggcagatcttccagcagggcttccctcgggcccaggttttgggggtgggtgagcagggaggcggt
 ggctggcggtgggttagtgacggagcggtgcctcggcgcccctggttaggtcgcgaccagggaggttcgctcggggtgtagccagcttcttctctccc
 agcagttGAATTC

6.3 Sequenzen und Alignments

6.3.1 Alignment von AdeA und GriE aus *Streptomyces* DSM 40835

GriE: Fe(II)/ α -Ketoglutarat-abhängige Hydroxylase aus *Streptomyces* DSM 40835 (NCBI: AKC91859). Sequenzidentität zu AdeA: 56,3% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

AdeA	VQLAKSVLDQYDRDGFVLVPGAFSPAEMDCLKGAMAEDVASSKGPLHITEDDGATLRVAV	60
GriE	MQLTADQVEKYKSDGYVLEGAFFSPEEVHVMRQALKKDQ-EVQGPRIIEEDGRTVRLAY	59
	:** : . :*: . **:**: ***** *.. : : * : * . :*** * **:* :***:	
AdeA	ASHTRHPLFSTLVSSARLLAPAMQLVAQDLYVHQFKINTKRPFGGESWAHWDYFVWRDA	120
GriE	ASHTRQSVFDQLSRSDRLGPAQLLECDLYIHQFKINTKRAFGGDSWAHWDYFVWRDT	119
	***** : . * * * **:* ** : ** :***** ** :***** : ** :	
AdeA	DRMPEPRAVNVAFLDEVTEFNGPVVFLRGSHRLGSEASSRQANQAGEHIDPHDYALST	180
GriE	DGLPAPRAVNVGVFLSDVTEFNGPVVFLSGSHQRTVERKARETSRSDQHVPDDYSMTP	179
	* : * ***** .*** . :***** ** : * : . : : : : : : : : : : : : : : : :	
AdeA	GDSLKLAIEVHEMTPKGPAGTVVFFHPEIMHGSAPNISPFPRDLLIVTYNASTNAPRPVG	240
GriE	AELSQMVEKHPMVS PKAASGSVMLFHPETI IHGSAPNISPFARDLLIITYNDVANAPKPAE	239
	: ** : : * * * .*** . : * : : ***** :***** ***** :*** :*** : * *	
AdeA	EPRPEYLVGRDVTPLVPNSWLETIGASIARAES	274
GriE	EPRPEYVIGRDTTPLVSRSGPLHEAAESRLA---	270
	***** : *** .*** . * * . . *	

6.3.2 Alignment von AdeB und GriF aus *Streptomyces* DSM 40835

GriF: Zink-abhängige Dehydrogenase aus *Streptomyces* DSM 40835 (NCBI: AKC91860). Sequenzidentität zu AdeB: 66,2% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

AdeB	VDTGDYWIHSAGIVTTWEFAAAAVLEGFGQTVSIRKLRVPEPNEGEMLVDTVYGGICG	60
GriF	--MSDRSPSVVTPGVASGGITARAAVLESFQKPLTVRQFPVPAPSPGELIVDVRVGGICG	58
	. * : * : : * * * * * . * : : : : : * * . * * : * * * * * * * * * *	

AdeB	TDLHLQQGHLPIPTPLTLGHEGLGTVRSLGAGTTVDACGATLHVGDVVMWASSISCGQCM	120
GriF	TDLHLQLGHLPIPVPVLVGLGHEGLGSIRRLGTEGLTDANGTELRIQDVTMWAASSIACGSCG	118
	***** **.*.*****::* ** : .** * : *.:*****:*. *	
AdeB	PCRQYREPTLCEARRTYGVNRSLEAGLSGAWAETILLHPGVVVVVKLPQGADELAAMSL	180
GriF	PCRQHREPTLCEARRTYGVNRQVEGDSGLFGAWSETILLHPGATVVRLPQSVDPDLAAMSL	178
	:**:*****.: .:* **:******. *:***. * *****	
AdeB	ACAGPTLVHALYERRPVRVLRGETVIVQSGSPVGLAAAAALAHMAGAEEKVILVGGPQRRLDLA	240
GriF	ACAGPTLIHALYERRPVRVLRGETVIVQSGSPVGMAAAALQLSGAAMVILLGGPQRRLDLA	238
	*****:*****:*****:*****:*****:.* **:****:*****	
AdeB	AKCGIGHHHIDIVIDGANPQQALDQARALTPGGTGADLVIECAGIPGAVAQGLTLARRGGS	300
GriF	RQCGIGDVHLNIADRSDTTSALNEAREMTRGGLGADLVIECAGVPEAVAQGVYLARRGGS	298
	:****. *:.* * :. :*:.* * * *****:* *****: *****	
AdeB	-LVVGQYTDNGDTMLNPHQIVHRQLDIHGSWAFSGAHLVEYVRLLPVLSNRFDLRSLVVP	359
GriF	YLVVGQYTDSETLFPNPHQLVYRQLEVVGSWAFTGAHLVHYVNLPSLLERFDLRLVTE	358
	*****.*:***:***:***: : *****:*****.*.*** * :***** **.	
AdeB	FPLADVRIAMEAVANGTVIKAVLQSA----- 385	
GriF	FPLGEVNDAMVAVGTGEVVKAVLESRHLPVDT 391	
	.:*. ** **..* *:*:*	

6.3.3 Alignment potentieller Enzyme für die Reduktion von (3R,5S)-3-Methyl- Δ 1-pyrrolin-5-carboxylsäure zu (2S,4R)-4-Methylprolin in verschiedenen Organismen

S.liv_P5C: Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase aus *S. lividans* TK24 (NCBI: EFD68577.1); S.coel_P5C: Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase von *S. coelicolor* A3(2) (NCBI: NP_627546.1); E.coli_ProC: Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase von *E. coli* (NCBI: P0A9L8); Nostoc_NosF: (3S,5S)-3-Methyl- Δ 1-pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase NosF von *Nostoc sp.* GSV224 (NCBI: AAF17284); S.muen_GriH: Oxidoreduktase GriH von *S. muensis* (NCBI: AKC91862.1). Sequenzidentitäten zur putativen Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase aus *S. hawaiiensis*: Sliv_P5C 92,2%; S. coel_P5C 92,2%; E.coli_ProC 35,28%; Nostoc_NosF 33,3%; S.muen_GriH 16,3% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

S.muen_GriH	--MTRRM-----RYGVVI---LPEHSWARAQDLWRNVEDLGFHDHAWTYDHLQWRWLSDR	49
Nostoc_NosF	MLEDLQIAFIGGGTMGEMIISRLLSTKIVPKADLIIV-----SDPVSARCLHLE	49
E.coli_ProC	--MEKKIGFIGCGNMGKAILGGLIASGQVLPQIIV-----YTPSPDKVAALH	46
S.liv_P5C	--MTQKVAVLGTGKIGEAALLSGMIGAGWA-PADLL-V-----TARRRERADELR	45
S.coel_P5C	--MTQKVAVLGTGKIGEAALLSGMIGAGWA-PADLL-V-----TARRRERADELR	45
S.haw_P5C	--MTQKVAVLGTGKIGEAALLSGMIRAGWT-PSDLL-V-----TARRPERAEELR	45
	:: * : : . : :	
S.muen_GriH	PWFGAIPTLTAADVTSRIGLGLTVASTKLRDPVMLAKEI-MTLDDISGGRMLCGVGS	108
Nostoc_NosF	REYGVRTTTSNIEAV---LGVSIIVLAVK---PQILAEVLGMLKDKIPPNALVISIVS	103
E.coli_ProC	DQFGINAESAQEV---QIADIIFAAVK---PGMIKVLSEITSSLNKDSLVSIAAGV	100
S.liv_P5C	ARHGVPVPTN-AEAA---KAADTLILTVK---PQDMGTLLELAPHVPADRLVISGAAGV	98
S.coel_P5C	ARHGVPVPTN-AEAA---KAADTLILTVK---PQDMGTLLELAPHVPADRLVISGAAGV	98
S.haw_P5C	TRYGVTPVPTN-PEAA---KTADTLILTVK---PQDMGTLLELAPHVPADRLVISGAAGI	98
	. * : . : * : : : . : . : *	
S.muen_GriH	PDRLLQAYELTRRQLTARYGEFIELLDSLLRQEPVVFEGTYTCRNTLLQPA-----	161
Nostoc_NosF	SISLLCQGLNHP-AV-----VRTMPNIAVQVGHGTTVWSASSVTEIQRSHQI	151
E.coli_ProC	TLDQLARALGHDRKI-----IRAMPNTPALVNAGMTSVTPNALVTPEDTADVLN	149
S.liv_P5C	PTSFFEERLAPGTPV-----VRVMTNTPALVDEAMSVISAGTHATAAHLTHTEE	147
S.coel_P5C	PTSFFEERLAPGTPV-----VRVMTNTPALVDEAMSVISAGTHATAAHLTHTEE	147
S.haw_P5C	PTAYFFEERLAPDTPV-----VRVMTNTPALVDEAMSVISAGTHATAADHLAHTEE	147
	: . : : . * . : :	
S.muen_GriH	---CL-----QRPRAPLCVAAA--GPQGM-RLAARFADIWVTMGAPNMFDEAPYADSA	208
Nostoc_NosF	TLQALGKEFATQNEHYLDMATALSAGTFVFLYIEAMIDAGVQMGLTR-----TQAQ	204
E.coli_ProC	IFRCFGAEVI-AEPMIHPVVGVSSSPAYVFMFTEAMADAVALGGMPR-----AQAY	201
S.liv_P5C	IFGAVGKTLRV-PESQDDACTALSGSGPAYFFYLVEAMTDAGILLGLPR-----DKAH	199
S.coel_P5C	IFGAVGKTLRV-PESQDDACTALSGSGPAYFFYLVEAMTDAGILLGLPR-----DKAH	199
S.haw_P5C	IFGAVGKTLRV-PESQDDACTALSGSGPAYFFYLVEAMTDAGILLGLPR-----DKAH	199
 : . . : * : * . : :	


```

S.muen_GriH      MLIKDQVAALEQTCHEVGRDPASLRLLVTG--PSIGGVLDVSGSFQDAAGTFQEVGITD      266
Nostoc_NosF      ELTLHTIAGSVELMFQTHEHPAVLRNKVTPGGVTAAGLYE----L--EKGGMRTVISNA      258
E.coli_ProC      KFCAAQAVMGS AKMLETGEHPGALKDMVCS PGGTTIEAVRV----L--EEKGFRAAVIEA      255
S.liv_P5C        DLIVQSAIGA AKMLRDSGEHPVKLRNVTSPAGTTINAIRE----L--ENHGVRAALIAA      253
S.coel_P5C       DLIVQSAIGA AKMLRDSGEHPVKLRNVTSPAGTTINAIRE----L--ENHGVRAALIAA      253
S.haw_P5C        DLIVQSAIGA AKMLRDSGEHPVKLRNVTSPAGTTINAIRE----L--ENHGVRAALIAA      253
                  : . . : ..* * : : : : : : : : : :

```

```

S.muen_GriH      LVVHWPRPDFPYRGDPAVMEDIASILPTAPGKL      299
Nostoc_NosF      VLAALSR TQQLGNIS-----              273
E.coli_ProC      MTKCMEKSEKLSKS-----              269
S.liv_P5C        LEAARDRSRELATGTKD-----              270
S.coel_P5C       LEAARDRSRELATGTKD-----              270
S.haw_P5C        LEAARDRSRALASGNS-----              270
                  : :

```

6.3.4 Alignment von AdeC mit putativen Acyl-Carrier-Proteinen verschiedener Organismen

Die gewählten Acyl-Carrier-Proteine sind Teil von Typ II-PKS, die stark reduzierte Polyenketten produzieren. Iga10: *Streptomyces sp.* MSC090213JE08 (NCBI: BAX64251); Sky16: *Streptomyces sp.* Acta 2897 (NCBI: AEA30259); SmcP: *Kitasatospora sp.* 152608 (NCBI: ALT05932); Sim-ORF2: *S. antibioticus* (NCBI: AEU17884). Sequenzidentitäten zu AdeC: Iga10 37,4%; Sky16 56,6%; SmcP 48,8%; Sim-ORF1 45,1% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Iga10      ---MTTVAPERLSRIREIIAENIDVDLDGLSDTALFIDELGADSLKLIDVLSALEMEYSI      57
AdeC       MGIEEERYDANLDRVKKIVCDRLELDEDEVTLTSLFHEEHGSDSLQSIIEILAALEADFDI      60
Sky16      MT---TSAENRTAVIKDIVCDILELEDEVTETSLFKEDHGADSLRAIEILASLEKFFSV      57
SmcP       MA---VVTPEKQLIKGIVCDILELESDEITDDSLFVEDHDADSMRLIEILSSLELNKLV      57
Sim-ORF1   MA---TMAPEDKRLVKGIVCDILELESDEITDVS LFIEDHDADSMRLIEILSSLEVNKLV      57
                  ::*::: : : * : : ** : : **::*::**::*::* . .

```

```

Iga10      VIDMNELPKMTNVEATYQVTAAGW-      83
AdeC       EIDQSQLPRMVNVKGVYEVVAETIGW-      86
Sky16      VIDQAE LGRMVNLTGVVEVVAEAAAKK      84
SmcP       TIEQSEL SRMVNLQGVYEVVGN TAR--      82
Sim-ORF1   TIEQAE LSRMVNLEGIYEVIGNIAR--      82
                  *: *:*:*:* . : * .

```

6.3.5 Alignment von AdeD mit putativen Ketosynthase- α -Untereinheiten verschiedener Organismen

Die gewählten Ketosynthase- α -Untereinheiten sind Teil von Typ II-PKS, die stark reduzierte Polyenketten produzieren. Positionen der Aminosäuren des aktiven Zentrums sind in petrol markiert. Sky18: *Streptomyces sp.* Acta 2897 (NCBI: AEA30261); Iga11: *Streptomyces sp.* MSC090213JE08 (NCBI: BAX64252); SmcKSII: *Kitasatospora sp.* 152608 (NCBI: ALT05934); Sim-ORF3: *S. antibioticus* (NCBI: AEU17885); Sky17: *Streptomyces sp.* Acta 2897 (NCBI: AEA30260). Sequenzidentitäten zu AdeD: Sky18 33,8%; Iga11 61,5%; SmcKSII 64,8%; Sim-ORF3 65,1%; Sky17 72,5% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Sky18      -----MSWPIVIGALASIGRDPEEIEFESLGGHSG      31
Iga11      -----MSTATARRRVVLTGFGVISSIGTGVEEYTAGLRAGRSG      38
SmcKSII    MPEAPGRVVRHGRVETDMGDVLA AHARPASDRVITGLGVFSSIGIGVEEFAAGLQEGRNG      60
Sim-ORF3   -----MCWSAHERPASDRVITGLGVFSSIGIGVEDFTTGLREGRSG      42
AdeD       -----MSTAALDDVSGAPLRVVLTGLGVVSSIGIGVDEFAASLRAGRSG      45
Sky17      -----MRATATSN GSAPP AHRVLTGFGVFSSIGVGAEEFAEGLRAGRSG      45
                  :.*:*..** . : . * **

```

```

Sky18      LAPLRGFDKEKFKAGHLFEIDNR-----AEPGVDTPGRATEFLLDVAVQAARDAGLGED      85
Iga11      ARPITRFDTGEGFQNTACEVPDFEPGRWIHHVPLDDMGRAGQYAVAAARMAVDDAGLTED      98
SmcKSII    VTPISVFDTAGFAHANGCEVLGFKPEEWLERWTVDELGRTSQFAVAAARMAVRDAGLTDD      120
Sim-ORF3   VSPISVFDTDGFAHANGCEVRDFKPEEWLERWSVDNLGRTSQFAVAAARMAVRDAGLTDA      102
AdeD       AGPISQFDTTGF AHSNGCEVVGFEPEQWISNLDLENVGRASRFSVAAARMAVADAGLEAE      105
Sky17      AKPITRFETEGFAHANGCEVVGFEPPDRWIRNLDIDELGPATRFVAAARMAIDHAGLDEE      105
                  *: *:. * * : . . : : * : : : * . * .***

```

Sky18	L-SEVPVLIGTGLR--EM----RSLELWWRDGDGF-----AAEQLHFQPALRARF	128
Iga11	DLGERQAVITVGTDDGESHDIIVLLEQELAAGDPEAMPVFLARRINAGRLSTVIARELRM	158
SmcKSI	GLRERRVQISIGTTDGESQDLQLAMTWVES-GPQNWDPGVTRRVGAGQLSAAVAWELGL	179
Sim-ORF3	GLHRRRVQVSIIGTTDGESQDLHLAERWVES-GPESWDPDVTRRVGAGRLSAAVAWELGL	161
AdeD	ELASQRGLVCIIGTTDGESHDLDQLVEIELRD-GHESMPTAVAGRVSPRLRSISIAQELGL	164
Sky17	YLRERRGLISIGTTDGESHDLDRLVETEINH-GPEKMDPVVARRVAPSRRLATSVAEHLRL	164
	. : * * * : * * * : *	
Sky18	GAADHTFNSNACSASLYALALAFDQLQSGSVEHVIVAGADSITEFMFGLTDAFQLEPPGR	188
Iga11	PNVEATVTTTCAAGNYSVGYGLDSIRSGEVDIALCGGADAVCRKAFALFKRFGALTDPDV	218
SmcKSI	SDAEALPLATACASAGNYAIGMGFDAIRVGDADIALCGGADAMCRKSFTAFYRLGTIAPDF	239
Sim-ORF3	RNAEALPLATACASAGNYAIGMGFDAIRVGDADIALCGGADTMCRKSFTAFYRLGTIAPDF	221
AdeD	ADVEATVIATACAAAGNYAIGSGFDVAVRTGEVDYALCGGADAIKRTFTGFYRLGTMAPDV	224
Sky17	HDVEAVTIPTACAAAGNYAIGYGYDAVRTGEVEFALCGGADAMCRKTFAGFYRLGTIAPDH	224
	. : . . . * * * . * : . . . * : * . : . . * * * : . . * : * .	
Sky18	LRPFDVDRKGTILGEGAGAVILGRTP---GDRKVYGRVRSVGMNCDAAHHTTAPDQSGVA	244
Iga11	VRPFDRKDRQGITLGEAGILVLESLESALARGARIHAEVLGYGLSCDAAHPTAPNRDRIA	278
SmcKSI	CRPFDRDRQGITLGEAGVILVLERLDSALARGARIYAEVLGYGLSCDAYHPVQPEQSSIA	299
Sim-ORF3	CRPFDRKDRQGITLGEAGVILVLERLDHALARGARIYAEVLGYGLSCDAYHPVQPEQSSIA	281
AdeD	CRPFDRKDRKILTGEAGVLMLESLESALARDARIYAEVLGYGLNCDAYHQVAPHQESVT	284
Sky17	CRPFDRKDRKILTGEAGVILVLETLESAVRRGATIYAEILGYGLNCDAAHPVAPNQSSIA	284
	**** * * * : * * * : * * . : . . . * * * * * . * : . . . : *	
Sky18	TAIRQAHTRAGVKPADVDLVMLEHGTGTPLNDEVEVRAMREVFGEHENVPLVTAIKSMTGH	304
Iga11	RGIRLALDDAGVEQEEIDFISAHGTGTKANDKTESAAIVDVYGDA--PPRTVAVKSMGLGH	336
SmcKSI	RCMRSALSDAGVRPEEVDLVSABGTGTKTNDVTESTRAREVVFSGM--PPRTVSLKSMGLGH	357
Sim-ORF3	RCMRSALADAGVRPEEVDLISABGTGTKTNDVTESTRAREVFE-E--PPRTVSLKSMGLGH	338
AdeD	RCMELALRDAGVDPQVDMISABGTGTKANDITETRAIRDVFQDQ--PPRTVSMKSMGLGH	342
Sky17	RCMELALENAGVKPDQVDLVSABGTGTKANDVTETRAVRDVYGTG--PPRTVSLKSMGLGH	342
	. : * * * * : * : * * * * * * * * * : * : * * * * * *	
Sky18	TAGSAGVLSLITALLAMAGGRIPPVTELDPEPTENISAMRLVHTTPVRADVGVQINGFGF	364
Iga11	SMGAASALGAIACGLAIEHGFIPPTINHRETD-PDCPLDVVFNRAVEADVIRVQNNSSAF	395
SmcKSI	TMGAASALGAIACSLAITHGFPVPTINHRETD-PECEIDCVPNESVPADLRVQNNGLAF	416
Sim-ORF3	TMGAASALGAIACSLAITNGFIPPTINHRETD-PECEIDCVPNESVTADLRVQNNGLAF	397
AdeD	TLGAASALAAIGCALAITNKFIPPTINHVTTD-PECQIDCVPNEAVEAELEIVQNNGMF	401
Sky17	SMGAASALAAIACALAITNDFVPTINHRETD-PECEIDCVPNEAVEAQLQIVQNNGMF	401
	. : * . * . * * * : * * . : . : * . * * * : * * * . *	
Sky18	GGLNAVAIVEAAR-----	377
Iga11	AGNNAVLILGTGYE----	409
SmcKSI	AGNNAVVLGKHRPSA---	432
Sim-ORF3	AGNNAVVLGRHQPRA---	413
AdeD	GGNNAVVLGKYKSEVAAR	420
Sky17	GGNNAVVLAKYEEQAS--	418
	. * * * * : *	

6.3.6 Alignment von AdeE mit putativen Ketosynthase- β -Untereinheiten verschiedener Organismen

Die gewählten Ketosynthase- β -Untereinheiten sind Teil von Typ II-PKS, die stark reduzierte Polypeptidketten produzieren. Positionen der Aminosäuren der inaktiven katalytischen Triade sind in petrol markiert. Sky19: *Streptomyces sp.* Acta 2897 (NCBI: AEA30262); SmcKSI: *Kitasatospora sp.* 152608 (NCBI: ALT05933); Sim-ORF2: *S. antibioticus* (NCBI: AEU17884); Iga12: *Streptomyces sp.* MSC090213JE08 (NCBI: BAX64253); Sky22: *Streptomyces sp.* Acta 2897 (NCBI: AEA30265). Sequenzidentitäten zu AdeE: Sky19 26,2%; SmcKSI 48,8%; Sim-ORF2 46,7%; Iga12 42,4%; Sky22 47,7% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sky19	-----MSELAPV-----VISGVGTALPGVTGAADLV	26
SmcKSI	-----MSNVDSAGSGLAIVGAVTSPFGIGRSVFSEGLAAGRSTERAIEQG--QGP	49
Sim-ORF2	-----MSDVNSAGPGLAIVGAVTSPFGIGREAFSEGLAERPVRHQVAVAG--EGP	49
Iga12	MTTSTATARPEATLPPGTPVITGWSAVSPYIGRAEFAAGVRAGAKTAVKADAGLGLPL	60
AdeE	---MT----VAKSGAGRRLVITRWSAISPFLGQEAFFREGIRAGRNTVHSLDABQWSAP	52
Sky22	---MS----SDTTSAVRGPVITAWSAVSPFGIGRSFAEAGMHEGGETAVPIDPEQWKVP	52
	. : * : *	
Sky19	TGPDLPAPVDPAAVLGKRGKLYKDRATQGLGCVAFDGLKDALRDDDGPQAEGARIGVV	86
SmcKSI	AGTACLVPEFDSRAVLGKKGTRMMNRVTGMAVSTMGDLLRE-VSGHR--LDP--DTTGLV	104
Sim-ORF2	AGTVCLVPDFDPRAVLGGKGRSMNRVTGLGVSTIGDLLKE-VKGER--FVP--ERTGLV	104
Iga12	SSDVCTVPGFDIQEQLGPRGTAKMDRLTALALVASDGLLLD-ADGNR--AVATDELTVGV	117
AdeE	VQQACLVPDFSVRDLGKKGTRGMDRATGLAVGVTAELLRDDDSSGSR--AVPKEGTGLV	110
Sky22	DERARLVPGFSPREVLGRKGRSMNRVTGLAVSVAVGALLDD-AERNR--LVATGERGAI	109
	. . . * * * : * * : . . * : *	

Sky19	VASNYGNVDTICRVTTIANETSRGTSPMDSPNASSNI IASEIAIRYKLGPNLTVCN	145
SmcKSI	LGTTVGSQAQSTIDFTRGSLTGERPFHVEPGLIPYAVMNGAAGQCAIWHGVKGNATLAAG	164
Sim-ORF2	LGTTVGSQAQSTIDFTRGSLTGEKPYHVEPGLIPYAVMNGAAGQCAIWHGVKGNATLAAG	164
Iga12	LGITMGSLENVDFLRQSYTNARPFYVDAGRIPFGSLNHAAGATAIRHDLKGNPTTVAGG	177
AdeE	LGTTTGSADSMMGYTRTSMQKSKPFLVDPALMPYTMVNCAGQCAIWHKLGPNATVAG	170
Sky22	LGTTTGSQAQSMDFTRDLSLTGEQPYFVDPAQMPNTVMNCAAGQCAIWHRIQGNATIAGG	169
	::..*.::: : ..* * *.**:::****::*	
Sky19	DASGLDALRWAATMLNAGRADQFLVIGVEPDNEMVRKLVGAD-----RIVDGAVAV	196
SmcKSI	RSAGLLALNYARRLLLTGRAGTVLCGAEEYSVA-RAWISERSAGNDAPGAVLGEGCAMP	223
Sim-ORF2	RAASLLALNYARRLLLTGRADTVLCGAEEYSAA-RAWIAERSAKNDAPSTALGEGCAMP	223
Iga12	RVSGLLALNYARRLMGQGRATKYLVGSAAEFSSA-HAWFEHTATASGDPAPLLGEGCGLF	236
AdeE	RSAGLLALNYARRLLASGRAERILCGAAEEFSSA-RAWIEDRRNGGTTADMLLGEGSAMF	229
Sky22	RLAGLLALNYARRLLGADRKAVLCGSAEEYSNE-RAWLEWHTRGAEHPGLGEGAGML	228
	::* **:* : : .** * ** * . : . : : : *	
Sky19	VLEREEATQ-E-----RGARIRARIDGFARTGTVEAGV-RRLRTLGDTPGGWYLPET	247
SmcKSI	ALTAEP---TDEPPLATLLAVKAMTCSDGDWYA-TIRRCIEQTVAAAGVQPCDVWMASES	279
Sim-ORF2	ALTTEP---TGRATLATLLAVKAMTCSDGDWRE-TVRRCEVEALEAADVKPSDVWVWSES	279
Iga12	LVEQAEEA--ERPPLAAVLSVETRVDI DDDPGA-AVTACARRALRRAGVDAGEVWAAVEC	293
AdeE	LIEAADETAADRMLAEIIDVRIRTHAGDRRS-TVAACVSDVLQRNGVHPDDVWAVASS	288
Sky22	LLEPAEDVD-DAHVLAELVAVESGVFGDGLPQ-VLDACLRARMDRAGVDPQVWVAVSEC	286
	: : : : : . . . *	
Sky19	AGGSEIP---ADLLAGVPRHGMPDAWGALSGVLGV-----LQCAV---AAGRF-DAGE	293
SmcKSI	GAAGAAGQAEERAALGDLFE-VGD-RLVSI TELVGTTHAASGALQLAAVLGLAERNPESAQ	337
Sim-ORF2	DPLVRPVRPSGRCSSTTSST-SVA-VVSPVTELLGTTHAAVVALQLAAVLSLAGRSPESAG	337
Iga12	AAPTAAAGRAEHEALAAVLP-ADALSRVPSMELLGTGAASASFQIAAVLAAEAADADSRG	352
AdeE	GGQTPYEDQETDALHECFSGSDIEWISVADVLCGTGAAGAAAFQIAATLSLAGLHPEAEG	347
Sky22	SAGDSLGEQERAVLTGMFG-AGALEPLANTALFGTASASVSLQIASVLALAEERTDVAG	345
	: : * : : * * * :	
Sky19	QSPVYATAGRDGDGIAGAVLCAPRGTP- 320	
SmcKSI	RLAVVT--STDESGTVAVCLLRLS---- 359	
Sim-ORF2	QPAVLT--SIDESGTVVVAVLKLS---- 359	
Iga12	RIALVC--AVDRDGAVAVAVLRLIGEQR 378	
AdeE	KVAVIT--SVDRDGIVACSLLRRTGGGNR 373	
Sky22	RVAVIT--AVERDGGAGCALLRLR---- 367	
	: : . : .* . :	

6.3.7 Alignment von AdeF mit putativen Ketoreduktasen verschiedener Organismen

Die gewählten Ketoreduktasen sind Teil von Typ II-PKS, die stark reduzierte Polyenketten produzieren. Die Co-Faktor-Bindestellen sind in lila markiert, die die Stereospezifität bestimmenden Fingerprint-Positionen in ocker und die Aminosäuren des aktiven Zentrums in petrol. SmcC6: *Kitasatospora* sp. 152608 (NCBI: ALT05968); SimJ2: *S. antibioticus* (NCBI: AAL15605); Sky26: *Streptomyces* sp. Acta 2897 (NCBI: AEA30269); Iga13: *Streptomyces* sp. MSC090213JE08 (NCBI: BAX64254). Sequenzidentitäten zu AdeF: SmcC6 56,9%; SimJ2 53,7%; Sky26 59,7%; Iga13 62% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

SmcC6	-----MHSVRRIALVGGSRGIGRAVVLRVLVNDGFDVAFCYQRGSEAAADL	47
SimJ2	-----MVHNGRGVALVTGGSRGIGRAVVLRVLVREGFDVAFCYQREAVAAADL	47
Sky26	-----MADDAKRVALVSGSRGIGRAVVKRLAAEGHDISFCYQSNSDAAMSL	47
AdeF	MSNNGMDIGPKRAAEAGTSRIALVSGSRGIGRAAVLKLARDGFDVSVFCYQSNADMAEAV	60
Iga13	-----MIALVSGSRGIGRSIVLRRLARDGHDVAFCYRSNEDAAERL	41
	:***:*****: * :*. :*. :*. :***: * :	
SmcC6	EKVAEELGGRVSHRQVNVADAAQVREWVLDVENS LGPIDVVVTSAGI VRDGPLVMMPDKD	107
SimJ2	EKVAEELGGRVAHRVVDVSDAVQVKEWVRDVESELGPVEVVVTSAGI VRDGPLVMMQDKD	107
Sky26	EKELVEFGVRVLSRKVDVASADSVRAWVGETQETLGAVDVAVTAAGI TRDNPLLMMTDEQ	107
AdeF	RKELSSLPVRTLAVQVDVANA EAVRGWVTRTQRELGPIDVLVTCAGI TRDKPLMTMSDDD	120
Iga13	AKEAAEHGTRVATATRCVDADGDDVRDWFARTERELGVPDAAVTSAGI TRDRPLVLMPEDD	101
	* . * . : :*. . * : * . : : * :. . * * ** * * * * * : : * :. .	
SmcC6	WQVDIDVNLNGTYNVCRAAVFGMLKRKSGCIVNIS SVAGVHGNSTQANYASAKAGIIGFT	167
SimJ2	WQVDIDVNLNGTFNVCRAAVFGMMKRKSGCLINLSSVAGVSGHATQSNYASAKAGIIGFT	167
Sky26	WRDVVSNLDGVYNVCRSVVFEMMKARSGSLVLISSVAGVYGHATQSNYAATKAGIIGFA	167
AdeF	WHQVLDVNL DGSYHVNRAVIVPMMKRKSGS INVS SVSGVHGNPTQTNYASAKAGIIGFS	180
Iga13	WNQVLRNL DGVYHVCRAAAF SMSKRSGAIVNLS SVAGVYGNAGQANYAASAKAGIIGFT	161
	*. : * : ** * : * * : * . * * * : * * * : * * * : * * * : * * * * * * * * * :	
SmcC6	KALSKEVGRYMVRVNAVAPGYIETDMVAGISDKLRSKAVAGVSLGRMGQPDEVADAVSYL	227
SimJ2	KSLSKELGRY GIRANVAVPGFIDTDMVAGISDGLRTKAVAGVALGRFRGPDEVADAVAYL	227
Sky26	KSLAKEVGRY GIRSNVAVPGFIEITDMTSVLGDKVRDEMLKSIPLKRFSGADEVADLVAYL	227
AdeF	KALAKEVGRFGRVNVVAPGLIETDMTEALSENARRDLLRAIPLCRFGSSEEVADLISYL	240
Iga13	KSLAKECGPRGRANVAVAPGLIETDMVGDMP EAVLHKQLKNVALGRLGRPEEVADLVSF	221
	* : * ** * * : * * * * * : * * : : . : : : * * * : * * * : * * * : * * *	

```

SmcC6      VT--ADYVTGSQLQIDGGLSI 246
SimJ2      AS--AEYVTGAVLQIDGGLSI 246
Sky26      GSERAGYITGGVFQIDGGITI 248
AdeF       ASDAASYITGSVFEIHGGITI 261
Iga13      VSERAAYITGSVFEIHGGTF 242
           : * *: ** . *: : * . ** : :

```

6.3.8 Alignment von putativen Dehydratasen des Primärstoffwechsels verschiedener Organismen

Iga16 ist eine Dehydratase der MaoC-Familie des Ishigamid-BGC in *S. sp.* MSC090213JE08, assoziiert mit einer Typ II-PKS für die Biosynthese einer stark reduzierten Polyketidkette (NCBI: BAX64257). Shaw_DH1 und Shaw_DH2 sind nicht Cluster-assoziierte, putative Dehydratasen der MaoC-Familie in *S. hawaiiensis* und ersetzen möglicherweise die fehlende Dehydratase im *ade*-BGC. Scoel_DH1 (NCBI: SCO4637) and Scoel_DH2 (NP_625972.1) sind potentielle Homologe zu Shaw_DH1 und Shaw_DH2 in *S. coelicolor* A3(2) und möglicherweise bei der heterologen Expression von ADEPs in *S. coelicolor* M1146 beteiligt. Sequenzidentitäten zu Iga16: Shaw_DH1 20,9%; Shaw_DH2 50,7%; Scoel_DH1 20,2%; Scoel_DH2 52,7% (Clustal Omega).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Shaw_DH1      ---MTAKISYADVEVGT---ELPAQTFFVTRVETLVRVYAGASGDFNPIHWNEKFAKEVGLP 54
Scoel_DH1     ---MQSKIAYS DVEVGT---ELPAQSFVDRATLVRVYAGASGDFNPIHWNERFAKEVGLP 54
Iga16        ---MRSFANLADFSAAATGEHLGYSDWLEITQHKVDQFADATGDLQWIHVDPERAAAGPFG 57
Shaw_DH2     MAEPRIFTSVDDLKSAVGEQLGYTDWLDIDQKRIDLFAEATGDHQWIHVDPERAAAGPFG 60
Scoel_DH2    MAEPRIFASADEVKAAVGEQLGYTDWLEVDQKRIDLFAEATGDHQWIHVDPERAAAGPFG 60
                                     * * * * *
Shaw_DH1     DVIAHGMFTMAEAIRVVDWTGDPGAVVEYGVRFTRPVVVPNDG-----QGAVI 103
Scoel_DH1    DVIAHGMFTMAEAIRVVDWTGDPGAVVEYGVRFTRPVVVPNDG-----RGAVI 103
Iga16       GTILHGYLTLALLPEMMRAIFDIEKIEMGVNFGLDKVRFPRPIPVGARVRGGARLTGVRE 117
Shaw_DH2    TTIAHGYLTLSSLPLFGPQLIAVEDVKMGVNYGTNKVRFPAFPVPGSRLRATATISAVDE 120
Scoel_DH2   GTIAHGYLTLSSLPLFGPQLIRVDGVMGVNYGTNKVRFPSVPVPGSRLRATAVITGVED 120
                                     * * * *
Shaw_DH1     EVAGKVAAKLDDNTVRVDLTATSAGQKVLGMSRAVVRLA-- 142
Scoel_DH1    EVSGKVAAKLDDNTVRVDLTATSAGQKVLGMSRAVVRLG-- 142
Iga16       TPAGHLAAVRMTVQVEADGQPQSACVADTSLFIAPATAGG 158
Shaw_DH2    VPGGVQVAVA--FSVEREGGDKPVCVAESVARYYF----- 153
Scoel_DH2   VKGGIQVSA--FTVEREGGDKPVCVAESVRYL----- 153
                                     * *

```

6.3.9 Das *clpP1clpP2*-Operon und *clpX* in *S. hawaiiensis*

Gensequenzen der *clpP*-Homologe *clpP1* und *clpP2* und des für die Clp-ATPase ClpX codierenden Gens *clpX* von *S. hawaiiensis*. Startcodons, die in *S. lividans* TK24 als Translationsstart bestätigt wurden, sind in grün markiert, nicht bestätigte in gelb.

>*S. hawaiiensis clpP1*

```

GTGAGACGGCCCGGCCGCTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACGTGACGAATCTGATGCCCTCAGCCGCCGGCGA
GCCTTCCATCGGTGGTGGCTCGGTGACCAGGTCTACAACCGGCTGCTCAACGAGCGGATCATCTTCTCGGCCAG
CCGGTCGACGACATCGCGAACAAGATCACCGCACAGTTGCTGCTCCTTGCTCCGACCCGGAGAAGGACATC
TACCTGTACATCAACAGCCCCGGCGTTGATCACGGCGGGCATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG
AACGACGTGGTGACCATCGCCATGGGCTGGCAGCCTCGATGGGCCAGTTCCTGCTCAGCGCGGGCACCCCGGC
AAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCTGATCCATCAGCCCTCCGCCGCTCGCCGGCTCGGCCTCGGAC
ATCAAGATCCACGCCGAGCGGTGCTGCACACCAAGAAGCGCATGGCCGAGCTGACCTCCCAGCACACCGGCCAG
ACGATCGAGCAGATACCCGCGACTCGGACCGCGACCGCTGTTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC
ATCGACGACGTGATGACGACGGCCCGGTATGCCGGGCGGGCGGGCACCCGGGGCCTGA

```

>*S. hawaiiensis clpP2*

```

GTGAACCAGTTCCTCGGCGAGCGGGATCTACGACCGTATGCACGCCGTGCAGGACATGAGCGCCTCCAGGGCCGC
TACACCGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACATCATTCCCCGCTTCGTCGAGCGCACCTCCAGGGCATCCGCGAGT
ACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGCGTGATCTTCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCCTCCGCCAACG

```

ACGTCATGGCACAGCTGCTGCTGCTGAGTTCGATGGACCCGACCGTGACATCTCGGTGTACATCAACAGCCCCG
 GCGGCTCCTTACGGCGCTCACCAGGATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACGTCCAGACGGTCTGCA
 TGGGCCAGGCGCCTCCGCCGCCGCTCTGCTGGCCGCCGTACGCCGGCAAGCGCATGGCCCTGCCGAAC
 GCGCGTGTGCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGACCGGCCGCGGTGAGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCGAA
 CGAGATCCTGCGGATGCGCTCGCAGCTGGAGGACATGCTGGCCAAGCACTCCACCACCGCGTCCGAGAAGATCC
 GCGAGGACATCGAGCGCGACAAGATCCTCAGGCCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCTGATCGACCAGGTCATC
 AGCACCCGGAAGATGGACAACCTCGAGCCTGCGCTGA

>*S. hawaiiensis clpX*

GTGGCACGCATCGGTGACGGCGGCGATCTGCTCAAGTGCTCGTTTTCGCGCAAGAGCCAGAAGCAGGTCAAGAA
 GCTCATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTGCAACGAGATCATCGAGGAAGAACT
 CGCTGAGACCAGCGAGGTCCGCTGGGAGGAGCTCCCGAAGCCTCGTGAGATCTACGAGTTCCTCGAGGGCTATGT
 GGTCCGCCAGGAGGCCGCAAGAAGGCCCTCTCCGTAGCGGTGTACAACCACTACAAGCGAGTCCAGGCCGGCG
 AGAACGGCGGGGCGAACGGCCGCGACGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCTGCTCCTCGGCCCCACG
 GGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCGCAGACCCTCGCGGCATGCTGAACGTCCCCTTCGCGATCGCCGACGCCACG
 GCCCTCACGGAGGCGGGATACGTCGCGGAGGACGTCGAGAACATCCTGCTCAAGCTGATCCAGGCGGCCGATTA
 CGACGTAAGAAGGCCGAGACCGGGATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGGAGGAAGAGTGAAAACC
 CCTCGATCACGCGGACGTCCTGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCGTCTGAAGATCCTGGAGGGCACCACCGCC
 TCGGTCCCGCCGAGGGCGGCCGTAAGCACCCACCAGGAGTTCATCCAGATCGACACGACGAACGTGCTGTTC
 ATCGTGGGCGGCGCCTTCTCCGGGCTGGAGAAGATCATCGAGTCCCGGGCCGGTGCCAAGGGCATCGGCTTCGG
 CGCGCAGATCCGCTCCAAGCGGAGATGGAGTCCAAGGACCAGTTCAGGAGGTCATGCCGGAGGATTTGGTCA
 AGTTCGGCATGATCCCGAGTTCATCGGCCGCTCCCGGTCATCACCTCGGTCCACAACCTCGACCGGAGGCGCT
 GCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGAACGCGCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTTCAACTCGACGGCGTGGA
 GCTGGACTTCGAGCGGAGGCCCTCGAGGGCATCGCCGACCAGGCCATCCTCCGCCAGACCGGCGCGCGGGCC
 TCGCGCCATCATGGAGGAGGTCTCCAGGGCGTGATGTACGAGTCCCGTCCCGCAAGGACGTGGCCCGGGTC
 GTCATCACGGCGGACGTCGTCAGTCAACGTCACCCGACGCTGATCCCGGGATGCGCGGGGACGTGGGGCC
 GGGGGAGCAGAAGACGGCCTAG

Multiples Sequenz-Alignment des *clp1clp2*-Operons und des nachfolgenden *clpX*-Gens von *S. hawaiiensis*, *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* A(3)2, *S. chartreusis* NRRL 3882 und *S. sp.* S10(2016). Die in *S. lividans* TK24 als Translationsstart bestätigten Startcodons sind in grün markiert, nicht bestätigte in gelb. Stopcodons sind rot markiert.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Sliv      GTGAGACGGCCCCGGCGCCGTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACCTGACGAATCTGATGCC 60
Scoel    GTGAGACGGCCCCGGCGCCGTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACCTGACGAATCTGATGCC 60
Schar    GTGAGACGGCCCCGGCGCCGTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACCTGACGAATCTGATGCC 60
SspS10   GTGAGACGGCCCCGGCGCCGTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACCTGACGAATCTGATGCC 60
Shaw     GTGAGACGGCCCCGGCGCCGTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACCTGACGAATCTGATGCC 60
*****

Sliv      TCAGCCGCGGGCAGCCCTCTATCGGTGGCGGCTCGGCGACCAGGTCTACAACCGACTG   120
Scoel    TCAGCCGCGGGCAGCCCTCTATCGGTGGCGGCTCGGCGACCAGGTCTACAACCGACTG   120
Schar    TCAGCCGCGGGCAGCCCTCCATCGGTGGTGGCTCGGCGACCAGGTCTACAACCGGCTG   120
SspS10   TCAGCCGCGGGCAGCCCTCTATCGGTGGCGGCTCGGCGACCAGGTCTACAACCGGCTG   120
Shaw     TCAGCCGCGGGCAGCCCTCCATCGGTGGTGGCTCGGTGACCAGGTCTACAACCGGCTG   120
*****

Sliv      CTCGGCGAGCGGATCATCTTCCTCGGCCAGCCGGTCGACGACGACATCGCCAACAAGATC   180
Scoel    CTCGGCGAGCGGATCATCTTCCTCGGCCAGCCGGTCGACGACGACATCGCCAACAAGATC   180
Schar    CTCAACGAGCGGATCATCTTCCTCGGCCAGCCGGTCGACGACGACATCGCGAACAAGATC   180
SspS10   CTCAACGAGCGGATCATCTTCCTCGGCCAGCCGGTCGACGACGACATCGCGAACAAGATC   180
Shaw     CTCAACGAGCGGATCATCTTCCTCGGCCAGCCGGTCGACGACGACATCGCGAACAAGATC   180
***

Sliv      ACCGCACAGCTGCTGCTCCTTGCCCTCCGACCCGGACAAGGACATCTTCCTGTACATCAAC   240
Scoel    ACCGCACAGCTGCTGCTCCTTGCCCTCCGACCCGGACAAGGACATCTTCCTGTACATCAAC   240
Schar    ACCGCACAGCTGCTGCTCCTTGCCCGGAACCCGGACAAGGACATCTACCTGTACATCAAC   240
SspS10   ACCGCAGAGCTGCTGCTCCTTGCCCGGACCCGGACAAGGACATCTACCTGTACATCAAC   240
Shaw     ACCGCACAGTGTGCTCCTTGCCCTCCGACCCGGAGAAGGACATCTACCTGTACATCAAC   240
*****

```

Sliv	AGCCCCGGCGGTTTCGATCACGGCCGGCATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG	300
Scoel	AGCCCCGGCGGTTTCGATCACGGCCGGCATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG	300
Schar	AGCCCCGGCGGTTTCGATCACGGCCGGTATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG	300
SspS10	AGCCCCGGCGGTTTCGATCACGGCCGGTATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG	300
Shaw	AGCCCCGGCGGTTTCGATCACGGCCGGCATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAG *****	300
Sliv	AACGACGTGGTGACGATCGCGATGGGTCTCGCGGCTCCATGGGACAGTTCCTGCTCAGC	360
Scoel	AACGACGTGGTGACGATCGCGATGGGTCTCGCGGCTCCATGGGACAGTTCCTGCTCAGC	360
Schar	AACGACGTGGTGACGATCGCCATGGGCTCGCGGCTCGATGGGACAGTTCCTGCTCAGC	360
SspS10	AACGACGTGGTGACCATCGCCATGGGTCTCGCGGCTCGATGGGACAGTTCCTGCTCAGC	360
Shaw	AACGACGTGGTGACCATCGCCATGGGCTCGCGGCTCGATGGGACAGTTCCTGCTCAGC *****	360
Sliv	GCGGGCACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCGTATCCACCAGCCC	420
Scoel	GCGGGCACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCGTATCCACCAGCCC	420
Schar	GCGGGCACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCGTATCCACCAGCCC	420
SspS10	GCGGGCACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCGTATCCACCAGCCC	420
Shaw	GCGGGCACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAACGCCGAGATTCGTATCCACCAGCCC *****	420
Sliv	TCCGCGGCTGGCCGGTTCGGCTCGGACATCAAGATCCACGCCGAGCGGCTGCTGCAC	480
Scoel	TCCGCGGCTGGCCGGTTCGGCTCGGACATCAAGATCCACGCCGAGCGGCTGCTGCAC	480
Schar	TCCGCGGCTGGCCGGTTCGGCTCGGACATCAAGATCCACGCCGAGCGGCTGCTGCAC	480
SspS10	TCCGCGGCTGGCCGGTTCGGCTCGGACATCAAGATCCACGCCGAGCGGCTGCTGCAC	480
Shaw	TCCGCGGCTGGCCGGTTCGGCTCGGACATCAAGATCCACGCCGAGCGGCTGCTGCAC *****	480
Sliv	ACCAAGCGCGCATGGCCGAGCTGACCTCCAGCACACCGGCCAGACGATCGAGCAGATC	540
Scoel	ACCAAGCGCGCATGGCCGAGCTGACCTCCAGCACACCGGCCAGACGATCGAGCAGATC	540
Schar	ACCAAGAAGCGCATGGCCGAGCTCACCGCCAGCACACCGGCCAGACGATCGAGCAGATC	540
SspS10	ACCAAGAAGCGCATGGCCGAGCTGACCTCGCAGCACACCGGCCAGTCCGTCGAGCAGATC	540
Shaw	ACCAAGAAGCGCATGGCCGAGCTGACCTCCAGCACACCGGCCAGACGATCGAGCAGATC *****	540
Sliv	ACCCGCGATTCGGACCCGACCGCTGGTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC	600
Scoel	ACCCGCGATTCGGACCCGACCGCTGGTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC	600
Schar	ACCCGCGACTTCGGACCCGACCGCTGGTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC	600
SspS10	ACCCGCGACTTCGGACCCGACCGCTGGTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC	600
Shaw	ACCCGCGACTTCGGACCCGACCGCTGGTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCTC *****	600
Sliv	ATCGACGACGTCATCGCCACGGCCCGGCGATGCCGGCGGGCGGGCACGGGCGCTGA	660
Scoel	ATCGACGACGTCATCGCCACGGCCCGGCGATGCCGGCGGGCGGGCACGGGCGCTGA	660
Schar	ATCGACGACGTCATCGCCACGGCCCGGCGATGCCGGCGGGCGGGCACGGGCGCTGA	660
SspS10	ATCGACGACGTCATCGCCACGGCCCGGCGATGCCGGCGGGCGGGCACGGGCGCTGA	660
Shaw	ATCGACGACGTCATCGCCACGGCCCGGCGATGCCGGCGGGCGGGCACGGGCGCTGA *****	660
Sliv	GCCATCCTCC-----	670
Scoel	GCCATCCTCC-----	670
Schar	GAGGGTCCACGGGCTGTGGCGCCCGTGAGGCCACGGAGCCCTCCCGGGCCCGCAGC	720
SspS10	GCGGGCCCGACGGGCTGTGGGCCCCGTGAGGCCCGCGGAGCCCTCCCGGGCCCGC-A	719
Shaw	GCGGTCCCGACGGGCTGTGGCGCCCGTGAGGCCACGGAGCCCTCCCGGGCCCGCA * * *	720
Sliv	-----GCCCCGAGCCGACCGCTCAGCCCTTTACAGGAGACACTGTGAACGA	718
Scoel	-----GCCCCGAGCCGACCGCTCAGCCCTTTACAGGAGACACTGTGAACGA	718
Schar	G-ACCCCGAGACAGCCCGACCGACCGCC-TCAGCCCTTTTACAGGAGACACTGTGAACGA	778
SspS10	GCGACCCAGCCAGCCCGACCGACCGCTCA-GCCATTTACAGGAGACACTGTGAACGA	778
Shaw	GCGACCCAGACAGCCCGACCGACCGCTCAGCCCTTTACAGGAGACACTGTGAACGA *** *****	780
Sliv	CTTCCCGGCGAGCGGCTGTACGACCGGTGAACCGCGCACAGGACATCGCGCGCGCTC	778
Scoel	CTTCCCGGCGAGCGGCTGTACGACCGGTGAACCGCGCACAGGACATCGCGCGCGCTC	778
Schar	GTTCCCGGCGAGCGGATGTACGACCGGTATGACGCGGTGCAGGACATCGG---CGCCG	835
SspS10	GTTCCCGGCGAGTGGGATGTACGACCGGTATGACGCGGTGCAGGACATGAG---CGCCTC	835
Shaw	GTTCCCGGCGAGCGGATGTACGACCGGTATGACGCGGTGCAGGACATGAG---CGCCTC *****	837
Sliv	CCAGGGCCGCTACACGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACGTATCCCGGCTTCGTGCA	838
Scoel	CCAGGGCCGCTACACGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACGTATCCCGGCTTCGTGCA	838
Schar	TCAGGGCGAGTACACGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACGTATCCCGGCTTCGTGCA	895
SspS10	GCAGGGCCGCTACACGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACATCATTCCCGGCTTCGTGCA	895
Shaw	CCAGGGCCGCTACACGGCCCGCAGGCCGAGTCCCGCTACATCATTCCCGGCTTCGTGCA *****	897
Sliv	GCGCACCTCGCAGGGCGTGCAGGATACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGGGT	898
Scoel	GCGCACCTCGCAGGGCGTGCAGGATACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGGGT	898
Schar	GCGCACCTCCAGGGCATCCGCGAGTACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGGCT	955
SspS10	GCGCACCTCCAGGGCATCCGCGAGTACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGGCT	955
Shaw	GCGCACCTCCAGGGCATCCGCGAGTACGACCCGTACGCGAAGCTCTTCGAGGAGCGGCT *****	957

Sliv	GATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCTCGGCCAACGACGTCATGGCGCAGCTGCT	958
Scoel	GATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCTCGGCCAACGACGTCATGGCGCAGCTGCT	958
Schar	GATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCTCGGCCAACGACGTCATGGCGCAGCTGCT	1015
SspS10	GATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCTCGGCCAACGACGTCATGGCGCAGCTGCT	1015
Shaw	GATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCTCGGCCAACGACGTCATGGCGCAGCTGCT *****	1017
Sliv	GTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGGGACATCTCGGTCTACATCAACAGCCCGGCGG	1018
Scoel	GTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGGGACATCTCGGTCTACATCAACAGCCCGGCGG	1018
Schar	GTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGGTGACATCTCGGTCTACATCAACAGCCCGGCGG	1075
SspS10	GTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGGTGACATCTCGGTCTACATCAACAGCCCGGCGG	1075
Shaw	GTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGGTGACATCTCGGTGTACATCAACAGCCCGGCGG *****	1077
Sliv	CTCCTTACCCGCGCTCACGGCCATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACGTCCA	1078
Scoel	CTCCTTACCCGCGCTCACGGCCATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACGTCCA	1078
Schar	CTCCTTACCCGCGCTCACTGCGATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACATCCA	1135
SspS10	CTCCTTACCCGCGCTCACGGCGATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACGTCCA	1135
Shaw	CTCCTTACCCGCGCTCACCGCATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGACGTCCA *****	1137
Sliv	GACGGTCTGCATGGGCCAGGCCGCTCCGCCGCGCGCTCCTGCTGGCCGCGGTACGCC	1138
Scoel	GACGGTCTGCATGGGCCAGGCCGCTCCGCCGCGCGCTCCTGCTGGCCGCGGTACGCC	1138
Schar	GACGGTCTGCATGGGCCAGGCCGCTCCGCCGCGCGCTCCTGCTGGCCGCGGTACGCC	1195
SspS10	GACGGTCTGCATGGGCCAGGCCGCTCCGCCGCGCGCTCCTGCTGGCCGCGGTACGCC	1195
Shaw	GACGGTCTGCATGGGCCAGGCCGCTCCGCCGCGCGCTCCTGCTGGCCGCGGTACGCC *****	1197
Sliv	GGGCAAGCGCATGGCGCTGCCGAACGCCGCGTCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGAC	1198
Scoel	GGGCAAGCGCATGGCGCTGCCGAACGCCGCGTCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGAC	1198
Schar	GGGCAAGCGCATGGCCCTGCCGAACGCCGCGTCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGAC	1255
SspS10	GGGCAAGCGCATGGCCCTGCCGAACGCCGCGTCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGAC	1255
Shaw	GGGCAAGCGCATGGCCCTGCCGAACGCCGCGTCTGATCCACCAGCCGTACAGCGAGAC *****	1257
Sliv	CGGCCCGGTCAGGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCCAACGAGATCCTCCGGATGCGCTC	1258
Scoel	CGGCCCGGTCAGGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCCAACGAGATCCTCCGGATGCGCTC	1258
Schar	CGGCCCGGCCAGGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCCAACGAGATCCTCCGGATGCGCAC	1315
SspS10	CGGCCCGGTCAGGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCCAACGAGATCCTCCGGATGCGCTC	1315
Shaw	CGGCCCGGTCAGGTCTCCGACCTGGAGATCGCCGCCAACGAGATCCTCCGGATGCGCTC *****	1317
Sliv	GCAGCTGGAGGAGATGCTGGCCAAGCACTCCACCACGCCGTCGAGAAGATCCGCGAGGA	1318
Scoel	GCAGCTGGAGGAGATGCTGGCCAAGCACTCCACCACGCCGTCGAGAAGATCCGCGAGGA	1318
Schar	GCAGCTGGAGGAGATGCTGGCCAAGCACTCCACCACGTCGATCGACAAGATCCGCGAGGA	1375
SspS10	GCAGCTGGAGGAGATGCTGGCCAAGCACTCCACCACGCCGTCGAGAAGATCCGCGAGGA	1375
Shaw	GCAGCTGGAGGAGATGCTGGCCAAGCACTCCACCACGCCGTCGAGAAGATCCGCGAGGA *****	1377
Sliv	CATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGGCCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCTGATCGACCA	1378
Scoel	CATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGGCCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCTGATCGACCA	1378
Schar	CATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGGCCGAGGACGCGCTGAACCTACGGCCTGATCGACCA	1435
SspS10	CATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGGCCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCTGATCGACCA	1435
Shaw	CATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGGCCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCTGATCGACCA *****	1437
Sliv	GATCATCACCACCCGGAAGATGGACAACCTCTCTCCGC-TAGGCAAGAGGCTGTATCG	1437
Scoel	GATCATCACCACCCGGAAGATGGACAACCTCTCTCCGC-TAGGCAAGAGGCTGTATCG	1437
Schar	GATCATCACCACCCGGAAGATGGACAACCTCGAGCCTGCGCTGAGGCGAGAGGCTGTATCG	1495
SspS10	GGTCATCAGCACCCCGGAAGATGGACAACCTCGAGCCTGCGCTGAGGCGAGAGGCTGTATCG	1495
Shaw	GGTCATCAGCACCCCGGAAGATGGACAACCTCGAGCCTGCGCTGAGGCGAGAGGCTGTATCG * *****	1497
Sliv	TCTGCCGCTCCTTGGCACGGTTTGGACGCGATTACAGTCAAAGGGAACCGTGCCAAGGGGG	1497
Scoel	TCTGCCGCTCCTTGGCACGGTTTGGACGCGATTACAGTCAAAGGGAACCGTGCCAAGGGGG	1497
Schar	TCTGCCGCCCCCTTGGCACGGTTTGGCACGGTCCACGTCAAAGTGAACCGGCCAAGGGGG	1555
SspS10	TCTGCCGCCCCCTTGGCATGGTTTGGCTCGGTTACAGTCAAAGGGAACCGTGCCAAGGGGG	1555
Shaw	TCTGCCGCCCCCTTGGCATGGTTTGGCTCGGTTACAGTCAAAGGGAACCGTGCCAAGGGGG *****	1557
Sliv	GCCCGGACGAGGGGGCCCGCAAGGTACCGTCGGACATAAGGCAGCACCAGGAGTCCGCC	1557
Scoel	GCCCGGACGAGGGGGCCCGCAAGGTACCGTCGGACATAAGGCAGCACCAGGAGTCCGCC	1557
Schar	GCCCGAACGGGGGGCCCGCAAGGTACCGTCGGACATAAGGCAGCACCAGGAGTCCGCTG	1615
SspS10	GC-CGGACGGGTGGCCCGCAAGGTACCGTCGGACATAAGGCAGCACCAGGAGTCCGCTG	1614
Shaw	GCCCGACGAGGGGGCCCGCAAGGTACCGTCGGACATAAGGCAGCACCAGGAGTCCGCTG ** * * * * *****	1617
Sliv	GCCGTTGACGTGACGTGACGTCGAGCTCCGGGAGTCTCCAGGCGAAGGGGAAGCACACC	1617
Scoel	GCCGTTGACGTGACGTGACGTCGAGCTCCGGGAGTCTCCAGGCGAAGGGGAAGCACACC	1617
Schar	GAC-----GTCGGCGTCCAGGAGTCTCCAGGCGAAGGGGAAGCACACC	1664
SspS10	GAC-----GTCGACGTCCAGGAGTCTCCAGGCGAAGGGGAAGCACACC	1663
Shaw	GAC-----GTTGACGTCCAGGAGTCTCCAGGCGAAGGGGAAGCACACC * * * * * *****	1666

Sliv	ACGCATCGGTGACGGCGGCATCTGCTCAAGTGTCTGTTCTGCGGGAAGAGCCAGAAGCA	1677
Scoel	ACGCATCGGTGACGGCGGCATCTGCTCAAGTGTCTGTTCTGCGGGAAGAGCCAGAAGCA	1677
Schar	ACGCATCGGTGACGGCGGCATCTGCTCAAGTGTCTGTTCTGCGGGAAGAGCCAGAAGCA	1724
SspS10	ACGCATCGGTGACGGCGGCATCTGCTCAAGTGTCTGTTCTGCGGGAAGAGCCAGAAGCA	1723
Shaw	ACGCATCGGTGACGGCGGCATCTGCTCAAGTGTCTGTTCTGCGGGAAGAGCCAGAAGCA *****	1726
Sliv	GGTCAAGAAGTCTATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTG	1737
Scoel	GGTCAAGAAGTCTATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTG	1737
Schar	GGTCAAGAAGTCTATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTG	1784
SspS10	GGTCAAGAAGTCTATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTG	1783
Shaw	GGTCAAGAAGTCTATCGCAGGGCCCGGTGTGTACATCTGCGACGAGTGCATCGACCTCTG *****	1786
Sliv	CAACGAGATCATCGAGGAGGAGCTGGCCGAGACCAGCGAGGTGCGCTGGGAGGAGCTCCC	1797
Scoel	CAACGAGATCATCGAGGAGGAGCTGGCCGAGACCAGCGAGGTGCGCTGGGAGGAGCTCCC	1797
Schar	CAACGAGATCATCGAGGAGGAGCTGGCCGAGACCAGCGAGGTGCGCTGGGAGGAGCTCCC	1844
SspS10	CAACGAGATCATCGAGGAGGAGCTGGCCGAGACCAGCGAGGTGCGCTGGGAGGAGCTCCC	1843
Shaw	CAACGAGATCATCGAGGAGGAGCTGGCCGAGACCAGCGAGGTGCGCTGGGAGGAGCTCCC *****	1846
Sliv	CAAGCCCCGCGAGATCTACGAGTTCCTCGAGAGCTACGTGGTCGGCCAGGAGGCGGCCAA	1857
Scoel	CAAGCCCCGCGAGATCTACGAGTTCCTCGAGAGCTACGTGGTCGGCCAGGAGGCGGCCAA	1857
Schar	GAAGCCCCGCGAGATCTACGAGTTCCTCGAGGCTACGTGGTCGGCCAGGAGGCGGCCAA	1904
SspS10	GAAGCCCCGCGAGATCTACGAGTTCCTCGAGGCTACGTGGTCGGCCAGGAGGCTGCCAA	1903
Shaw	GAAGCCTCGTGAGATCTACGAGTTCCTCGAGGCTATGTGGTCGGCCAGGAGGCGGCCAA *****	1906
Sliv	GAAGGCCCTCTCCGTGCGGTGTACAACCACTACAAGCGGGTCCAGGCCGGCGAGAACGG	1917
Scoel	GAAGGCCCTCTCCGTGCGGTGTACAACCACTACAAGCGGGTCCAGGCCGGCGAGAACGG	1917
Schar	GAAGGCCCTCTCCGTGCGGTGTACAACCACTACAAGCGGGTCCAGGCCGGCGAGAACGG	1964
SspS10	GAAGGCCCTCTCCGTGCGGTGTACAACCACTACAAGCGGGTCCAGGCCGGCGAGAACGG	1963
Shaw	GAAGGCCCTCTCCGTGCGGTGTACAACCACTACAAGCGAGTCCAGGCCGGCGAGAACGG *****	1966
Sliv	CGGCGCCCAAGGCCGAGGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCCTCCTGCTGGG	1977
Scoel	CGGCGCCCAAGGCCGAGGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCCTCCTGCTGGG	1977
Schar	CGGGCGCAAGGCCGAGGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCCTCCTCCTCGG	2024
SspS10	TGGGGCGAAGGCCGAGGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCCTCCTCCTCGG	2023
Shaw	CGGGCGCAAGGCCGAGGACGCCATCGAGTTGGCGAAGTCCAACATCCTCCTCCTCGG * * * * *	2026
Sliv	CCCCACGGGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCCAGACCCTCGCCCGCATGCTGAACGTCCC	2037
Scoel	CCCCACGGGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCCAGACCCTCGCCCGCATGCTGAACGTCCC	2037
Schar	CCCCACGGGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCCAGACCCTCGCCCGCATGCTGAACGTCCC	2084
SspS10	CCCCACGGGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCCAGACCCTCGCCCGCATGCTGAACGTCCC	2083
Shaw	CCCCACGGGCTCCGGCAAGACCCTCCTCGCCAGACCCTCGCCCGCATGCTGAACGTCCC *****	2086
Sliv	GTTCGCGATCGCCGACGCCACGGCGCTCACCGAGGCGGGGTACGTGCGCGAGGACGTGCA	2097
Scoel	GTTCGCGATCGCCGACGCCACGGCGCTCACCGAGGCGGGGTACGTGCGCGAGGACGTGCA	2097
Schar	CTTCGCGATCGCCGACGCCACGGCCCTGACGGAGGCGGGTACGTGCGCGAGGACGTGCA	2144
SspS10	CTTCGCGATCGCCGACGCCACGGCCCTCACGGAGGCGGGTACGTGCGCGAGGACGTGCA	2143
Shaw	CTTCGCGATCGCCGACGCCACGGCCCTCACGGAGGCGGGTACGTGCGCGAGGACGTGCA *****	2146
Sliv	GAACATCCTGCTGAAGCTGATCCAGGCCCGGACTACGACGTCAAGAAGGCCGAGACCGG	2157
Scoel	GAACATCCTGCTGAAGCTGATCCAGGCCCGGACTACGACGTCAAGAAGGCCGAGACCGG	2157
Schar	GAACATCCTCCTCAAGCTGATCCAGGCCCGGACTACGACGTCAAGAAGGCCGAGACCGG	2204
SspS10	GAACATCCTGCTGAAGCTGATCCAGGCCCGGACTACGACGTCAAGAAGGCCGAGACCGG	2203
Shaw	GAACATCCTGCTGAAGCTGATCCAGGCCCGGATTACGACGTCAAGAAGGCCGAGACCGG *****	2206
Sliv	GATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGCGGAAGAGTGAGAACCCCTCCATCAC	2217
Scoel	GATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGCGGAAGAGTGAGAACCCCTCCATCAC	2217
Schar	GATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGCGGAAGAGTGAGAACCCCTCCATCAC	2264
SspS10	GATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGCGGAAGAGTGAGAACCCCTCCATCAC	2263
Shaw	GATCATCTACATCGACGAGATCGACAAGGTGCGCGGAAGAGTGAGAACCCCTCCATCAC *****	2266
Sliv	GCGCGACGTGTCGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCCCTGCTGAAGATCCTGGAGGGCACCAC	2277
Scoel	GCGCGACGTGTCGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCCCTGCTGAAGATCCTGGAGGGCACCAC	2277
Schar	GCGCGACGTGTCGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCCCTGCTGAAGATCCTGGAGGGCACCAC	2324
SspS10	GCGCGACGTGTCGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCCCTGCTGAAGATCCTGGAGGGCACCAC	2323
Shaw	GCGCGACGTGTCGGGCGAGGGCGTCCAGCAGGCCCTGCTGAAGATCCTGGAGGGCACCAC *****	2326
Sliv	CGCCTCCGTCCC GCCAGGGCGGCCGCAAGCACCCGCACCAGGAGTTCATCCAGATCGA	2337
Scoel	CGCCTCCGTCCC GCCAGGGCGGCCGCAAGCACCCGCACCAGGAGTTCATCCAGATCGA	2337
Schar	GGCCTCGTCCC GCCAGGGCGGCCGCAAAACCCGCACCAGGAGTTCATCCAGATCGA	2384
SspS10	GGCCTCGTCCC GCCAGGGCGGCCGCAAGCACCCGCACCAGGAGTTCATCCAGATCGA	2383
Shaw	CGCCTCCGTCCC GCCAGGGCGGCCGTAAGCACCCGCACCAGGAGTTCATCCAGATCGA *****	2386

Sliv	CACGACGAACGTGCTGTTTCATCGTGGGCGGTGCCTTCGCGGGCCTGGAGAAGATCATCGA	2397
Scoel	CACGACGAACGTGCTGTTTCATCGTGGGCGGTGCCTTCGCGGGCCTGGAGAAGATCATCGA	2397
Schar	CACGACGAACGTGCTGTTTCATCGTGGGCGGTGCCTTCGCGGGCCTGGAGAAGATCATCGA	2444
SspS10	CACGACGAACGTGCTGTTTCATCGTGGGCGGTGCCTTCGCGGGCCTGGAGAAGATCATCGA	2443
Shaw	CACGACGAACGTGCTGTTTCATCGTGGGCGGTGCCTTCGCGGGCCTGGAGAAGATCATCGA *****	2446
Sliv	GGGCCGGGCGGCCAAGGGCATCGGCTTCGGTGCAGATCCGCTCCAAGCGGGAGAT	2457
Scoel	GGGCCGGGCGGCCAAGGGCATCGGCTTCGGTGCAGATCCGCTCCAAGCGGGAGAT	2457
Schar	GTCCCGGGCGGCCAAGGGCATCGGCTTCGGTGCAGATCCGCTCCAAGCGGGAGAT	2504
SspS10	GTCCCGGGCGGCCAAGGGCATCGGCTTCGGTGCAGATCCGCTCCAAGCGGGAGAT	2503
Shaw	GTCCCGGGCGGCCAAGGGCATCGGCTTCGGTGCAGATCCGCTCCAAGCGGGAGAT * ** * * * * *	2506
Sliv	CGAGTCCAAGGACAGTTCGAGCAGGTCATGCCGAGGACCTGGTCAAGTTCGGCATGAT	2517
Scoel	CGAGTCCAAGGACAGTTCGAGCAGGTCATGCCGAGGACCTGGTCAAGTTCGGCATGAT	2517
Schar	GGAGTCCAAGGACAGTTCGAGCAGGTCATGCCGAGGACCTGGTCAAGTTCGGCATGAT	2564
SspS10	GGAGTCCAAGGACAGTTCGAGCAGGTCATGCCGAGGACCTGGTCAAGTTCGGCATGAT	2563
Shaw	GGAGTCCAAGGACAGTTCGAGCAGGTCATGCCGAGGACCTGGTCAAGTTCGGCATGAT *****	2566
Sliv	CCCCGAGTTCATCGGCCGGCTGCCGTCATCACCTCCGTCACCAACCTCGACCGGAGGC	2577
Scoel	CCCCGAGTTCATCGGCCGGCTGCCGTCATCACCTCCGTCACCAACCTCGACCGGAGGC	2577
Schar	CCCCGAGTTCATCGGCCGGCTGCCGTCATCACCTCCGTCACCAACCTCGACCGGAGGC	2624
SspS10	CCCCGAGTTCATCGGCCGGCTGCCGTCATCACCTCCGTCACCAACCTCGACCGGAGGC	2623
Shaw	CCCCGAGTTCATCGGCCGGCTGCCGTCATCACCTCCGTCACCAACCTCGACCGGAGGC *****	2626
Sliv	GCTCCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGCAACGCCCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTT	2637
Scoel	GCTCCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGCAACGCCCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTT	2637
Schar	CCTGCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGCAACGCCCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTT	2684
SspS10	CCTGCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGCAACGCCCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTT	2683
Shaw	GCTCCTCCAGATCCTGGTCGAGCCGCGCAACGCCCTCGTCAAGCAGTACGAGCGCCTCTT * * * * *	2686
Sliv	CGAACTCGACGGCGTGGAGCTGGACTTCGAGCGCGAGGCCCTGGAGGCCATCGCCGACCA	2697
Scoel	CGAACTCGACGGCGTGGAGCTGGACTTCGAGCGCGAGGCCCTGGAGGCCATCGCCGACCA	2697
Schar	CGAACTCGACGGCGTGGAGCTGGACTTCGAGCGCGAGGCCCTGGAGGCCATCGCCGACCA	2744
SspS10	CGAACTCGACGGCGTGGAGCTGGACTTCGAGCGCGAGGCCCTGGAGGCCATCGCCGACCA	2743
Shaw	CGAACTCGACGGCGTGGAGCTGGACTTCGAGCGCGAGGCCCTGGAGGCCATCGCCGACCA *****	2746
Sliv	GGCGATCCTGCGCCAGACCGGCGCCCGCGGCTGCGCGCCATCATGGAGGAAGTCTTCCA	2757
Scoel	GGCGATCCTGCGCCAGACCGGCGCCCGCGGCTGCGCGCCATCATGGAGGAAGTCTTCCA	2757
Schar	GGCCATCCTCCGCCAGACCGGCGCGCGGCTGCGCGCCATCATGGAGGAGTCTTCCA	2804
SspS10	GGCCATCCTCCGCCAGACCGGCGCGCGGCTGCGCGCCATCATGGAGGAAGTCTTCCA	2803
Shaw	GGCCATCCTCCGCCAGACCGGCGCGCGGCTGCGCGCCATCATGGAGGAGTCTTCCA * * * * *	2806
Sliv	GGGCGTCATGTACGAGTCCCTCCCGCAAGGACGTCGCCCGGTCGTCATCACCGCCGA	2817
Scoel	GGGCGTCATGTACGAGTCCCTCCCGCAAGGACGTCGCCCGGTCGTCATCACCGCCGA	2817
Schar	GGGCGTGTATGTACGAGTCCCGTCCCGCAAGGACGTCGCCCGGTCGTCATCACCGCCGA	2864
SspS10	GGGCGTGTATGTACGAGTCCCGTCCCGCAAGGACGTCGCCCGGTCGTCATCACCGCCGA	2863
Shaw	GGGCGTGTATGTACGAGTCCCGTCCCGCAAGGACGTCGCCCGGTCGTCATCACCGCCGA *****	2866
Sliv	CGTGGTCTCTCCAACGTCAACCCGACGCTGATCCCCGGGATTCGCGGGGCGGGGCC	2877
Scoel	CGTGGTCTCTCCAACGTCAACCCGACGCTGATCCCCGGGATTCGCGGGGCGGGGCC	2877
Schar	CGTCGTCCAGTCAACGTCAACCCGACGCTGATCCCCGGGATTCGCGGGGCGGGGCC	2924
SspS10	CGTCGTCCAGTCAACGTCAACCCGACGCTGATCCCCGGGATTCGCGGGGCGGGGCC	2923
Shaw	CGTCGTCCAGTCAACGTCAACCCGACGCTGATCCCCGGGATTCGCGGGGACGTGGGCC * * * * *	2926
Sliv	GGGCGAGCAGAAGACGGCGTAG	2899
Scoel	GGGCGAGCAGAAGACGGCGTAG	2899
Schar	GGGCGAGCAGAAGACGGCGTAG	2946
SspS10	GGGCGAGCAGAAGACGGCGTAG	2945
Shaw	GGGGGAGCAGAAGACGGCCAG *****	2948

6.3.10 Das *clp3clp4*-Operon und *popR* in *S. hawaiiensis*

Gensequenzen der *clpP*-Homologe *clp3* und *clp4* und des für den Transkriptionsregulator PopR codierenden Gens *popR* von *S. hawaiiensis*.

>*S. hawaiiensis clp3*

ATGACTCCACTGACGGCACTCGCCCCAGGGCGGAGGAGGGCGACACCCCTCCGACCCGGTTCGACGACCAACTG
GCCGCACAGCTGCTCGCGCAGCGCATCGTGCTGCTGGGCATCCAGGTCGACGAGGTCTCCGGAACCGGGTCTGC
TCCAGTTGCTCATCTGTCCGCGGAGGACGCGCACACCGACATCAGCTGTACATCAACAGTCCGGGCGGGCGG
GTGCACGCGGGCTCGCCATCTACGACACGATGCGGCTCATCCCGAACGACGCTCCACGCTGGCCATGGGCTT

GCGGCCAGCATGGGCCAGTTCCTGCTGAGCGTGGCGCGCCGGGCAAGCGCTACGCCCTGCCGAACGCGCGGAT
 CATGATGCACCAGCCGTGCGCGGGCATCGGCGGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGCAGAACCTGGAGT
 TCACCAAGCGGACCATCGAGCGGATCACCGCCGAGCACCCGGCCAGAGCCCGGAGAATCTCCCGGGACGGC
 GACCGGGACCCTGTTACGCGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGCATGGTGGACCGGGTCGTGGAGTCCCTCTC
 CGACGTCCGcCCGGCCGCGACGCGACGACGAGGATGGGGCTGCAGTGA

>*S. hawaiiensis clpP4*

ATGGGGACGTACACGATTCCGAACGTATCGAGCGGACCCCGCAGGGCGAGCGCTCCTTCGACGTCTTCAGCCGG
 CTGCTCAACGAGCGGATCATCTTCTCGGCACCGAGATCGACGACGGCGTCGCCAACGTGTCATCGCCAGCTCC
 TCCACCTGGAGTCGTGTCCTCCGAGAGCGAGATCGCGATCTACCTCAACTCCCGGGCGGCTCCTTCACTTCGCT
 CATGGCCATCTACGACACCATGACGTTCTGTGACGGCGCCGATCTCCACGTTCTGCGTCGGGACGCGCCTCCAC
 GCGCGCCGTGCTGCTGGCCGGCGGGACCCGGGGCGGGCGTTCTGCTGGAGCACTCACGGGTGCTGCTCGGC
 CAGCCGCGCGGGGCGGGCAGCGCGGCATGGTGTCCGACCTCGCGCTCCAGGCCAAGGAGATGGTGC GGATCC
 GCTCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCGGCACACCCACCACGACGTGCCGACGCTGCGCGCCGACATGGACCGC
 GACAAGGTGTTACCGCACAGGAGGGCGGTGGCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTCAGCCGGCGCCTCGTGA
 GGTGTGA

>*S. hawaiiensis popR*

GTGACCAGCCACCTGCCGAACGAAGCCCGAGTCATCCGCTGCGCCCGCACGGCGCGCTCCACCGGCGCACCG
 CCGCGCCAGGCGCCGCGCCCGCCCGCGTGAAGGAGCCGCTGTGGCGGGACCTGGTGGGCGACGTCTGCGCC
 GTGAACGCTCGCGCAGGAGCGCACGTTGAAGGACGTGCGCGACGAGGCGCGGATCTCCATGCCCTACCTCTCCG
 AGGTGGAGCGCGGCCGAAGGAGGCCTCTCCGAGTCTCGCGGCCCGCCACGCCCTCGGACTGAACCTC
 GCGACCTGCTGACGAGGGCGCAGGGCGAACTGACCCGCTCACGTGCGGCTACGCGGGCGGCAGCCGCCGCG
 GGGCGGCCACCTCGTCGACGACGGAATGTGCTGGCCGCTGA

Multiples Sequenz-Alignment des *clp3clp4*-Operons und des nachfolgenden *popR*-Gens von *S. hawaiiensis*, *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* A(3)2, *S. chartreusis* NRRL 3882 und *S. sp.* S10(2016). Startcodons sind grün markiert, Stopcodons rot.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Scoel   ATGCTCTCCATTACCCGCGGCCCGCCCGCCCGCCGCGCCGAACGCCAGGGCCGAGGAGGGCGAC   60
Sliv    ATGCTCTCCATTACCCGCGGCCCGCCCGCCCGCCGCGCCGAACGCCAGGGCCGAGGAGGGCGAC   60
Schar   -----ATGACTCCAATCAGCACACTCGCCCGGGCGGAGGAGGGCGAC   45
SspS10  -----ATGACTCCAATCAGCACACTCGCCCGGGCGGAGGAGGGCGAC   45
Shaw    -----ATGACTCCAATGACGGCACTCGCCCGGGCGGAGGAGGGCGAC   45
          **      * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Scoel   ACCCCCGCGACCCGGTTCGACGACCCGGTTCGCCGAGCAGCTGCTCGACCAGCGGATCGTG   120
Sliv    ACCCCCGCGACCCGGTTCGACGACCCGGTTCGCCGAGCAGCTGCTCGACCAGCGGATCGTG   120
Schar   ACCCTTCGACCCGGTTCGACGACCATCTGGCCGCCAGCTGCTCGCACAGCGCATCGTG   105
SspS10  ACCCTTCGACCCGGTTCGACGACCATCTGGCCGCCAGCTGCTCGCGCAGCGCATCGTG   105
Shaw    ACCCTTCGACCCGGTTCGACGACCAACTGGCCGACAGCTGCTCGCGCAGCGCATCGTG   105
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Scoel   CTCTCGGCACGCAGGTCGACGAGGTCCTCCGCAACCGGGTCTGCGCGCAGCTGCTGATC   180
Sliv    CTCTCGGCACGCAGGTCGACGAGGTCCTCCGCAACCGGGTCTGCGCGCAGCTGCTGATC   180
Schar   CTGCTGGGCACGCAGGTTGACGAGGTCCTCCGCAACCGGGTCTGCGCCAGTTGCTGATC   165
SspS10  CTGCTGGGCACCCAGGTCGACGAGGTCCTCCGCAACCGGGTCTGCTCCAGTTGCTCGTC   165
Shaw    CTGCTGGGCACCCAGGTCGACGAGGTCCTCCGCAACCGGGTCTGCTCCAGTTGCTCATC   165
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Scoel   CTGTCCGCACAGGACCCGCGCACCGACATCAGCCTGTACGTCAACAGCCCGCGGGCTCC   240
Sliv    CTGTCCGCACAGGACCCGCGCACCGACATCAGCCTGTACGTCAACAGCCCGCGGGCTCC   240
Schar   CTCTCCGCGGAGGACCCGCGCACCGACATCAGCCTGTACATCAACAGCCCGGGTGGGGG   225
SspS10  CTGTCCGCGGAGGACCCACACCGACATCAGCCTGTACATCAACAGCCCGGGCGGGGG   225
Shaw    CTGTCCGCGGAGGACCGCACACCGACATCAGCCTGTACATCAACAGTCCGGGGCGGGCG   225
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
Scoel   GTGCACGCGGGGCTCGCCATCTACGACACCATGCGGGTGTATCCCAACGACGTCTCGACG   300
Sliv    GTGCACGCGGGGCTCGCCATCTACGACACCATGCGGGTGTATCCCAACGACGTCTCGACG   300
Schar   GTGCACGCGGGGCTCGCCATCTACGACACCATGCGGGTGTATCCCGAACGACGTCTCGACC   285
SspS10  GTGCACGCGGGCTCGGATCTACGACACCATGCGGGTGTATCCCAACGACGTCTCCACG   285
Shaw    GTGCACGCGGGCTCGCCATCTACGACACCATGCGGGTGTATCCCGAACGACGTCTCCACG   285
          ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Scoel	CTCGCCATGGGCTTCGCCGCCAGCATGGGGCAGTTCCTGCTGAGCGTCGGCACCGCGGGC	360
Sliv	CTCGCCATGGGCTTCGCCGCCAGCATGGGGCAGTTCCTGCTGAGCGTCGGCACCGCGGGC	360
Schar	CTGGCCATGGGCTTCGCCGCCAGCATGGGGCAGTTCCTGCTGAGCGTCGGCGCGCGGGC	345
SspS10	CTGGCCATGGGCTTCGCCGCCAGCATGGGGCAGTTCCTGCTGAGCGTCGGCACCGCGGGC	345
Shaw	CTGGCCATGGGCTTCGCCGCCAGCATGGGGCAGTTCCTGCTGAGCGTCGGCGCGCGGGC ** ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	345
Scoel	AAGCGTACGGCTGCCGAACGCGGGATCATGATGCACCAGCCCTCGGCGGGCATCGGC	420
Sliv	AAGCGTACGGCTGCCGAACGCGGGATCATGATGCACCAGCCCTCGGCGGGCATCGGC	420
Schar	AAGCGTACGCCCTGCCGAACGCGGGATCATGATGCACCAGCCCTCGGCGGGCATCGGC	405
SspS10	AAACGTACGCCCTGCCGAACGCGGGATCATGATGCACCAGCCCTCGGCGGGCATCGGC	405
Shaw	AAGCGTACGCCCTGCCGAACGCGGGATCATGATGCACCAGCCCTCGGCGGGCATCGGC ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	405
Scoel	GGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGGACAACCTGGACTTCACCAAGCGGACCATC	480
Sliv	GGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGGACAACCTGGATTTCACCAAGCGGACCATC	480
Schar	GGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGGAGAACCTGGAGTTCACCAAGCGGACCATC	465
SspS10	GGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGGAGAACCTGGAGTTCACCAAGCGGACCATC	465
Shaw	GGCACCACCGCCGACATCGAGATCCAGGCGGAGAACCTGGAGTTCACCAAGCGGACCATC ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	465
Scoel	GAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGTACAGACCCCGAGACCCTCTCCCGGACGCGCGAC	540
Sliv	GAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGTACAGACCCCGAGACCCTCTCCCGGACGCGCGAC	540
Schar	GAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGCCAGAGCCCGAGACGATCTCCCGGACGCGCGAC	525
SspS10	GAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGTACAGACCCCGAGACCCTCTCCCGGACGCGCGAC	525
Shaw	GAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGCCAGAGCCCGAGAACATCTCCCGGACGCGCGAC ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	525
Scoel	CGCGACCGCTGGTTCACGGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGAAATGGTGGACCGGTCTGTG	600
Sliv	CGCGACCGCTGGTTCACGGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGAAATGGTGGACCGGTCTGTG	600
Schar	CGGGACCGCTGGTTCACGGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGAAATGGTGGACCGGTCTGTG	585
SspS10	CGGGACCGCTGGTTCACGGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGAAATGGTGGACCGGTCTGTG	585
Shaw	CGGGACCGCTGGTTCACGGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGAAATGGTGGACCGGTCTGTG ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	585
Scoel	CAGTCCCTCGCGGACGTGCCGCCGGCCGCCACCAGGCGACGGATGGGA-CTGTGACATGG	659
Sliv	CAGTCCCTCGCGGACGTGCCGCCGGCCGCCACCAGGCGACGGATGGGA-CTGTGACATGG	659
Schar	GAATCCCTCGCGGACGTGCCGCCGGCCGCCACCAGGCGACGGATGGGA-CTGTGACATGG	645
SspS10	GAGTCCCTCGCGGACGTGCCGCCGGCCGCCACCAGGCGACGGATGGGA-CTGTGACATGG	645
Shaw	GAGTCCCTCTCCGACGTGCCGCCGGCCGCCACCAGGCGACGGATGGGGCTGCAGTGAATGG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	645
Scoel	GGAGCTACACGATTCGGAACGTCTCGAGCGGACCCCGCAGGGCGAACGGTCTTACGACG	719
Sliv	GGAGCTACACGATTCGGAACGTCTCGAGCGGACCCCGCAGGGCGAACGGTCTTACGACG	719
Schar	GGAGCTACACGATTCGGAACGTCTCGAGCGGACCCCGCAGGGCGACGGTCTTACGACG	705
SspS10	GTTCGTACACGATTCGGAACGTCTCGAGCGGACCCCGCAGGGCGAACGGTCTTACGACG	705
Shaw	GGACGTACACGATTCGGAACGTCTCGAGCGGACCCCGCAGGGCGAACGGTCTTACGACG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	705
Scoel	TGTTACAGCCGGCTGTCTGCCGAGCGGATCATCTTCTCGGGACCGAGATCGACGACGGCG	779
Sliv	TGTTACAGCCGGCTGTCTGCCGAGCGGATCATCTTCTCGGGACCGAGATCGACGACGGCG	779
Schar	TCTTACAGCCGGCTGTCTCAACGAGCGGATCATCTTCTCGGCACCGAGATCGACGACGGCG	765
SspS10	TCTTACAGCCGGCTGTCTGCCGAGCGGATCATCTTCTCGGCACCGAGATCGACGACGGCG	765
Shaw	TCTTACAGCCGGCTGTCTCAACGAGCGGATCATCTTCTCGGCACCGAGATCGACGACGGCG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	765
Scoel	TGGCCAACGTCGTGATCGCACAGCTCCTGCACCTGGAGTCTGCGGCCCGGAGAGCGAGA	839
Sliv	TGGCCAACGTCGTGATCGCACAGCTCCTGCACCTGGAGTCTGCGGCCCGGAGAGCGAGA	839
Schar	TCGCCAACGTCGTGATCGCACAGCTCCTGCATCTGGAGTCTGCGGCCCGGAGAGCGAGA	825
SspS10	TCGCCAACGTCGTGATCGGCCAGCTCCTGCACCTGGAGTCTGCGGCCCGGAGAGCGAGA	825
Shaw	TCGCCAACGTCGTGATCGGCCAGCTCCTGCACCTGGAGTCTGCGGCCCGGAGAGCGAGA * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	825
Scoel	TCGCGCTTACATCAACTCTCCCGGGCGCTCGTTCACGTCTGATGGCGATCTACGACA	899
Sliv	TCGCGCTTACATCAACTCTCCCGGGCGCTCGTTCACGTCTGATGGCGATCTACGACA	899
Schar	TCTCGCTTACATCAACTCTCCCGGGCGCTCGTTCACCTCCCTGATGGCCATCTACGACA	885
SspS10	TCGCGATCTACATCAACTCTCCCGGGCGGTTCGTTCACTTCACTCATGGCCATCTACGACA	885
Shaw	TCGCGATCTACCTCAACTCTCCCGGGCGCTCTTCACTTCGCTCATGGCCATCTACGACA ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	885
Scoel	CGATGACCTTCGTGCAGGCGCCGATCTCGACGTTCTGTGTGGGACGGCGGCTCCACGG	959
Sliv	CGATGACCTTCGTGCAGGCGCCGATCTCGACGTTCTGTGTGGGACGGCGGCTCCACGG	959
Schar	CGATGTCCTACGTGAGGACGCCGATCTCGACGTTCTGTGTGGGACGGCGGCTCCACGG	945
SspS10	CCATGACGTTCTGTGCAGGCGCCGATCTCCACGTTCTGTGTGGGACGGCGGCTCCACGG	945
Shaw	CCATGACGTTCTGTGCAGGCGCCGATCTCCACGTTCTGTGTGGGACGGCGGCTCCACGG * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	945
Scoel	CGGCCGTGCTGCTGGCGGGCGGGGACCCCGGGCGGCGGTTCTGCTCGAACACGCGCGGG	1019
Sliv	CGGCCGTGCTGCTGGCGGGCGGGGACCCCGGGCGGCGGTTCTGCTCGAACACGCGCGGG	1019
Schar	CGGCCGTGCTGCTGGCGGGCGGGGACCCCGGGCGGCGGTTCTGCTCGAACACGCGCGGG	1005
SspS10	CGGCCGTGCTGCTGGCGGGCGGGGATCCCGGGCGGCGGTTCTGCTCGAACACTCCCGGG	1005
Shaw	CGGCCGTGCTGCTGGCGGGCGGGGACCCCGGGCGGCGGTTCTGCTCGAACACTCACGGG ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	1005

Scoel	TCCTGTGGGGACCCGGCCAGCGGGCGGCCAGGACCGGTGTCGACCTGGCACTCC	1079
Sliv	TCCTGTGGGGACCCGGCCAGCGGGCGGCCAGGACCGGTGTCGACCTGGCACTCC	1079
Schar	TGCTGTGGGGACCCGGCCAGCGGGCGGCCAGGACCGGTGTCGACCTGGCGCTCC	1065
SspS10	TGCTGTGGGGACCCGGCCAGCGGGCGGCCAGGACCGGTGTCGACCTGGCGCTCC	1065
Shaw	TGCTGTGGGGACCCGGCCAGCGGGCGGCCAGGACCGGTGTCGACCTGGCGCTCC ***** ** ***** * * ***** ** ***** * *	1065
Scoel	AGGCCAAGGAGATGGTGCGCATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGCCACACGC	1139
Sliv	AGGCCAAGGAGATGGTGCGCATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGCCACACGC	1139
Schar	AGGCCAAGGAGATGGTGCGCATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGCCACACCC	1125
SspS10	AGGCCAAGGAGATGGTGCGCATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGCCACACCC	1125
Shaw	AGGCCAAGGAGATGGTGCGCATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGCCACACCC ***** ** ***** * *	1125
Scoel	ACCACGACGTGCGCAGCTGCGCGCGGACATGGACCCGGACAAGGTGTTACCGCCCGAGG	1199
Sliv	ACCACGACGTGCGCAGCTGCGCGCGGACATGGACCCGGACAAGGTGTTACCGCCCGAGG	1199
Schar	ACCACGACGTGGCGACCTGCGAGCCGACATGGACCCGGACAAGGTGTTACCGCGCAGG	1185
SspS10	ACCACGACGTGGCGCCCTGCGCGCGGACATGGACCCGGACAAGGTGTTACCGCGCAGG	1185
Shaw	ACCACGACGTGGCGCAGCTGCGCGCGGACATGGACCCGGACAAGGTGTTACCGCAGG ***** * * * ***** ** ***** ** ***** ** ***** * *	1185
Scoel	AGGCGGTGGCCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTGCGCGGGCGCCTGACGAGGTCTGAG	1259
Sliv	AGGCGGTGGCCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTGCGCGGGCGCCTGACGAGGTCTGAG	1259
Schar	AGGCGGTGGCCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTGCGCGGGCGCCTGACGAGGTCTGAG	1245
SspS10	AGGCGGTGGCCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTGCGCGGGCGCCTGACGAGGTCTGAG	1245
Shaw	AGGCGGTGGCCTACGGGCTGGCCGACGAGGTGCTGCGCGGGCGCCTGCTGAAGGTCTGAG ***** ** ***** * * * ***** ** ***** ** ***** ** *****	1245
Scoel	CTGCCGGGCGCGCTCCCCGCGTGCAGGGGGCGCGGCCCGTACGCGTCCFCAGGCGGCC	1319
Sliv	CTGCCAGGCGCGCTCCCCGCGTGCAGGGGGCGCGGCCCGTACGCGTCCFCAGGCGGCC	1319
Schar	GCGCCGGCGCGCCACCGGGG-----FCAGGCTGCC	1276
SspS10	GCGCCG----GCCGTTACGGC-----FCAGGCGGCC	1272
Shaw	GCGCCGGCGCGGTACGGC-----FCAGGCGGCC *** * * ***** ** ***** ** ***** ** *****	1276
Scoel	AGGCACATCCCGTCAACCGCGCGCGGACGCCCCGCGGCCCGCTCCCGGGCCGGTGTGC	1379
Sliv	AGGCACATCCCGTCAACCGCGCGCGGACGCCCCGCGGCCCGCTCCCGGGCCGGTGTGC	1374
Schar	ATGCACAGTCCCGTACGACGAGGTGGAGCGCCCC--GCGCGACTGCGCCCGGTGAC	1333
SspS10	AGGCACATCCCGTCAACCGCGCGCGGACGCCCCGCGGCCCGCTCCCGGGCCGGTGTGC	1329
Shaw	AGGCACATCCCGTCAACCGCGCGCGGACGCCCCGCGGCCCGCTCCCGGGCCGGTGTGC * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1333
Scoel	CGGAGGTGAGCCGGACAGCTCGCCCTGCGCGCGGGCGAGCAGGTGCGCCAGGCCAGT	1439
Sliv	-----TGTGCCGATCAGCTCGCCCTGCGCGCGGGCGAGCAGGTGCGCCAGGCCAGT	1427
Schar	CGGAGGTGAGCCGGGTGAGTTCGCCCTGCGCCCTGCGCGCGGGCGAGCAGGTGCGCCAGGCCAGT	1393
SspS10	CGGAGGTGAGCCGGGTGAGTTCGCCCTGCGCGCGGGCGAGCAGGTGCGCCAGGCCAGT	1389
Shaw	CGGAGGTGAGCCGGGTGAGTTCGCCCTGCGCCCTGCGCGCGGGCGAGCAGGTGCGCCAGGCCAGT * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1393
Scoel	CCGAGGCGCCCCGCGCGGGCGCCAGTACTTCGGAGGACGCTCCTTGCGGCCCGCTCC	1499
Sliv	CCGAGGCGCCCCGCGCGGGCGCCAGTACTTCGGAGGACGCTCCTTGCGGCCCGCTCC	1487
Schar	CCGAGGCGTTGGCGGGCGGGCGGAGACTCCGAGGAGGCCTCCTTGCGGCCCGCTCC	1453
SspS10	CCGAGGCGTTGGCGGGCGGGCGGAGACTCCGAGGAGGCCTCCTTGCGGCCCGCTCC	1449
Shaw	CCGAGGCGTTGGCGGGCGGGCGGAGACTCCGAGGAGGCCTCCTTGCGGCCCGCTCC ***** ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1453
Scoel	ACCTCCGAGAGGTAGGGCATGGAGATCCGGGCGGCCCTCGGCACCTCCTTACGCGTGCGC	1559
Sliv	ACCTCCGAGAGGTAGGGCATGGAGATCCGGGCGGCCCTCGGCACCTCCTTACGCGTGCGC	1547
Schar	ACCTCCGACAGGTACGGCATGGAGATCCGTCGCTCGTCCGGCAGCTCCTTCAAGGTGCGC	1513
SspS10	ACCTCCGAGAGGTAGGGCATGGAGATCCGGGCGGCCCTCGGCACCTCCTTCAAGGTGCGC	1509
Shaw	ACCTCCGAGAGGTAGGGCATGGAGATCCGGGCGGCCCTCGGCACCTCCTTCAAGGTGCGC ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1513
Scoel	TCCTGTCCAGGCGTTCACGCGCGAGGACGTCTCCGACAGGTGCGGCCACAGGGGCTCT	1619
Sliv	TCCTGTCCAGGCGTTCACGCGCGAGGACGTCTCCGACAGGTGCGGCCACAGGGGCTCT	1607
Schar	TCCTGTCCAGGCGTTCACGCGCGAGGACGTCTCCGACAGGTGCGGCCACAGGGGCTCT	1573
SspS10	TCCTGTCCAGGCGTTCACGCGCGAGGACGTCTCCGACAGGTGCGGCCACAGGGGCTCT	1569
Shaw	TCCTGTCCAGGCGTTCACGCGCGAGGACGTCTCCGACAGGTGCGGCCACAGGGGCTCT ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1573
Scoel	CGCGGGGGGGGGCCTTCGCTCCGGGGGAACCGGTGAGGCGGGGGCGGCCGCCCCGGG	1679
Sliv	CGCGGGGGGGGGCCTTCGCTCCGGGGGAACCGGTGAGGCGGGGGCGGCCGCCCCGGG	1667
Schar	TTCGGGGGGGGGGCCTTCGCTCCGGGGGAACCGGTGAGGCGGGGGCGGCCGCCCCGGG	1623
SspS10	TTCGGGGGGGGGGCCTTCGCTCCGGGGGAACCGGTGAGGCGGGGGCGGCCGCCCCGGG	1619
Shaw	TTCAGGGGGGGGGCCTTCGCTCCGGGGGAACCGGTGAGGCGGGGGCGGCCGCCCCGGG ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	1623
Scoel	CGCGTGGCCTGCGGGCGCGGCCCTGCGACGCGTGGCTGCGGGCGCGTGGCTGCGGG	1739
Sliv	CGCGTGGCCTGCGGGCGCGGCCCTGCGACGCGTGGCTGCGGGCGCGTGGCTGCGGG	1712
Schar	-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG	1651
SspS10	-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG	1632
Shaw	-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG-----GCCGCGGGG * * * * *	1632

Scoel	CGCAGCGGAATGACGCGGGCTTCGTTCCGGCACGTGGCTGGT	CAC	1783
Sliv	CGCAGCGGAATGACGCGGGCTTCGTTCCGGCACGTGGCTGGT	CAC	1756
Schar	CGCAGGGGATGACGCGGGCTTCGTTCCGGCACGTGGTTGCT	CAC	1695
SspS10	CGCAGAGGGATGACTCGGGCTTCGTTCCGGCAGGTGGTTGCT	CAC	1676
Shaw	CGCAGCGGGATGACTCGGGCTTCGTTCCGGCAGGTGGCTGGT	CAC	1680
	***** ** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****		

6.3.11 *clpP5* in *S. hawaiiensis*

Genesequenz des *clpP*-Homologs *clpP5* von *S. hawaiiensis*.

>*S. hawaiiensis clpP5*

ATGACCCGACCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT
 CCGTACTCGAAGCTCTGGAGGAGCGGATCGTCTTCTCGGGGCGCCGGTGGACGAGACCTCGGCGAACGACGT
 GATGGCCAGTTTCATGTACTGGAGCACCAGGCTCCGGAGCGGCACATCTCGCTCTACATCACTCCCCGGCGGC
 ACCTTCCACGCGATGACGGCGCTCTACGACACGATGCGGTACGTCTCTGCGACGTGGAGACGATCTGCCTGGGC
 CAGGCCGGTGCCGCTCCTCGTACTGCTGGCGGGCGGGCACGCCGCAAGCGATTGCGCTGCCGACGCACG
 CCTGGTGATCCATCAGCCCGCTGCCGAGCCGGTCCGGGGGAGGCGAGCGATCTGGCCATCAGGCCGACG
 AGTTGACGCGCATCCGCGGCCGGATGGAGGAGATGCTCGCGCTGCACACCGGCCGACCCGGGAGCAGGTGAGC
 ACGGACATCGAGCGGGACAAGATCCTCACCGCCAGGAGGCGGTGGAGTACGGCCTGGTGGACGGGATCATCC
 GAGCCGCAAGGCCACCCTGGCCCCCGACCGGACGATGA

Multiples Sequenz-Alignment des *clpP5*-Gens von *S. hawaiiensis*, *S. lividans* TK24, *S. coelicolor* A(3)2, *S. chartreusis* NRRL 3882 und *S. sp.* S10(2016). Startcodons sind grün markiert, Stopcodons rot.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sliv	ATGACCCGCGCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT	60
Scoel	ATGACCCGCGCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT	60
Schar	ATGACCCGCGCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT	60
Shaw	ATGACCCGCGCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT	60
SspS10	ATGACCCGCGCGTCCGCCGCTACGTGCTGCCCGAGTTCACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGAT	60
	***** ***** * * ***** ***** ***** ***** *****	**
Sliv	ACCCGGACGTCGGACCCGCTACTCCAAGTCTCCAGGAGCGGATCGTGTTCCTCGGGACA	120
Scoel	ACCCGGACGTCGGACCCGCTACTCCAAGTCTCCAGGAGCGGATCGTGTTCCTCGGGACA	120
Schar	CAACGGTCGATGGATCCGCTACTCGAAGTCTCCAGGAGCGGATCGTGTTCCTCGGGACG	120
Shaw	CAACGGACGATGGATCCGCTACTCGAAGTCTCCAGGAGCGGATCGTGTTCCTCGGGACG	120
SspS10	CAACGGACGATGGATCCGCTACTCGAAGTCTCCAGGAGCGGATCGTGTTCCTCGGGACA	120
	*** ** * * ***** ***** * * ***** ***** ***** ***** *	
Sliv	CCGGTCCGAGACCTCCGCGAACGACGTCGACGGCGCAGCTCATGTATCTGGAGCACCAG	180
Scoel	CCGGTCCGAGACCTCCGCGAACGACGTCGACGGCGCAGCTCATGTATCTGGAGCACCAG	180
Schar	CCGGTCCGAGACCTCCGCGAACGACGTCGACGGCGCAGCTCATGTATCTGGAGCACCAG	180
Shaw	CCGGTCCGAGACCTCCGCGAACGACGTCGACGGCGCAGCTCATGTATCTGGAGCACCAG	180
SspS10	CCGGTCCGAGACCTCCGCGAACGACGTCGACGGCGCAGCTCATGTATCTGGAGCACCAG	180
	** * * ***** ***** * * * * * ***** * * *****	
Sliv	GCACCGGACCGGGACATCGAGCTGTACGTCAACTCGCCGCGGGCTCCTTCCACCGCCATG	240
Scoel	GCACCGGACCGGGACATCGAGCTGTACGTCAACTCGCCGCGGGCTCCTTCCACCGCCATG	240
Schar	GCCCCGACCGTGACATCTCGCTCTACATCAACTCCCCGGCGGCACCTTCCACCGCCATG	240
Shaw	GCTCCGGAGCGGACATCTCGCTCTACATCAACTCCCCGGCGGCACCTTCCACCGCCATG	240
SspS10	GCCCCGAGCGGGACATCTCGCTCTACATCAACTCCCCGGCGGCAGCTTCCACCGCCATG	240
	** * * * * ***** * * * * * ***** ***** ***** ***** * * * * *	
Sliv	ACCGCGATCTACGACACGATGCGCTACGTGCGCTGCGACGTGGCCACCACCTGCCTCGGG	300
Scoel	ACCGCGATCTACGACACGATGCGCTACGTGCGCTGCGACGTGGCCACCACCTGCCTCGGG	300
Schar	TCGGCCATCTACGACACGATGCGCTACGTGCGCTGCGACGTGGTGACGACCTGCCTGGGC	300
Shaw	ACGGCGCTCTACGACACGATGCGGTACGTCTCCTGCGACGTGGAGACGATCTGCCTGGGC	300
SspS10	ACGGCGATCCACGACACGATGCGGTACGTCTCCTGCGACGTGGAGACGATCTGCCTGGGC	300
	* * * * * ***** ***** ***** ***** * * * * * ***** * *	
Sliv	CAGGCCGGTCCGTCGCGCGCGTGTGCTGGCGGGCGGCACCCCGGCAAGCGCGCCGCC	360
Scoel	CAGGCCGGTCCGTCGCGCGCGTGTGCTGGCGGGCGGCACCCCGGCAAGCGCGCCGCC	360
Schar	CAGGCCGGTCCGTCGCGCGCGTGTGCTGGCGGGCGGCACCCCGGCAAGCGATCCGTTG	360
Shaw	CAGGCCGGTCCGTCGCGCGCGTGTGCTGGCGGGCGGCACCCCGGCAAGCGATTCCGCG	360
SspS10	CAGGCCGGTCCGTCGCGCGCGTGTGCTGGCGGGCGGCACCCCGGCAAGCGATTCCGCG	360
	***** * * * * * ***** ***** ***** ***** ***** *****	**

Sliv	CTGCCGGGCGCCCGGGTGGTGTCTCCACCAGCCGGCGCTCACCGAACCGGTGCGTGGACAG	420
Scoel	CTGCCGGGCGCCCGGGTGGTGTCTCCACCAGCCGGCGCTCACCGAACCGGTGCGTGGACAG	420
Schar	CTGCCGGGCGCCCGGGTGGTGTCCATCAGCCCGCCCTGCCCGAGCCGGTCCCGGGACAG	420
Shaw	CTGCCGGGCGCCCGCCCTGGTGATCCATCAGCCCGCGCTGCCCGAGCCGGTCCGGGGGCGAG	420
SspS10	CTGCCCGACCGCCCTGTGGTGATCCATCAGCCCGCGCTGCCCGAGCCGGTCCGGGGGCGAG	420
	***** * ** * ** * ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Sliv	GCGGGGCGACCTGGCCGTCCACGCCCGGGAAGTGGTCCGTGTCCGCGCCCGCCTGGAGGAG	480
Scoel	GCGGGGCGACCTGGCCGTCCACGCCCGGGAAGTGGTCCGTGTCCGCGCCCGCCTGGAGGAG	480
Schar	GCCAGCGATCTGGCGATCCAGGCCGACGAGTTGACACGCATCCGGACCCGATGGAGGAG	480
Shaw	GCGAGCGATCTGGCCATCCAGGCCGACGAGTTGACGCGCATCCGCGGCGGATGGAGGAG	480
SspS10	GCCAGTGATCTGGCGATCCAGGCCGACGAATTGACGCGCATCCGGAGCCGGATGGAGGAG	480
	** * ** * ** * ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Sliv	ATCCTCGTACGGCACACCGGCCGCACTCCCGGGCAGGTGGCCGCGGACCTCGAGCGGGAC	540
Scoel	ATCCTCGTACGGCACACCGGCCGCACTCCCGGGCAGGTGGCCGCGGACCTCGAGCGGGAC	540
Schar	ATGCTCGCACGGCACACGGGGCGCACCCCGGGAGCAGGTGAGCGCGACATCGAGCGCGAC	540
Shaw	ATGCTCGCGCTGCACACCGGCCGCACTCCCGGGAGCAGGTGAGCACGCGACATCGAGCGGGAC	540
SspS10	CTGCTCGCGCTGCACACGGGCCGCACTCCCGGGAGCAGGTGAGCACGCGACATCGAGCGGGAC	540
	* ***** * ** * ** * ***** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	
Sliv	ACGGTCTTGAGCAGCCCGGACAGGACAGGAGTACGGGCTGGTGGACCGGATCGTGCCGGGC	600
Scoel	ACGGTCTTGAGCAGCCCGGACAGGACAGGAGTACGGGCTGGTGGACCGGATCGTGCCGGGC	600
Schar	AAGGTCCTACCCGCCAGGAGGCGGTTGGAGTACGGCTGGTGGACCGGATCATCCCCAAC	600
Shaw	AAGATCCTACCCGCCAGGAGGCGGTTGGAGTACGGCTGGTGGACCGGATCATCCCCAGC	600
SspS10	AAGATCCTACCCGCCAGGAGGCGTGGAAATACGGCTGGTGGACCGGAAATCATCCCCAGC	600
	* * ***** * ** * ** * ***** * ** * ** * * ** * ** * ** * ** * ** *	
Sliv	CGCAGGACCCCGCCCGCCTCGTCCGGCGCCAGG	636
Scoel	CGCAGGACCCCGCCCGCCTCGTCCGGCGCCAGG	636
Schar	CGCAAGGCCACCCTGGCCCCGCGGACCGGAGAG	636
Shaw	CGCAAGGCCACCCTGGCCCCGCGGACCGGACGA	636
SspS10	CGCAAGGCCACCCTCGCCCCGCGGACCGGACGG	636
	***** * ** * ** * ***** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** * ** *	

6.3.12 *clpP*_{ADEP} in *S. hawaiiensis*

Genesequenz des *clpP*-Homologs *clpP*_{ADEP} von *S. hawaiiensis*.

>*S. hawaiiensis clpP*_{ADEP}

```

GTGAAGGACATTAAGGAACTGACGGGTCGCACCCTCGGCGCATCACGGTGGAACTGAACGACCAGGTAATGCAT
CGCCTCATGGACGAGCGTATTATATGCTGGGTCAAGAGGTCGATGACGCCGGAAGCAATGCGATTTGCTCGAA
CTGCTTCTGTTGGCAGGAGATTCCCCTCGCGACATCAGCCTTTATATCAACTACCCGGTGGGTCCGTACCCGCGG
GAATGGCTATCTACGACACCATGAACTACATCGAGAACGATGTAGTCACAGTAGCGATGGGGACCGCAGCCTCGA
TGGGCCAATTCTCCTGACTGCGGGCACCCAGGCAAGCGCATCGTTCTGCCTCATGCGGAAATCCTCATGCACCA
GCCCTCTGCCGGTCTCGGCGGCTCTGCCAGTGACATCAAGATTGATGCCGAGCGACTATTGCTGTCAAAAAGCGC
ATGATTGACATCACGGCTCAGCACACCCGACGACTGTGCGAGGAGATTAAGCGGGATTACAGCCGCGACAGGTG
GTTCTCCGCTGACGAAGCAGTCCGACTCGGCTCGCGACAGGGTTGAATATGTAGCCGCTACCGTTCCTGGCAAT
ATCGGGGCGACGGAAGTAG

```

Multiples Sequenz-Alignment von *clpP*_{ADEP} (*clpP*A) und *clpP1-5* von *S. hawaiiensis*.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

clpP5      -----0
clpP2      GTGAACCAGTTCCTCCGGCAGCGGGATCTACGACCATGACGCGCGTGCAGGACATGAGC    60
clpP4      -----0
clpP3      -----0
clpP1      -----0
clpP1      -----GTGAGAGC    8

clpP5      -----ATGAC-CCGACCCTCGGCCCCGTACGTGCTGCCCGAGTT    38
clpP2      GCCTCCCAGGGCCCTACACCGGCC-CGAGGCCGAGTCCCGCTACATCATTCCCGCT    119
clpP4      -----ATGGGGACGTACAGATTCCGAAAGCT    26
clpP3      -----ATGACT-----CCACTGACGGCACTCGCCCCACGGGCGGA    35
clpP1      -----GTGAAG----GACATTAAGGAACTGACGGGTCCGAC---    32
clpP1      GCGGGCGCCGCTCGTAAGACGAGCAGGTGGATACGTGACGAATCTGATGCCCTCAGCCG    68

clpP5      CACCGAACGCACAGGGTCCGGGCAACGGACGATGGATCCGTAAGTTCGAAAGTCCCTGGAGGA    98
clpP2      CGTCCGAGCGCACCTCCAGGGCATCCCGAGTACGACCGGTACGCGAAGCTCTTCGAGGA    179
clpP4      CATCGAGCGGACCCCGAGGCGAGCGCTCCTTCGACGTTCTCAGCCGGTCTGCTCAACGA    86
clpP3      GGAGGGCGACACCCCTCCGACCCGGTTCGACGACCACTGGCCCGACAGTGTCTCGCGCA    95
clpP1      ---CCTCGGCGCATCAGGTGGAACCTGAACGACCAGGTAATGCATCGCCTCATGGACGA    89
clpP1      CCGGAGCCCTTCCATCGGTGGTGGCCCGGTGACAGGTTTACAACCGGCTGCTCAACGA    128

```

clpP5	GCGGATCGTCTTCCTCGGGGCGCCGGTGGACGAGACCTCGGCGAACGACGTGATGGCCCA	158
clpP2	GCGGATCATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCCCTCCGCAACGACGTATGGCACA	239
clpP4	GCGGATCATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCCCTCCGCAACGACGTATGGCACA	146
clpP3	GCGGATCGTCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCCCTCCGCAACGACGTATGGCACA	155
clpPA	GCGTATTATTATGCTGGGTCAAGAGTTCGATGACGCCGGAAGCAATGCGATTGCTCGCA	149
clpP1	GCGGATCATCTTCCCTCGGCGTCCAGATCGACGACGCCCTCCGCAACGACGTATGGCACA	188
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	GTTTCATGTACCTGGAGCACCAGGCTCCGGAGCGCGACATCTCGCTTACATCAACTCCCC	218
clpP2	GCTGCTGTGCCTGGAGTCGATGGACCCCGACCGTGCATCTCGGTGTACATCAACAGCCC	299
clpP4	GCTCCTCCAGCTGGAGTCGTCGTCCCGGAGAGCGAGATCGCGATCTACCTCAACTCCCC	206
clpP3	GTTGCTCATCTGTCGCGGAGGACGCGCACACCGACATCAGCCTGTACATCAACAGTCC	215
clpPA	ACTGCTT---CTGTTGGCAGGAGATCCCCCTCGGCGACATCAGCCTTTATATCAACTCACC	206
clpP1	GTTGCTG---CTCCTTGCTCCGACCCGGAGAGGACATCTACCTGTACATCAACAGCCC	245
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	CGGCGGCACCTTCCACGCGATGACGGCGCTCTACGACACGATGCGGTACGCTCCTCGCA	278
clpP2	CGGCGGCTCCTTCCAGCGGCTCACCCGCGATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGA	359
clpP4	GGGCGGCTCCTTCCAGCGGCTCACCCGCGATCTACGACACGATGCAGTACGTGAAGCCGGA	266
clpP3	GGGCGGCGGTCGACGCGGGCTTCGCGATCTACGACACGATGCGGTTCATCCCGAACGA	275
clpPA	GGGTGGTCCGTCACCGCGGAATGGCTATCTACGACACCATGAACTACATCGAGAACGA	266
clpP1	CGGCGGTTCCATCAGCGGGCATGGCGATCTACGACACCATGCAGTACATCAAGAACGA	305
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	CGTGAGACGATCTGCCTGGGCCAGGCGGTGCCGCTCCTCGGTACTGTGGCGGCGGG	338
clpP2	GTCCTCAGACGGTCTGCATGGGCCAGGCGGCTCCGCGCGCGGCTCCGCTGGCGCGCGG	419
clpP4	GATCTCCACGTTCTGCGTCCGGCAGGCGGCTCCAGCGCGGCGGCTGCTGCTGGCGGCGG	326
clpP3	CGTCTCCACGCTGGCCATGGGCTTCGCGGCGCAGCATGGGCCAGTTCCCTGCTGAGCGTGG	335
clpPA	TGTAGTCACAGTAGCGATGGGGACCGCAGCCTCGATGGGCCAATTCCTCCTGACTGCGGG	326
clpP1	CGTGGTGACCATCGCCATGGGCTGGCAGCCTCGATGGGCCAGTTCCTGCTCAGCGCGGG	365
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	CAGCCCGGCAAGCGATTTCGCGCTGCCGACGCACGCCTGGTATCCATCAGCCCGGCT	398
clpP2	TACGCCGGGCAAGCGCATGGCCCTGCCGAAACGCGGTGTGCTGATCCACCAGCCGTACAG	479
clpP4	GGACCCGGGCGGCGGTTCTGCTGGAGCACTACCGGTGCTGCTCGGCCAGCGGCGCGC	386
clpP3	CGCGCCGGGCAAGCGCTACGCCCTGCCGAAACGCGGATCATGATGCACCAGCCGTCGGC	395
clpPA	CACCCAGGCAAGCGCATCGTTCTGCCTCATGCGGAAATCCTCATGCACCAGCCCTCTGC	386
clpP1	CACCCCGGCAAGCGCTTCGCGCTGCCGAAACGCGGATTCGATCCATCAGCCCTCCG	425
	** ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	GCCCGAGCCGGTCCGGGGCAGGCGAGCGATCTGGCCATCCAGGCCGACGAGTTGACGCG	458
clpP2	C---GAGACCGGCGCGGTCAGGTTCTCCGACCTGGAGATCGCCCGAACGAGATCCTGCG	536
clpP4	G---GGCGGCGAGCGCGGATGGTGTCCGACCTCGCGCTCCAGGCCAAGGAGATGGTGCG	443
clpP3	-----GGCACCCCGGACATCGAGATCCAGGCGCAGAACCTGGAGTT	449
clpPA	CGGTCTCGGC-----GGCTCGCCAGTGACATCAAGATTATCGCCGAGCGACTCATTCG	440
clpP1	CGGCCTCGCC-----GGCTCGGCTCGGACATCAAGATCCAGCCGAGCGGCTGCTGCA	479
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	CATCCGCGGCGGATGGAGGAGATGCTCGCGTGCACACCGGCCGACCCGGGAGCAGGT	518
clpP2	GATCGGTCCGAGCTGGAGGACATGCTGGCCAAAGCACTCCACCACGCGGTCGAGAAAGAT	596
clpP4	GATCCGCTCCCAGGTGGAGGAGGTGCTGGCCCGGCACACCCACCAGCAGTGCACGACGCT	503
clpP3	CACCAAGCGGACCATCGAGCGGATCACCGCCGAGCACACCGGCCAGAGCCCGGAGAACAT	509
clpPA	TGTCAAAAAGCGCATGATTGACATCAGGCTCAGCACACCGGACGGACTGTCGAGGAGAT	500
clpP1	CACCAAGAAGCGCATGGCCGAGCTGACCTCCAGCACACCGGCCAGAGCATCGAGCAGAT	539
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	GAGCACGGACATCGAGCGGGACAAGATCCTCACCGCCAGGAGGCGGTGGAGTACGGCCT	578
clpP2	CCGCGAGGACATCGAGCGCGACAAGATCCTCACGCGCGAGGACGCGCTGAGCTACGGCCT	656
clpP4	GCGCGCGACATGGACCCGACAAGTGTTCACCGCACAGGAGGCGGTGGCCTACGGGCT	563
clpP3	CTCCGGGAGCGGACCGGGACCGGCTGGTTACCGCCGAGGAGGCCAGGGAGTACGGCAT	569
clpPA	TAAGCGGGATTCAGACCGCGACAGGTGGTTCTCCGCTGACGAAGCAGTTCGAGTACGGCCT	560
clpP1	CACCCGCGACTCGGACCCGACCGGCTGGTTTCGACGCTTCGAGGCCAAGGAGTACGGCCT	599
	** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	GGTGACGGGATCATCCCGAGCCGCAAGGCCACCTGGCCCGCGCACCGGACGATGA--	636
clpP2	GATCGACAGGTATCAGCACCCGGAAGATGGACAATCGAGCCTGCGCTGA-----	708
clpP4	GGCCGACGAGGTGCTCAGCCGCGCCTCGTGAAGGTGTGA-----	603
clpP3	GGTGACCGGGTCTGGAGTCCCTCTCCGACGTCGCcCGGCGCGACGCGACGAGGAT	629
clpPA	CGCCGACAGGGTGAATATGTAGCCGCTACCGTTCTGGCAATATCGGGGAGCGGAAGT-	619
clpP1	CATCGACGAGTGTGACGACGCGCGGCTATGCCGGCGGCGCGGACCGGGGCT-	658
	*** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
clpP5	-----	636
clpP2	-----	708
clpP4	-----	603
clpP3	GGGGCTGCAGTGA	642
clpPA	-AG-----	621
clpP1	-GA-----	660

6.3.13 Sequenzen von bekannten Regulatoren der *Streptomyces*-ClpP-Maschinerie in *S. hawaiiensis*

>*S. hawaiiensis* *clgR*

ATGATTCTGCTCCGTGCGCTGCTGGGTGACGTGCTGCGTCGGCAGCGCCAGCGCCAGGGCCGTA
GTCTCCTCGTCCGCCCAGTCTCACTCGGCTATCTCTCCGAGGTGGAGCGGGGGCAGAAGGAGGCTT
CTCCGAGCTGCTCTCCGCCATCTGCGACGCGCTGGACGTACGGATGTCCGAGCTCATGCGGGAAAGT
GAGCGACGAGCTCGCCCTCGCCGAGCTGGCCCAGTCTGCTGCGGCCACCCCGAGCAGCCTGTACACAC
CGCCGGTTCGCTCGATGCTGGGCCTCCGTGTCGGTGGCCGGTGTGCCACCGGAACGGGTGACCATCA
AAGGCGCCTGCCGAAGCAGTGGACGTCGTCGCGTGA

>*S. hawaiiensis* *clpC1*

ATGTTTCGAGAGGTTACCGACCGCGCGGGCGGGTTGTCGTCCTGGCTCAGGAAGAAGCCCGGATGCT
CAACCACAACTACATCGGCACTGAGCACATCCTCTGGGCTGATCCACGAGGGTGAAGGTGTCGCCG
CCAAGGCCCTTGAGAGCCTCGGGATTTGCTCGAGGCGGTCCGCCAGCAGGTGGAGGAGATCATCGGC
CAGGGCCAGCAGGCCCGTCCGCCACATCCCCTTACCCCCGTCGAAGAAGGTCCTGGAGCTGTCGCT
CCGGGAGGCCCTCAGCTGGGCCAACACTACATCGGCACGGAGCACATCCTGCTCGGCTGATCCGCG
AGGGCGAGGGCGTCGCCGCCAGGTCCTCGTCAAGTGGGCGCAGATCTGAACCGCGTGCGGCAGC
AGGTATCCAGCTGCTCTCCGGTTACCAGGGCAAGGAGACCGCCACCGCGGTCTGCCGAGGGCACCC
CTCCACGTCCCTGGTCTCGACCAGTTCGGCCGGAACCTCACCCAGGCCGCTCGTAGTCCAAGCTCG
ACCCGGTATCGGGCGCGAGAAGGAGATCGAGCGGGTTCATGCAGGTGCTGCCCGCGTACGAAGA
ACAACCCGGTGTGATCGGTGAGCCCGCGTCGGCAAGACCGCGTCGTCGAGGGCCTCGCTCAGGCC
ATCGTAAGGGCGAGGTGCCCGAGACCCTCAAGGACAAGCACCTTACACCCTGGACCTCGGC
GCCCTGGTGC CGGCTCCCGTACCGCGGTGACTTCGAGGAGCGCCTGAAGAAGTCTCAAGGAGAT
CCGCACCGCGGACATCATCCTGTTTCATCGACGAGCTGCACACGCTGGTGGTGC GGGTGCCGCCG
GAGGGGCCATCGACGCGGCTCCATCCTGAAGCCGATGCTGGCCCGCGGTGAGCTCCAGACCATCGGT
GCCACCACGCTGGACGAGTACCGCAAGCACCTGGAGAAGGACGCCCTCGAGCGCCGTTCCAGCCAT
CCAGGTCGCGGAGCCGTCCTGCCG CACACGATCGAGATCCTCAAGGGTCTGCGGGACCGGTACG
AGGCCACCACCGCGTTCCATCACGGACGAGGCGCTGGTCCAGGCCGCCACCCTGGCCGACCGGTAC
ATCTCGGACCCTTCCTGCCGACAAGGCGATCGACCTGATCGAGGCGCGCTGACGAGGATGCGCAT
CCGCCGGATGACCGCGCCCGGACCTGCGCGAGTTTCGACGAGAAGATCGCCGGCGTCCGCCG
GACAAGGAGTCCGCGATCGACTCGCAGGACTTCGAGAAGGCCGCTCCCTGCGCGACAAGGAGA
AAGCAGCTCCTGGCCGCCAAGGCCAAGCGGGAGAAGGAGTGGAAGGCCGGCGACATGGACGTCGTC
GCGAGGTCGACGCGGAGCTGATCGCCGAGTCTCGCCACGGCGACCGGCATCCCGGTCTTCAAGCT
GACCGAGGAGGATCCTCGCGTCTGCTGCGCATGGAGGACGAGCTCCACAAGCGGGTATCGGCC
AGGTCGACGCCGTAAGGCGCTGACGCGTCCGCGTCTGAAGGACCCCAAGCGCCCGGTGGCTCG
TTCATCTTGCCGGCCGTCGGTGTGCGTAAGACCGAGCTGTCCAAGGCGCTCGCCGAATTCCTCT
TCGGCGACGAGGACGCGCTGATCTCCCTCGACATGTCCGAGTTCAGCGAGAAGCACACGGTCTCG
CGTCTTTCGGTTCGCCCCGGTACGTGGGCTACGAGGAGGGCGGCCAGCTCACCGAGAAGTCCG
CCGCAAGCCGTTCTCGGTGTCCTGTTTCGACGAGGTCGAGAAGGCCACCCGGACATTTCAACT
CGCTGCTGCAGATCCTGGAGGACGGTGCCTGACGGACTCCAGGGCCGGTCTGACTTCAAGA
AACACGGTCATCATCATGACGACCAACCTCGGCACCCGGGACATCTCCAAGGGCTTCAACCT
GGGCTTCGCGGCCAGGGCGACACCAAGTCCAACACTAGAGCGCATGAAGAACAAGGTCGAG
GAGCTCAAGCAGCACTCCGCCCCGAGTTCCTCAACCGCGTGCACGACGTGGTCTCTCCCG
CAGCTCAGCCAGGCCGACATCCTCAAGATCGTCGACCTGATGATCGACAAGGTGGACGAGCGC
CTGAAGGACCGGGACATGGGCATCGAGCTCTCGTCTCCGCAAGGAGCTGCTGTCCAAGAAG
GGCTACGACCCGGTGTGGTGC GCGTCCGCTGCGTCGCACCATCCAGCGCGAGATCGAGG
ACTCGTGTCCGAGAAGATCCTCTTCGGCGAGCTGCGCCCCGGTACATCGTGTCGTCGACAC
GGGCGAGGGCGAGGGCGAGACCAAGACCTTCACTTCGCGCGAGGAGAGAAGGCGGCTCTT
CCGGA CGTCCCGCCGATCGAGCAGGGCGCCGGCGGCTCGGGCCCGAACCTGAGCAAGGACG
CCTGA

>*S. hawaiiensis* *sigR*

ATGGGTTTCGACCATCTGCCCCGAGCCGACGAGCCGTGCCGACCTGGACTGGACGGTGTGTCAC
GCGGCCAGGACCGCCCCTATTCGGGCGCGGGCGGACCGGATCGTCGCTATCCTCCGATTCGGGT
GAGACCGGTCTCGGTCTCACGAGAACACTCGAGGAGGTGGGTCCGGTACAGGGACCGACG
CAGGGACCGAAAACGGCCAGGCGGAGCAGCCCAGGGCCAGGGCGGCACGGGGCGGAGAC
CGGCCCGGAGACGGCCCGGAGCGCGGAGCGCAGTGC GCGCTTCGAGCGGGACGCGCTCGAG

TTCTCGACCAGATGTA CTGGCCGCTGCGCATGACGCGCAACCCGGCCGACGCGGAGGACCTGGTGCAGGA
GACGTACGCCAAGGCGTACGCGTCTCCACCAGTTCGCGAGGGACCAACCTCAAGGCGTGGCTGTACCGGAT
CCTACCAACACCTTCATCAACTCGTACCGCAAGAAGCAGCGGAACCTCAGCGCTCCGCGCCGAGGAGATCGA
GGACTGGCAGCTCGCCCGCCGAGTGCACATGTGACGGGCTTGCCTCCGCGGAGTGCAGGCGCTCGACC
ATCTGCCCCACTCGGACGTGAAGCAGGCGCTCCAGGCGATCCCCGAGGAGTTCGCGATCGCCGTCTATCTCGCGG
ACGTGCAAGGGTTTGCCTACAAGGAGATCGCCGACATCATGGGGACACCCATCGGTACGGTGATGTCCCGGCTGC
ACCGGGGCCCGTACGCTGCGCGCATGCTGGAGGACTACGCCCGTGACCGCGGGATGGTCTGGCCGGTGCC
GGAGAGTGAACGAAGCGAAAGGCTCGGGGTCATGA

>*S. hawaiiensis hrdB*

GTGTGCGCCAGCACATCCCCTACGCTCCCGCCGAGATCGCCGAGTCCGTCTCTGTCTATGGCGCTCATCGAGCGG
GGAAAGGCTGAGGGGCGATCGCCGGCGATGACGTGCGTCCGGCCTTCGAAGCTGACCAGATTCCGGCCACTCA
GTGGAAGACGTATTGCGCAGCCTCAACCAGATCTCGAGGAAGAGGGTGTGACGCTGATGGTCAGTGCCGCGAG
AGCCAAAGCGCACCCGAAAGAGCGTGCAGCGAAGAGTCCCGCAAGCGCACCCGCCACCAAGACGGTGCAGGCA
AAGGCGGTGACCACCCGGAAGGCCACCGCCACCGCCACGCGCGGGCGCCCGCCGAGCCCGCCATCGAGGA
GGAGGCGCCCGCAAGAAGGCGGCTGCCAAGAAGACGACCGCCAAAGAAGGCGGCCGGAAGAAGACCGTCCG
AAGAAGACGCGGCCAAGAAGACCAGCGCCAAGAAGGACGACCGCGAGGTCGTGAGGAAGAGGTGCTCGAGG
AGGACGCCCCGGCAAGGCCGGTGAAGGAGCCGAGGGCACTCCGAGAACGCGGGCTTCGTGCTCTCCGACGAG
GACGAGGACGACGCGCCCGCAGCAGGTGCGCCGCCCGGTGCCACCGCCGACCCGGTCAAGGACTACCTCAA
GCAGATCGGCAAGGTCCCCCTGCTCAACGCCGAGCAGGAGTGCAGCTCGCAAGCGCATCGAGGCCGGTCTGT
TCGCCGAGGACAAGTGGCCAACGCCACAAGCTCGCCCCAAGCTCAAGCGCGAGCTGGAGATCATCGCCGAG
GACGGCCGCGCCGAAGAACCACCTCCTGGAGGCCAACCTCCGTCTGGTGGTCTCCCTGGCCAAGCGCTACACC
GGCCGCGCATGCTGTTCTTGACCTCATCCAGGAGGGCAACCTCGGTCTGATCCGCGCGGTGAGAAGTTCGAC
TACACCAAGGGCTACAAGTTCACGTACGCCACCTGGTGGATCCGTGAGGCGATACCCGCGCCATGGCCGACC
AGGCCCGCACCATTCGTATCCCGGTGCACATGGTGCAGGTCATCAACAAGCTCGCGCGCGTGCAGCGCCAGATGC
TCCAGGACCTGGGCCGCGAGCCACCCCGGAGGAGCTGGCCAAGGAACCTGACATGACCCCCGAGAAGGTATC
GAGGTACAGAAGTACGGCCGCGAGCCCATCTCGTGCACACGCCGCTGGGCGAGGACGGCGACAGCGAGTTCGG
CGACCTCATCGAGGACTCCGAGGCAGTCTCCCGCCGACGCGGTGAGTTCACGCTCCTGCAGGAGCAGCTGCA
CTCCGTCTGGACACCCTGTCCGAGCGCGAGGCGGGCGTCTCGATGCGTTCGGCCTCACCGACGGTCAGCC
GAAGACCCTCGACGAGATCGGCAAGGTCTACGGCGTACGCGTGAGCGGATCCGCCAGATCGAGTCCAAGACCA
TGTCGAAGCTGCGCCACCCGTCCCGTTCGAGGTGCTGCGCGACTACCTCGACTGA

>*S. hawaiiensis adpA*

ATGAGCCACGACTCCACTGCCGCGCCGGAAGCCGCGGCCCGAAACTTTCCGGGCGACGCCGCAAGGAGATCGT
CGCGGTGCTGCTGTTAGCGGCGGCCCATCTTCGAGAGTTCATACCGCTGTGCGGTGTTCCGGGTTGACCGCCA
GGACGCCGCGTACCGCGCTACCGCTGTTGGTGTGCGGGGGCGAGGACGGTCCGCTACGGACCACCGGGGGA
CTGAACTACCGCACCATGTCCTGGAAGCGATCTACGCGCGGGCACGGTCTGTCGTCGCGGCTGGCGTTTCG
ATCACTTCTCCGCCACCGGAGGAGGACTCGACGCGTGTGCGCCGCGCCACGAGGAGGGCGCCCGCATCGTCGG
GCTGTGACCCGGCGCCTTCGTCTGGCGGCGGGCGGGCTGCTGGACGGCCCGCCCGGACGACACTGGATGT
ACGCACCGACGCTGGCCAAGCGCTACCCGTGCGTGCAGTGGACCCGCGTGAAGTTCGTCGACGACGGCGAC
GTGCTGACGTGCGCGGGCACGGCCGCGGGCATCGACCTGTGCCTGCACATCGTGCACGACGGACCGCAACGA
GGCGGGCGGGGCCCTGGCCAGGCGGCTCGTGTGCCCGCGCCGACGCGGGGAGGAGCGCTACCTCGAC
AGGTCTTACCCGAGGAGATCGGCGCCGACCCGCTCGCCGAGGTGCTGCGCTGGGCGCTGGAGCACCTCCACGAA
CAGTTCGACGTGGAGACCCTGGCGGCACGCGGTACATGAGCCGGCGTACGTTGACCGCCGCTTCGCTCGCTG
ACCGGGAGCGCTCCGCTGCAGTGGCTGATCACGACGCGGTCTCCAGGCGCAGCGCCTGCTGGAGACGTGGA
CTACTCGGTGGACGAGGTGGCGGGGCGTGCAGGCTTCGGTTCGCGGTCGCCCTGCGCGGGCACTTCGCGCC
AGTGGGTTTCGTCGCCGCGGTACCGGGCGGCGTACCGCGCCCGCGCCGAGGGGCGAGCGGGCCCGAGGAC
ACCGAGAGCGCACCGGGCGGCCATGGGTCCGGCATGCCGGCCACCCGGCCACGGGGGGCATCCCGGCCAGC
CCGGCCAGCGCCCGCCCGTGCACCCGAGCACCCGGTGGCGTGCAGTCCCGCCGTACGGCGGGCGGCGAGC
GCGGTGCGCCAGTCCCGGGCCCTGTGCGGAGCCTGCCCGCCAGCGCAGTGCGCCATGA

6.3.14 Clp-ATPasen in *S. hawaiiensis*

Gen- und Aminosäuresequenzen der Clp-ATPasen *clpX*, *clpB*, *clpC1* und *clpC2* und der verkürzten Formen *clpC4* und *clpC5* sowie des Adapterproteins *clpS* von *S. hawaiiensis*.

>*S. hawaiiensis clpX*

```
gtggcagcatcggtgacggcggcgatctgctcaagtgtctgttctgcggaagagccagaagcaggtcaagaagctcatcgaggcccgggtgtg
acatctgcgacgagtgatcagcctctgcaacgagatcatcgaggaagaactcgctgagaccagcaggtccgctgggaggagctcccgaagcctc
gtgagatctacgagttcctcgagggctatgtgtcgccaggaggccccaagaagccctctccgtagcggtgtacaaccactacaagcaggtcca
ggccggcgagaacggcggggcgaaaggccgcgacgacccatcgagttggcgaagtccaacatcctgctcctcgccccagggctccggcaagac
cctcctcgcgagaccctcgcgcatgtgaacgtccccttcgcatcgccgacgcccagccctcagggaggcggtacgtcgccgaggacgtc
gagaacatcctgctcaagctgatccaggcggccgattacgactcaagaaggccgagaccgggatcatctacatcgacgagatcgacaaggtcgcg
aggaagagtgaaaaccctcgatcagcgcgacgtctcggcgaggcgctccagcaggcgtctgaagatcctggaggccaccaccgctcggtc
ccgccgagggcgccgtaagcaccaccagggatcatccagatcgacacgacgaacgtgctgttcatctggcgccgcttctccggctgg
agaagatcatcgagtcggggcggtgccaaggcatcggtctcgccgagatccgctccaagcgcgagatggagtccaaggaccagttccagg
aggtcatccggaggatttgtaagttcgcatgatccccgagttcatcgccgctccgggtcatcacctcggtccacaacctcgaccgagggcgcg
tgctccagatcctggtcgagccgcgcaacgcgctcgtcaagcagtagcgcctctcgaactcgagcggctggagctggacttcgagcgcgagggc
cctcgaggcagatcgccaccaggccatcctccgaccggcgcgcgccgctcgcgcatcatggaggaggtcctccagggcgtgatgtacgag
gtcccgctcccgaaggagctggccgggtcgtcatcagggcgacgtcgtccagtcgaactcaaccgacgctgatcccgcgggatgcgcggggac
gtggccgggggagcagaagacggcctag
```

>*S. hawaiiensis ClpX*

```
MARIGDGGDLLKCSFCGKSQKQVKKLIAGPGVYICDECIDLNEIIIEEELAETSEVRWEEELPKPREIYEFLEGYVVGQEAALK
KALSVAVYNHYKRVQAGENGGANGRDDAIELAKSNILLGPTGSGKTLAQTARMLNVPFAIADATALTEAGYVGEDV
ENILLKLIQAADYDVKKAETGIIYIDEIDKVARSENPSITRDVSGEGVQALLKILEGTTASVPPQGGKRKHPHQEFIQIDTT
NVLFIVGGAFSGLEKIIESRAGAKGIGFGAQIRSKREMESKDQFQEVMPEDLVKFGMIPEFIGRLPVITSVHNLDREALLQI
LVEPRNALVKQYERLFDGVELDFEREALAIADQAILRQTGARGLRAIMEEVLQGMVYEVPSRKDVARVVITADVVS
NVNPTLIPRDARGRGPEQKTA
```

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: EFD69270.1), *S. chartreusis* NRRL 3882 (NCBI: SOR81861.1) und *S. sp. S10(2016)* (NCBI: AMW10475.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
Shaw      MARIGDGGDLLKCSFCGKSQKQVKKLIAGPGVYICDECIDLNEIIIEEELAETSEVRWEE      60
SspS10   MARIGDGGDLLKCSFCGKSQKQVKKLIAGPGVYICDECIDLNEIIIEEELAETSEVRWEE      60
Schar    MARIGDGGDLLKCSFCGKSQKQVKKLIAGPGVYICDECIDLNEIIIEEELAETSEVRWEE      60
Sliv     MARIGDGGDLLKCSFCGKSQKQVKKLIAGPGVYICDECIDLNEIIIEEELAETSEVRWEE      60
*****

Shaw      LPKPREIYEFLEGYVVGQEAALKALSVAVYNHYKRVQAGENGGANGRDDAIELAKSNILL      120
SspS10   LPKPREIYEFLEGYVVGQEAALKALSVAVYNHYKRVQAGENGGANGRDDAIELAKSNILL      120
Schar    LPKPREIYEFLEGYVVGQEAALKALSVAVYNHYKRVQAGENGGANGRDDAIELAKSNILL      120
Sliv     LPKPREIYEFLESYVVGQEAALKALSVAVYNHYKRVQAGENGAQGRED AIELAKSNILL      120
*****

Shaw      LGPTGSGKTLAQTARMLNVPFAIADATALTEAGYVGEDVENILLKLIQAADYDVKKAE      180
SspS10   LGPTGSGKTLAQTARMLNVPFAIADATALTEAGYVGEDVENILLKLIQAADYDVKKAE      180
Schar    LGPTGSGKTLAQTARMLNVPFAIADATALTEAGYVGEDVENILLKLIQAADYDVKKAE      180
Sliv     LGPTGSGKTLAQTARMLNVPFAIADATALTEAGYVGEDVENILLKLIQAADYDVKKAE      180
*****

Shaw      TGI IYIDEIDKVARSENPSITRDVSGEGVQALLKILEGTTASVPPQGGKRKHPHQEFIQ      240
SspS10   TGI IYIDEIDKVARSENPSITRDVSGEGVQALLKILEGTTASVPPQGGKRKHPHQEFIQ      240
Schar    TGI IYIDEIDKVARSENPSITRDVSGEGVQALLKILEGTTASVPPQGGKRKHPHQEFIQ      240
Sliv     TGI IYIDEIDKVARSENPSITRDVSGEGVQALLKILEGTTASVPPQGGKRKHPHQEFIQ      240
*****

Shaw      IDTTNVLVIVGGAFSGLEKIIESRAGAKGIGFGAQIRSKREMESKDQFQEVMPEDLVKFG      300
SspS10   IDTTNVLVIVGGAFSGLEKIIESRAGAKGIGFGAQIRSKREMESKDQFQEVMPEDLVKFG      300
Schar    IDTTNVLVIVGGAFAGLEKIIESRAGAKGIGFGAQIRSKREMESKDQFQEVMPEDLVKFG      300
Sliv     IDTTNVLVIVGGAFAGLEKIIEGRAGAKGIGFGAQIRSKREIESKDQFEQVMPEDLVKFG      300
*****
```

Shaw	MIPEFIGRLPVI TSVHNDREALLQILVEPRNALVKQYERLFELDGVELDFEREALEAIA	360
SspS10	MIPEFIGRLPVI TSVHNDREALLQILVEPRNALVKQYERLFELDGVELDFEREALEAIA	360
Schar	MIPEFIGRLPVI TSVHNDREALLQILVEPRNALVKQYERLFELDGVELDFEREALEAIA	360
Sliv	MIPEFIGRLPVI TSVHNDREALLQILVEPRNALVKQYERLFELDGVELDFEREALEAIA *****;*****	360
Shaw	DQAILRQTGARGLR AIMEEVLQGVMEVPSRKDVARVVITADVQSNVNPTLI PRDARGR	420
SspS10	DQAILRQTGARGLR AIMEEVLQGVMEVPSRKDVARVVITADVQSNVNPTLI PRDARGR	420
Schar	DQAILRQTGARGLR AIMEEVLQGVMEVPSRKDVARVVITADVQSNVNPTLI PRDARGR	420
Sliv	DQAILRQTGARGLR AIMEEVLQGVMEVPSRKDVARVVITADVQSNVNPTLI PRDSRGR ***** *****	420
Shaw	GPGEQKTA	428
SspS10	GPGEQKTA	428
Schar	GPGEQKTA	428
Sliv	GPGEQKTA *****	428

>*S. hawaiiensis clpB*

gtggacgccgagctgaccaaccggagccgggacgcgatcaacgctgccagcaatcgggaggtagccgaggggcaccccgacctaccctgccc
ctgctgctcgctgctcagggacaggacaacgagaacatcaccgactgctcgccgctcgacccgaccagggccggtacgcccggagcc
gagcgcgtgctcgggggctcggagcgtgaccggctgaccgtcgccgccccagcccaaccgagatgctcggctgctcggacgcgcag
gcccgcgaaggacctgggggacgagtacctctccacggagcacctctcatcgccctcgccggaagggcgggcgggccggtgaggtgctgctc
agcagggggcgggcgccaggaagctcaggccgcttcagaagacgcggccagcggcggtgaccacggcgaacccgaggccagtagaa
ggccctggagaagtccgggacggacttcaccgcccggcgccgggaagggagctcagccccgctcggcggggaccaggagatccggcgcctggt
gcaggtgctgtcccgggaccaagaacaacccgctgctgtagccggcgtcggcaagaccgctgctgaggggctcggcagcggat
catcaagggcgagctcccagctgctgaaggacaagcggctgctcgctcagctggggccatggtcggggcgcaagtagccggggcgagtt
cgaggagcggctcaagaccgctcctcggagatcaaggactccagcggcagatcatcacctcatcgacgagctgacacccgctgaggggccggt
gccggcgagctccgcatggagcgggaaacatgctgaagccatgctcggccgagctcggcagctgctgaggtgcccacacgctcagcaggt
accgagcggatcgagaaggaccggcgctggagcggcgttccagcaggtgctggtcggcagcggcagcctcagaggactccatcgcatctgc
gcgggctcaagggccgctacaggcccaccacaaggtgcagatcgccgacagggccctggtcggcgggcaccctgctcggaccggtacatcact
ccccttctcggcacaagccatcgacctgctgacgagggcctcccggctgcatggagatcgactcctcggcctcgagatcgacgaactc
cagcgcgctcggcggctgaagatggaggagctgggatcgcaagggagaccgagcggcctcccggagcggcctggagaagctcggcggca
cctcggcgaagaaggaggagctcggcggcctaccgcccgtgggagaaggagaagcagctccctcaaccgctggtgagctgaaggaacgcc
tcgacgagatccggcgccagccgaacgcgccagcgcgacggcgaactcagaccgctcaagctgctcagggagatccccgcccgggaga
aggagctggaggccgctccgaggcggaggagggttccaaggacacatggtcaaggaggaggtcggcggcagcagatcgccagcgtcgtc
gcctcctggaccgcatccccggggcgctgctggaggcgagacgcagaagctgctgcatggaggacgagatcgccaagcgcctcatcgcc
cagggcgagccgtagggcggtgctggacgctcggcgctcggcgccggatctccgacccgaccggcccaccgggtccttctcttctc
gcccgaccggctggcaagaccgaactggccaagccctcggcagctcctctcagcagcagcggggatggtccgcatcgacatgctccgagta
cagcgaagaacacagctggccggctggtcggcggcccccggatacgtcggctcagaggaggcgccagctcacggaggccgtgcccaggc
gacctactcctgctcctgctggacgaggtggagaaggccaccccgaggtctcagatcctgctcaggtgctggacgacggccggtcaccggac
ggccagggccgacgctcagctccgcaacagatcctggtgctgacgtcgaacctgggagccagtagctggtcagaccgggtaccagcagcag
agaagaaggagcaggtcctggaggtgctggacacctctcaagccggagttcctcaaccgctggacacctggtcgtctcggcggctgacaa
gcccagctggagcgcacgaaagctccagctggagcgtcggcaagcggctcggcagcggcctcaccctggacatcagcccaggccct
ggcctggtcggcggaggagggatgaccggcgctacggcgcccggcggctcggcggctcgtccagtcggcagcggcctcggcagcggc
gatcctgcccgggagatcaaggacggcagacggctccgggtggaccgctcaggacgggctgctggtgggaccggcgacgggcaagacgctgta
g

>*S. hawaiiensis ClpB*

MDAELNRSRDAINAASNRAVTEGHPDLTPAHLALLLQGDNDENITDLAAVDADQAAVRAGAERVLGLPSVTGST
VAPPQPNREMLAVVADAQARAKDLGDEYLSTHELLIALAAKGGAAEVLSEQAGARKLQAAFQKTRGQRRVTTADPE
GQYKALEKFGTDFATAAREGKLPVIGRDQEIRRLVQLSRRTKNNPVLIPEGVVKTAVVEGLAQRIHKGDVPESLKDKR
LVALDLGAMVAGAKYRGEFEERLKTVLAEIKSDSQIITFIDELHTVVGAGAGGDSAMDAGNMLKPM LARGELRMVG
ATTLDEYRERIEKDPALERRFQQVLVAEPTVEDSIALRGLKGRYEAHHKVIADRALVAAATLSDRYITSRFLPKAIDLVD
EAASRLRMEIDSSPVEIDELQRAVDRLKMEELAIGKETDAASRERLEKLRRDLADKEEELRGLTARWEKEKQSLNRVGLK
ERLDEIRGQAERAQRDGFDTASKLLYGEIPALEKELEAASEAEEVAKDTMVKEEVGADDIADVVASWTGIPAGRLLG
ETQKLLRMEDEIGKRLIQGEAVRAVSDAVRRSRAGISDPDRPTGSFLFLGPTGVGKTELAKALADFLDDERAMVRIDM
SEYSEKHSVARLVGAPPVYVGYEEGGQLTEAVRRRPYSVLLDEVEKAHPEVFDILLQVLDDGRLTDGQGRVDFRNTIL

VLTSNLGSQYLVDVPTSEQEKKEQVLEVVRTSFKPEFLNRLDDLVLVFAALTKPELERIAKLQLERLAKRLAERRLTLDITPEAL
 AWLAEEGMDPAYGARPLRRLVQSAIGDRLAKEILSGEIKDGDTRVDRFEDGLLVGPATGKTL

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: AII14944.1), *S. chartreusis* NRRL 3882 (NCBI: SOR80253.1) und *S. sp.* S10(2016) (NCBI: AMW11891.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sliv	MDAELTNRSRDAINAASNRAVTEGNADLTPAHLALLLQGGQDNENITDLLAAVEADLAAV	60
Schar	MDAELTNRSRDAINAASNRAVTEGHDPDLTPAHLALLLQGGQENENITDLLAAVDADQAAV	60
Shaw	MDAELTNRSRDAINAASNRAVTEGHDPDLTPAHLALLLQGGQDNENITDLLAAVDADQAAV	60
SspS10	MDAELTNRSRDAINAASNRAVTEGHDPDLTPAHLALLLQGGQDNENITDLLAAVDADQAAV	60
	*****:*****:*****:*** **	
Sliv	RTGAERIVAGLPSVTGSTVAPPQPSREMLAVVADAQARAKELGDEYLSTEHLLLGIAAKG	120
Schar	RAGAERVLGAGLPSVTGSTVAPPQPNREMLAVVADAQTRAKDLGDEYLSTEHLLLGIAAKG	120
Shaw	RAGAERVLGAGLPSVTGSTVAPPQPNREMLAVVADAQARAKDLGDEYLSTEHLLLGIAAKG	120
SspS10	RAGAERVLGAGLPSVTGSTVAPPQPNRDMMLAVVADAQARAKDLGDEYLSTEHLLLGIAAKG	120
	*:***:.*:*****:*.*****:***:*****:.*:****	
Sliv	GAAGEVLEGGASAKKLQEAFRKARGRRVTTADPEGQYKALEKFGTDLTAAARDGKLDP	180
Schar	GAAGEVLSQQGADARKLQDAFQKTRGQRRVTTADPEGQYKALEKFGTDFATAAREGKLDP	180
Shaw	GAAGEVLSQQGAGARKLQAAFQKTRGQRRVTTADPEGQYKALEKFGTDFATAAREGKLDP	180
SspS10	GAAGEVLSQQGADAKKLQAAFQKTRGQRRVTTADPEGQYKALEKFGTDFATAAREGKLDP	180
	*****.***.*:*** **:*:*** *****:*****:*****:****	
Sliv	VIGRDQEIIRRVVQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVKGDVPESLKDRLVA	240
Schar	VIGRDQEIIRRVVQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVKGDVPESLKDRLVA	240
Shaw	VIGRDQEIIRRVVQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVKGDVPESLKDRLVA	240
SspS10	VIGRDQEIIRRVVQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQRIVKGDVPESLKDRLVA	240
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	LDLGAMVAGAKYRGEFEERLKTVLAETKDSGQVVTIFDELHTVVGAGAGGDSAMDAGNM	300
Schar	LDLGAMVAGAKYRGEFEERLKTVLAETKDSGQIITFIDELHTVVGAGAGGDSAMDAGNM	300
Shaw	LDLGAMVAGAKYRGEFEERLKTVLAETKDSGQIITFIDELHTVVGAGAGGDSAMDAGNM	300
SspS10	LDLGAMVAGAKYRGEFEERLKTVLAETKDSGQIITFIDELHTVVGAGAGGDSAMDAGNM	300
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	LKPLMARGELRMVGATTLDEYRERIEKDPALERRFQQLVAEPTVEDSIAILRGLKGRYE	360
Schar	LKPLMARGELRMVGATTLDEYRERIEKDAALERRFQQLVAEPTVEDSIAILRGLKGRYE	360
Shaw	LKPLMARGELRMVGATTLDEYRERIEKDPALERRFQQLVAEPTVEDSIAILRGLKGRYE	360
SspS10	LKPLMARGELRMVGATTLDEYRERIEKDPALERRFQQLVAEPTVEDSIAILRGLKGRYE	360
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	AHHKVIADALSALVAASLSDRYITSRFLPKAIDLVEAASRLRMEIDSSPVEIDELQRS	420
Schar	AHHKVIADALSALVAASLSDRYITSRFLPKAIDLVEAASRLRMEIDSSPVEIDELQRA	420
Shaw	AHHKVIADALSALVAASLSDRYITSRFLPKAIDLVEAASRLRMEIDSSPVEIDELQRA	420
SspS10	AHHKVIADALSALVAASLSDRYITSRFLPKAIDLVEAASRLRMEIDSSPVEIDELQRA	420
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	VDRLKMEELAIGKETDAASLERLERLRRDLADKEEELRGLTARWEKEKQSLNRVVELKER	480
Schar	VDRLKMEELAIGKETDAASLERLERLRRDLADKEEELRGLTARWEKEKQSLNRVVELKER	480
Shaw	VDRLKMEELAIGKETDAASLERLERLRRDLADKEEELRGLTARWEKEKQSLNRVVELKER	480
SspS10	VDRLKMEELAIGKETDAASLERLERLRRDLADKEEELRGLTARWEKEKQSLNRVVELKER	480
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	LDELIRGQAEARAQRDGFDTASKLLYGEIPALERDLEAASEAEEVARDTMVKEVVGADDI	540
Schar	LDELIRGQAEARAQRDGFDTASKLLYGEIPALEKELEAASEAEEVARDTMVKEVVGADDI	540
Shaw	LDELIRGQAEARAQRDGFDTASKLLYGEIPALEKELEAASEAEEVARDTMVKEVVGADDI	540
SspS10	LDELIRGQAEARAQRDGFDTASKLLYGEIPALEKELEAASEAEEVARDTMVKEVVGADDI	540
	:**:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	ADVVASWTGIPAGRLLEGETQKLLRMEDELGKRLIGQTEAVRAVSDAVRRSRAGIADPDR	600
Schar	ADVVASWTGIPAGRLLEGETQKLLRMEDELGKRLIGQTEAVRAVSDAVRRSRAGIADPDR	600
Shaw	ADVVASWTGIPAGRLLEGETQKLLRMEDELGKRLIGQTEAVRAVSDAVRRSRAGISDPDR	600
SspS10	ADVVASWTGIPAGRLLEGETQKLLRMEDELGKRLIGQTEAVRAVSDAVRRSRAGISDPDR	600
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	PTGSFLLFGPTGVGKTELAKALADFLFDDERAMVRIDMSEYSEKHSVARLVGAPPGYVGY	660
Schar	PTGSFLLFGPTGVGKTELAKALADFLFDDERAMVRIDMSEYSEKHSVARLVGAPPGYVGY	660
Shaw	PTGSFLLFGPTGVGKTELAKALADFLFDDERAMVRIDMSEYSEKHSVARLVGAPPGYVGY	660
SspS10	PTGSFLLFGPTGVGKTELAKALADFLFDDERAMVRIDMSEYSEKHSVARLVGAPPGYVGY	660
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	EEGGQLTEAVRRRPYSVLLDEVEKAHPEVFDILLQVLDGRLTDGQGRVDFRNTILVL	720
Schar	EEGGQLTEAVRRRPYSVLLDEVEKAHPEVFDILLQVLDGRLTDGQGRVDFRNTILVL	720
Shaw	EEGGQLTEAVRRRPYSVLLDEVEKAHPEVFDILLQVLDGRLTDGQGRVDFRNTILVL	720
SspS10	EEGGQLTEAVRRRPYSVLLDEVEKAHPEVFDILLQVLDGRLTDGQGRVDFRNTILVL	720
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	

Sliv	TSNLGSQYLVDPTTGEAEKQVLEVVRSFKPEFLNRLDDLTVVFSALSQEELSRIARLQ	780
Schar	TSNLGSQYLVDPLTSEVEKKEQVLEVVRTSFKPEFLNRLDDLTVVFAALTKPELERIAKLQ	780
Shaw	TSNLGSQYLVDPVTSQEKEQVLEVVRTSFKPEFLNRLDDLTVVFAALTKPELERIAKLQ	780
SspS10	TSNLGSQYLVDPVTSQEKEQVLEVVRTSFKPEFLNRLDDLTVVFAALTKPELERIAKLQ *****:**** * * **.:*****:*****:*****:*****:****: **.:***:***	780
Sliv	INGLARLAEERRLTLEVTDEALAWLAEEGNDPAYGARPLRRLVQTAIGDRLAREILSGEI	840
Schar	IERLAKRLAERRLTLDITPEALAWLAEEGMDPAYGARPLRRLVQSAIGDRLAKEILSGEI	840
Shaw	LERLAKRLAERRLTLDITPEALAWLAEEGMDPAYGARPLRRLVQSAIGDRLAKEILSGEI	840
SspS10	LERLAKRLAERRLSLDITPEALAWLAEEGMDPAYGARPLRRLVQSAIGDRLAKEILSGEI .: **.:*****:*.:* ***** *****:*****:*****:*****	840
Sliv	KDGDTRVDRVDFGDELIVGPASGKTL	865
Schar	KDGDTRVDRYGDDELIVGPATGKTL	865
Shaw	KDGDTRVDRFEDGLLVGPATGKTL	865
SspS10	KDGDTRVDRVEDGLLVGPATGKTL ***** * *:***:****	865

>*S. hawaiiensis clpC1*

atgttcgagagggtcaccgaccgcgcgcgggcggttgctcctggctcaggaagaagcccggatgctcaaccacaactacatcggcactgagcaca
tcctcctgggctgatccacgagggtgaagggtgctccgccaagcccttgagagcctcgggattcgtcagaggcggtccgccagcagggtgagga
gatcatcgccaggccagcaggccccgtccggccacatcccctcacccccgtccaagaaggtcctggagctgctcgtccggaggcccttcagc
tgggccacaactacatcgccacggagcacatcctgctcggcctgatccgagggcgaggcgctcgcgccaggctcctcgtcaagctgggagcaga
tctgaaccgctgcccagcaggatccagctgctcctcggtaccagggaaggagaccgcccggcggtcctgcccaggccaccctcc
acgtcctggtcctcgaccagtccgcccgaacctcaccaggcgctcgtgagtcacaagctcgaccggctatcgggcgagaaaggagatcgagc
gggtcatgcaggtgctgtcccggtagaagaacaaccgggtgctgtagctgagcccggcgtcggcaagaccgctgctgagggcctcgtca
ggccatgtaagggcgagggtcccagaccctcaaggacaagcacctctacaccctggacctcggcgccctggtcgcggctcccgtaccgggt
gacttcgaggagcctgaagaaggtcctcaaggagatccgaccccggcgacatcatcctgttcacgagctgcacacgctggtcggtgctg
gtgcccccaggcccatcgacggcgttccatcctgaaccgatgctggcccgggtgagctccagaccatcggtgccaccacgctggacgagta
ccgcaagcactggagaaggacgcccctcagcgcgcttccagccatccaggtcgcgaggccgctcctgcccacacgatcgagatcctcaag
ggctcgtcgggaccggtagcaggcccaccaccgcttccatcacggacaggcgctggtccaggccgcccctggccgaccgggtacatctcggacc
gctcctgcccggacaaggcgatcgacctgatcgacgaggccgctcaggatcgcatccgcccgatgaccgcccggacactgcgaggttca
cgagaagatcgcccggctccgcccagacaaggagtcggcgtatcgactcgaggacttcgagaaggccctcctcgcgacaaggagaagcagct
cctggcccgaaggccaagcgggagaaggagtggaaggccggcgacatggacgtcgtcgcgaggctgacggcgagctgatccggaggtcctc
ccacggcagccgcatcccgttcaagctgaccgaggaggagctcctcgtcgtcgtcgcgatggaggacgagctccacaagcgggtgatcgcca
ggtcgacgcccgtcaaggcgctgtagaaggcgatccgctgtagcgtcgggtctgaaggacccaagcggcgggtggtcgttcatctcgcggcc
cgtccggtgctgtagaagcagcttcaaggcgtcgcgaattcctctcggcgacgaggacgctgtagctccctcgacatgctggagttcagcg
agaagcacaggtctcgttctcgttcccccggctacgtgggtagcaggaggccgagctaccgagaaggctccgccaagccgtt
ctcggctgctgctgtagcaggctgagaaggcccaccggacatcttaactcgtcgtcagatcctggaggacggtcgctgacggactcccagg
gcccggctggtgactcaagaacacggtcatcatgacgaccaacctcggcaccgggacatctcaagggttcaacctgggcttcgcccag
ggcgacaccaagtccaactacgagcgcatgaagaacaaggctcggacgagctcaagcagcactcggcccaggttctcaaccgctgacgac
gtggtcgtctcccagctcagccaggccgacatctcaagatgctcgaactgatgatgacaagggtgacgagcctgaaggaccgggacatgg
gcatcgagctctcgtcgtcccaaggagctgcttcaagaaggctacgaccggctggtgctgctcgcctcgcacatccagcgcgag
atcgaggactcgtcgtcggagaagatcctcctcggcgagctcgcggcggtcacatcgtggtcgtgacacggaggcgaggcgagaccaagacct
tcacctccgcccggagagaaggcggtccttccgagctcccggcgtcagcagggcggcggtcggcccgaacctgagcaaggacgct
ga

> *S. hawaiiensis ClpC1*

MFERFTDRARRVVLAQEEARMLNHNHIGTEHILLGLIHGEGVAAKALESGLISLEAVRQQVEEIIQGQQAPSGHIPFT
PRAKKVLELSREALQLGHNYIGTEHILLGLIREGEGVAAQVLVKLGADLNVRVQQVIQLLSGYQGKETATAGGPAEGTPS
TSLVLDQFGRNLTQAARESKLDPVIGREKEIERVMQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQAIKGEVPELTKDKHL
YTLDLGALVAGSRYRGDFEERLKKVLKEIRTRGDIIIFIDELHTLVGAGAAEGAIDAASILKPM LARGELQTI GATTLDEYRK
HLEKDAALERRFQPIQVAEPLPHTIEILKGLRDRYEAHHRVSITDEALVQAATLADRYISDRFLPKAIDLIDEAGSRMRIR
RMTAPDLREFDEKIAGVRRDKESAIDSQDFEKAASLRDKEKQLLAAKAKREKEWKAGDMDVVAEVDGELIAEVLATAT
GIPVKLTHEESSLRLMEDELHKRVIGQVDAVKALSKAIRRTRAGLKDPRPGGSFIFAGPSGVKTELSKALAEFLFGDE
DALISLDMSEFSEKHTVSRLFSGPPGYVGYEEGGQLTEKVRKPFVSVLDFEVEKAHPDIFNSLLQILEDGRITDSQGRVV
DFKNTVIIMTTNLGTRDISKGFNLGFAAQGDTKSNYERMKNKVSDCLKQHFPEFLNVRDVLVFPQLSQADILKIVDL
MIDKVDRLKDRDMGIELSSAKELLSKKGYPVLGARPLRRTIQREIEDSLSEKILFGLRPGHIVVDTEGEGETKTFTFR
GEEKAALPDVPIEQAAGSGPNLSKDA

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: AJ15124.1), *S. chartreusis* NRRL 3882 (NCBI: SOR80030.1) und *S. sp. S10*(2016) (NCBI: AMW12082.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sliv	MFERFTDRARRVVVLAQEEARMLNHNHYIGTEHILLGLIHEGEGVAAKALESIGISLEAVR	60
Schar	MFERFTDRARRVVVLAQEEARMLNHNHYIGTEHILLGLIHEGEGVAAKALESIGISLEAVR	60
Shaw	MFERFTDRARRVVVLAQEEARMLNHNHYIGTEHILLGLIHEGEGVAAKALESIGISLEAVR	60
SspS10	MFERFTDRARRVVVLAQEEARMLNHNHYIGTEHILLGLIHEGEGVAAKALESIGISLEAVR	60

Sliv	QQVEEIIQGQQAPSIGHIPFTPRAKKVVLELSLREALQLGHNYIGTEHILLGLIREGEGVA	120
Schar	QQVEEIIQGQQAPSIGHIPFTPRAKKVVLELSLREALQLGHNYIGTEHILLGLIREGEGVA	120
Shaw	QQVEEIIQGQQAPSIGHIPFTPRAKKVVLELSLREALQLGHNYIGTEHILLGLIREGEGVA	120
SspS10	QQVEEIIQGQQAPSIGHIPFTPRAKKVVLELSLREALQLGHNYIGTEHILLGLIREGEGVA	120

Sliv	AQVLVLKLGADLNRVRQQVIQLLSGYQKGTATAGGPAEGTPTSLVLDQFGRNLTQAARE	180
Schar	AQVLVLKLGADLNRVRQQVIQLLSGYQKGTATAGGPAEGTPTSLVLDQFGRNLTQAARE	180
Shaw	AQVLVLKLGADLNRVRQQVIQLLSGYQKGTATAGGPAEGTPTSLVLDQFGRNLTQAARE	180
SspS10	AQVLVLKLGADLNRVRQQVIQLLSGYQKGTAAAGGPAEGTPTSLVLDQFGRNLTQAARE	180
*****;*****		
Sliv	SKLDPVIGREKEIERVMQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQAIKGEVPELTKD	240
Schar	SKLDPVIGREKEIERVMQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQAIKGEVPELTKD	240
Shaw	SKLDPVIGREKEIERVMQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQAIKGEVPELTKD	240
SspS10	SKLDPVIGREKEIERVMQVLSRRTKNNPVLIGEPGVGKTAVVEGLAQAIKGEVPELTKD	240

Sliv	KHLYTLDLGALVAGSRYRGDFEERLKKVLKEIRTRGDIILFIDELHTLVGAGAAEGAI	300
Schar	KHLYTLDLGALVAGSRYRGDFEERLKKVLKEIRTRGDIILFIDELHTLVGAGAAEGAI	300
Shaw	KHLYTLDLGALVAGSRYRGDFEERLKKVLKEIRTRGDIILFIDELHTLVGAGAAEGAI	300
SspS10	KHLYTLDLGALVAGSRYRGDFEERLKKVLKEIRTRGDIILFIDELHTLVGAGAAEGAI	300

Sliv	ASILKPLMARGELQTIGATTLDEYRKHLEKDAALERRFPQIQVAEPLPHTIEILKGLRD	360
Schar	ASILKPLMARGELQTIGATTLDEYRKHLEKDAALERRFPQIQVAEPLPHTIEILKGLRD	360
Shaw	ASILKPLMARGELQTIGATTLDEYRKHLEKDAALERRFPQIQVAEPLPHTIEILKGLRD	360
SspS10	ASILKPLMARGELQTIGATTLDEYRKHLEKDAALERRFPQIQVAEPLPHTIEILKGLRD	360

Sliv	RYEAHHRVSIIDEALVQAATLADRYISDRFLPKAIDLIDEAGSRMIRRMRTAPPDLREF	420
Schar	RYEAHHRVSIIDEALVQAATLADRYISDRFLPKAIDLIDEAGSRMIRRMRTAPPDLREF	420
Shaw	RYEAHHRVSIIDEALVQAATLADRYISDRFLPKAIDLIDEAGSRMIRRMRTAPPDLREF	420
SspS10	RYEAHHRVSIIDEALVQAATLADRYISDRFLPKAIDLIDEAGSRMIRRMRTAPPDLREF	420

Sliv	DEKIAGVRRDKESAIDSQDFEKAASLRDKEKQLLAAKAKREKEWKAGMDVVAEVDGELI	480
Schar	DEKIAGVRRDKESAIDSQDFEKAASLRDKEKQLLAAKAKREKEWKAGMDVVAEVDGELI	480
Shaw	DEKIAGVRRDKESAIDSQDFEKAASLRDKEKQLLAAKAKREKEWKAGMDVVAEVDGELI	480
SspS10	DEKIAGVRRDKESAIDSQDFEKAASLRDKEKQLLAAKAKREKEWKAGMDVVAEVDGELI	480

Sliv	AEVLATATGIPVFKLTEEESRLLRMEDELHKRVIGQVDVAVKALSKAIRRTRAGLKDPKR	540
Schar	AEVLATATGIPVFKLTEEESRLLRMEDELHKRVIGQVDVAVKALSKAIRRTRAGLKDPKR	540
Shaw	AEVLATATGIPVFKLTEEESRLLRMEDELHKRVIGQVDVAVKALSKAIRRTRAGLKDPKR	540
SspS10	AEVLATATGIPVFKLTEEESRLLRMEDELHKRVIGQVDVAVKALSKAIRRTRAGLKDPKR	540

Sliv	PGGSFIFAGPSGVGKTELSKALAEFLFGDEDALISLDMSEFSEKHTVSRLFSGPPGVVGY	600
Schar	PGGSFIFAGPSGVGKTELSKALAEFLFGDEDALISLDMSEFSEKHTVSRLFSGPPGVVGY	600
Shaw	PGGSFIFAGPSGVGKTELSKALAEFLFGDEDALISLDMSEFSEKHTVSRLFSGPPGVVGY	600
SspS10	PGGSFIFAGPSGVGKTELSKALAEFLFGDEDALISLDMSEFSEKHTVSRLFSGPPGVVGY	600

Sliv	EEGGQLTEKVRKPFVSVLFDVEVEKAHPDIFNSLLQILEDGRLTDSQGRVVDVFNKNTVIIM	660
Schar	EEGGQLTEKVRKPFVSVLFDVEVEKAHPDIFNSLLQILEDGRLTDSQGRVVDVFNKNTVIIM	660
Shaw	EEGGQLTEKVRKPFVSVLFDVEVEKAHPDIFNSLLQILEDGRLTDSQGRVVDVFNKNTVIIM	660
SspS10	EEGGQLTEKVRKPFVSVLFDVEVEKAHPDIFNSLLQILEDGRLTDSQGRVVDVFNKNTVIIM	660

Sliv	TTNLGTRDISKGFNLGFAAAGDTKSNYERMKNKVSDELKQHFREPEFLNRVDDVVVFPQLS	720
Schar	TTNLGTRDISKGFNLGFAAAGDTKSNYERMKNKVSDELKQHFREPEFLNRVDDVVVFPQLS	720
Shaw	TTNLGTRDISKGFNLGFAAAGDTKSNYERMKNKVSDELKQHFREPEFLNRVDDVVVFPQLS	720
SspS10	TTNLGTRDISKGFNLGFAAAGDTKSNYERMKNKVSDELKQHFREPEFLNRVDDVVVFPQLS	720

Sliv	QDDILQIVDLMIQKVDERLKDMDGIELSQAPELLSKRGYDPVLGARPLRRTIQREVED	780
Schar	QDDILQIVDLMIQKVDERLKDMDGIELSQAPELLSKRGYDPVLGARPLRRTIQREVED	780
Shaw	QDDILQIVDLMIQKVDERLKDMDGIELSQAPELLSKRGYDPVLGARPLRRTIQREVED	780
SspS10	QDDILQIVDLMIQKVDERLKDMDGIELSQAPELLSKRGYDPVLGARPLRRTIQREVED	780
* **.;*****.*****.;*****.*;*****.*****.*;		

Sliv	SLSEKILFGELRPGHIVVVDTEGEGDAATFTFRGEEKSTLPDVPPIEQAAGGAGPNLSKE	840
Schar	SLSEKILFGELRPGHIVVVDTEGEGETKTFTFRGEEKSALPDVPPIEQAAGGTGNLSKD	840
Shaw	SLSEKILFGELRPGHIVVVDTEGEGETKTFTFRGEEKAAALPDVPPIEQAAGGSGPNLSKD	840
SspS10	SLSEKILFGELRPGHIVVVDTEGEGETKTFTFRGEEKAAALPDVPPIEQAAGGTGNLSKD	840
	*****:;*****:*****:*****:	

Sliv	A	841
Schar	V	841
Shaw	A	841
SspS10	A	841

>*S. hawaiiensis* *clpC2*

atgagcagcggcttcaccagcccggaggctacggctcggatcccttcggagaattcctcgcacgcttctcggcggaccgctcccgggtcccggca
gatgatctcggggcggtgctcagtcagccggcccgggagctcgtccggcgccgcccagtcagccgagcagcggcagccgggacctgcacac
gcagcatctgctcggggcggtcgtccaccgagcccaccgaccctgctcagcaaggcggcgcaatcccactcactggcgtcgcagatcgac
gaccggtcgggaccgcccagcacagcgggacgagcgtccccaccaccgacctctccctcaccggcgccaagcgggacctgctggagcgcg
cacgacatggcccgggcccggctacggctacatcgcccggagcagctgctgagcgcctggcgtcgaaccccgactcggcgccggggcacatc
ctcaacggcccgtctcggcccctcgaaccgcccgggagcgggagatgcccagtcagcggcgccgacgaacacgcccaccctcgac
aagtacggccgtgacctaccgagctggcccggcagggcggatcgaccgggtgatcggccgggacgaggagatcgagcagaccgtcgaggtcctc
tcccggcgggcaagaacaaccgggtgctcatcggtgacgcccggcgtcgcaagacggccatcgtggaggggctggcgacgcatctcggagcgcg
gacgtgccgacgtgctgatcggggcggcgtgctgcccggacactgacgggagtggtcgcgggcacccgctaccggggtgacttcgaggagcggg
tgaacaacatcgtggggagatccgcccactccgaccagctgatcatcttcagcagagctgcacaggtcgtggggcggggctcgggtggcgg
cgacggcagctcgtggagcgggcaacatcctcaagccggccctggcccggggcgagctgcacatcgtgggcccaccacgctggaggagtaccg
ccggatcgagaaggagcggcgctggcccggcgttcagccgatcatggtgcccggagccgaccgcccggagcgcagatcgagatcctgcgcggcct
gcaggaccgctacgagggcccaccaccaggtccgctacaccgacgagggccctggtcacggccgtggagctgctggaccgctacctaccgcccgcgt
ctgcccacaaggcagatcgacctgatcgaccaggcgggtgcccgggtgcccgtgcccggcccggaccaagggcacggagctgcccggcctggagcg
ggagctggagcagctgaccgggacaaggaccaggcggctcgggacgagagttacgagcaagccaccagttgctgcgaccgagatcgtggagctga
agcagcggatcaccgcccggcggtgaggtcgaagggcagggacctggtggtcggggccgaggcagatcgccgaggtggtgtcccgg
cagaccggcatcccgtcagcagcctaccaggaggagaaggaccgttctgctggcctggaggagcagctgcaccagcgggtggtcggccaggac
gaggccgtcgggtgctcctggagcgggtgctgctcccgcgggctcgcgtctcccgaccggcagatggcagtttctgcttctcggcccggacg
ggcgtcggcaagaccgaactggcccggcgctcggcagggccctgttcggcagcagggaccgagctggcgcctcagatgagcaggtaccaggag
cggcacaccgctcagccggtgatcggcgccccggcgggttacgtcggccacgaggagggccagctcaccagggtcgtgcccggcaccgctact
cgctgctcctgctggagcaggtggagaaggcccaccggagcttcaacatcctgctcaggtcctcagcagcggcggctgaccgactcgcaggg
ccgacgggtggactcagcaacaggtcatcgtgatgacgagcaacctcggctcggaggcagatcaccgcccggggcgccacgagggctcgcggc
ggcgggcgccgacggcagggagggcccggcgagcagatcctgcccgtcgcgagcacttcccggagttctcaaccgcatcgacgag
atcgtcgtctccgagctcaccagggcaactcgccggatcaccaacctcctgctggaccgaccgctccctggtgcagagcaagggcgtcac
ggtga

>*S. hawaiiensis* *ClpC2*

MSSGFTSPEGYGSDPFGEFLARFFGGPRPGPRQIDLGRLLSQPARELVRGAAQYAAEHGSRDLDTQHLLRAALATEPRT
LLSKAGANPDSLASQIDDRSGPAQHPTDAPPPTALSPTPAKRALLDAHDMARARGYGYIGPEHVLASALSNPDSAAG
HILNAARFAPSEPPEAPEMPQSERPRPTNTPTLDKYGRDLTELARQGRIDPVIQRDEEIEQTVVLSRRGKNNPVLLIGDAG
VGKTAIVEGLAQRISEADVDPVLIARRVVALDLTGAVAGTRYRGDFEERMNNIVGEIRAHSDQLIIFIDELHTVVGAGSGG
GDGSSMDAGNILKPALARGELHIVGATTLEEYRRIEKDAALARRFQPIIMVPEPTAADAIEILRGLQDRYEAAHQVRYTDE
ALVTAVELSDRYLTARRLPDKAIDLIDQAGARVRLRARTKGTDVRLERERELEQLTRDKDQAVADESYEQATQLRDRIVDVK
QRITAAGGDGEVDEGQDLVVGAEIAIEVVSRTGIPVSSLTQEEKDRLLGLEHLHQRVVGQDEAVRVVSDAVLRSRAG
LASPDRPIGSFLFLGPTGVGKTELARALAEALFGSEDRMVRLDMSEYQERHTVSRILGAPPGYVGHHEAGQLTEVRRHP
YSLLLLDEVEKAHPDVFNILLQVLDDGRLTDSQGRVDFSNVIVMSTNLGSEAITRRGATTGFAAGGADADEEARREQL
RPLREHFRPSSASTRSSSSASSPRSNACGSPSCTWTAPAPWCRARASR

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: EFD65637.1), *S. chartreusis* NRRL 3882 (NCBI: SOR78015.1) und *S. sp.* S10(2016) (NCBI: AMW13903.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sliv	MTSGYMGPEG--DPFAEFLARFFGGPR--PRQIDIGRLLSQPARELVRGAAQYAAEHGS	55
Shaw	MSSGFTSPGYGSDPFGEFLARFFGGPRPGPRQIDLGRLLSQPARELVRGAAQYAAEHGS	60
Schar	MSSGFTSPGYGSDPFGEFLARFFGGPRPGPRQIDIGRLLSQPARELVRGAAQYAAEHGS	60
SspS10	MSSGFTSPGYGSDPFGEFLARFFGGPRPGPRQIDLGRLLSQPARELVRGAAQYAAEHGS	60
	::* .*** ***.***** *****:*****	
Sliv	RDLDEHLLRAALATEPTRGLLSRAGADPDSLASQIDERTGPVQHPPGEVPPPTSLSLTP	115
Shaw	RDLDTQHLLRAALATEPTRLLSKAGANPDSLASQIDDRSGPAQHTPDDAPPPTALSITP	120
Schar	RDLDEHLLRAALATEPTRLLSKAGANPDSLASQIDERSGPAQHTPDDAPPPTALSITP	120
SspS10	RDLDTQHLLRAALATEPTRLLSKAGANPDSLASQIDDRSGPAQHRPDDAPPPTALSITP	120
	*****:***** ***.***:*****:*.**.* *.:.***:*****	
Sliv	AVKRALLDAHELARSTGTGYIGPEHVLSALANPDSAAGHILNAARFAPSNLPTETPEAA	175
Shaw	AAKRALLDAHDMARARGYGYIGPEHVLSALANPDSAAGHILNAARFAPSEPEA-PEM-	178
Schar	AAKRALLDAHDMARARGYGYIGPEHVLSALANPDSAAGHILNAARFAPSEPEA-PEA-	178
SspS10	AAKRALLDAHDMARARGYGYIGPEHVLSALANPDSAAGHILNAARFAPSEPEA-QEV-	178
	*.*****:*.**.* *****:*****:*****:*	
Sliv	KGRTESARTNTPTLDKYGRDLTDLAQQGRIDPVIREEIEQTVVLSRRGKNNPVLIG	235
Shaw	-PQSERPRPTNTPTLDKYGRDLTELARQGRIDPVIGRDEEIEQTVVLSRRGKNNPVLIG	237
Schar	-PQAEPRPTNTPTLDKYGRDLTELARQGRIDPVIGRDQIEQTVVLSRRGKNNPVLIG	237
SspS10	-PQSERPRPTNTPTLDKYGRDLTELARQGRIDPVIGRDQIEQTVVLSRRGKNNPVLIG	237
	::* * *****:*.***:*****:*****:*****	
Sliv	DAGVGKTAIVEGLAQRITDGDVDPVLI GRRVVALDLTGVVAGTRYRGDFEERMNIIVGEI	295
Shaw	DAGVGKTAIVEGLAQRISEADVDPVLI GRRVVALDLTGVVAGTRYRGDFEERMNIIVGEI	297
Schar	DAGVGKTAIVEGLAQRITDGDVDPVLI GRRVVALDLTGVVAGTRYRGDFEERMNIIVGEI	297
SspS10	DAGVGKTAIVEGLAQRITDGDVDPVLI GRRVVALDLTGVVAGTRYRGDFEERMNIIVGEI	297
	*****:*****:*.***:*****:*****:*****:*****	
Sliv	RAHSDELIIFIDELHTVVGAGG-GGESGSM DAGNILK PALARGELHIVGATTLEEYRRIE	354
Shaw	RAHSDQLIIFIDELHTVVGAGSGGGDGSMDAGNILK PALARGELHIVGATTLEEYRRIE	357
Schar	RAHSDQLIIFIDELHTVVGAGAGGGDGSMDAGNILK PALARGELHIVGATTLEEYRRIE	357
SspS10	RAHSDQLIIFIDELHTVVGAGSGGGDGSMDAGNILK PALARGELHIVGATTLEEYRRIE	357
	*****:*****:*.***:*****:*****:*****:*****	
Sliv	KDAALARRFPQIMVPEPTADAIEILRGLDRYEAAHQVRYTDEALVAAVEMSDRYLTDR	414
Shaw	KDAALARRFPQIMVPEPTADAIEILRGLQDRYEAAHQVRYTDEALVAVELSDRYLTAR	417
Schar	KDAALARRFPQIMVPEPTADAIEILRGLQDRYEAAHQVRYTDEALVAVELSDRYLTDR	417
SspS10	KDAALARRFPQIMVPEPTADAIEILRGLQDRYEAAHQVRYTDEALVAVELSDRYLSDR	417
	*****:*****:***** *****:*****:*****:***:*****:*	
Sliv	RLPDKAIDLIDQAGARVRLRARTKGT DVRALEREVDQLVRDKDQAVADEQYEQATQLRDR	474
Shaw	RLPDKAIDLIDQAGARVRLRARTKGT DVRALERELEQLTRDKDQAVADESYEQATQLRDR	477
Schar	RLPDKAIDLIDQAGARVRLRARTKGT DVRAMERELEQLTRDKDQAVADEQYEQATQLRDR	477
SspS10	RLPDKAIDLIDQAGARVRLRARTKGT DVRALERELEQLTRDKDQAVADEQYEQATQLRDR	477
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	IVGLKQRITTEATGDGQADEGLDLVVDTESIAEVVSRQTGIPVSSLTQEEKDRLLGLESHL	534
Shaw	IVDVKQRIITAAGDGEVDEGQDLVVGAEATAEVVSRQTGIPVSSLTQEEKDRLLGLEEHL	537
Schar	IVELKLRITQAGGEGEIDEGQDLVVGAEATAEVVSRQTGIPVSSLTQEEKDRLLHLEEHL	537
SspS10	IVDVKQRIITAEAGDSEVDEGQDLVVGAEATAEVVSRQTGIPVSSLTQEEKDRLLGLEEHL	537
	** :* ** * * :*.*** ** * ** * :*.***:*****:*****:***** **.*	
Sliv	HERVVQDEAVRVVSDAVLRSRAGLSSADRP IGSFLFLGPTGVGKTELARALAEALFGSE	594
Shaw	HQRVVQDEAVRVVSDAVLRSRAGLSPDR IGSFLFLGPTGVGKTELARALAEALFGSE	597
Schar	HERVVQDEAVRVVSDAVLRSRAGLSPDR IGSFLFLGPTGVGKTELARALAEALFGSE	597
SspS10	HERVVQDEAVRVVSDAVLRSRAGLAAPDR IGSFLFLGPTGVGKTELARALAEVLFGSE	597
	*.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	DRMVRDMSEYQERHTVSRVLGAPPYVGHHEEAGQLTEVVRHPYSLLLDEVEKAHPDV	654
Shaw	DRMVRDMSEYQERHTVSRVLGAPPYVGHHEEAGQLTEVVRHPYSLLLDEVEKAHPDV	657
Schar	DRMVRDMSEYQERHTVSRVLGAPPYVGHHEEAGQLTEVVRHPYSLLLDEVEKAHPDV	657
SspS10	DRMVRDMSEYQERHTVSRVLGAPPYVGHHEEAGQLTEVVRHPYSLLLDEVEKAHPDV	657
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	FNILLQVLDGRLTDSQGRTVDFSNVVMVMTSNLGS DVI TRRGAGIGFGAGGADEDEEAR	714
Shaw	FNILLQVLDGRLTDSQGRTVDFSNVIVMTSNLGS EAITRRGATTGFAAGGADADEEAR	717
Schar	FNILLQVLDGRLTDSQGRTVDFSNVIVMTSNLGS EIVTRRGASVGFASGGADADEEAR	717
SspS10	FNILLQVLDGRLTDSQGRTVDFSNVIVMTSNLGS EAITRRGATTGFAAGGADADEEAR	717
	*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	REQVLRPLREHFRPEFLNRVDEIVVFRQLS GEQLRQITSLLEQTRRMVHAQGVTVDFTD	774
Shaw	REQILRPLREHFRPSSSTASTRSSASS-----PR--SNCAGS-----	754
Schar	REQILRPLREHFRPEFLNRIDEIVVFRQLSTEQLRRITNLLDRTRSLVRSGKISVTFTD	777
SspS10	REQILRPLREHFRPEFLNRIDEIVVFRQLTTEQLRRITNLLDRTRSLVQHKGVTVTFTD	777
	.*:***:*****:*****:*****:*****:*****	
Sliv	AAVDWLAERGYQPEYGARPLRRTIQREVDNELSRLLLDGRV AEGGRVTV DVEDGRLAFRT	834
Shaw	PTSCWTAPAPWCRARASR-----	772
Schar	RAVEWLADHGYQPEYGARPLRRTIQREVDNELSRLLLDGRVSEGGRTV DVEDGHLAFRT	837
SspS10	RAVEWLADRGYQPEYGARPLRRTIQREVDNELSRLLLDGRVSEGGRTV DTDADGHLTFQT	837
	: * * * * :*.***	

Sliv	PERPVPEP	842
Shaw	-----	772
Schar	QETPPAEL	845
SspS10	PSSAAPS-	844

>*S. hawaiiensis clpC4*

atgttcgagcgggtcacgcaagacgccccgggaagtggggaagagcgcgtacgcgcgtacgtggacgggggtggtagggcgggcagtgctggagccg
gagcatctgctgctggcactgctcaccgggagggcagtcgctgggtccttcgcctcgcctcctcgggctcggtagcggcgggagtcctgctggga
ggcactgctgtagggcgggcgggccggggctgacgcaggccgagaccgacgcctcgcgggctggggatgcacgtggaggagatcctgctccc
gggtggaggagacgacggggctcgggtccctggccggcaccgcaaggacaagcggtgggtggctgggcccggacctcctcggccgggggtccaag
gacgtgctggagcgtccttgcggctcgtctcgcacagcgggaccggcacatcggggagcagcacatcctgctggcctgacctgcgccccgggtg
ccggccgaggtcctcggcaccacggggtgacgtacgctccctggtgctgtacggcagtggtggcgaggccaagccggctga

>*S. hawaiiensis ClpC4*

MFERFTQDAREVVKSAHVDGGGEGGQCVEPEHLLALLDREGSRGSFALAALGLGERRESVREALREARRRAGLTQA
ETDALAGLGDVEEIVARVEETHGVGALAGDRKDKRWWSGRTSFRGAKDVLERSLRVALAQRDRHIGDEHILLALTRP
GVPAEVLADHGVTYASLVRVLYGSGGEAKAG

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: EFD66777.1), *S. chartreusis* NRRL 3882 (NCBI: SOR79140.1) und *S. sp. S10(2016)* (NCBI: AMW12821.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

Sliv	MFERFTK DARAVVQGAAGHAEAA--RAETVEPEHLLALLDREGSRGSFALAALGVGEHR	58
Schar	MFERFTK DARSVVKALASVEGGG-GGQVVEPEHLLALLDREGSRGSFALAALGLPERR	59
Shaw	MFERFTQ DAREVVKSAHVDGGGEGGQCVEPEHLLALLDREGSRGSFALAALGLGERR	60
SspS10	MFERFTK DARDVVKSAHVDGGGEGGQVVEPEHLLALLDREGSRGSFALAALGLGERR	60
	*****:* **:* . .: . .: *****.*****: *:*	
Sliv	DAVRRELGDARRRAGLSQSETEALAGLGDVTEIVARVEEAHGVGAMSDRRKRGRWSG	118
Schar	ESVRQALGEARRRAGLSQAETDALAGLGDVEEIVARVEEVHGVGAMAGD-RKDKGWVFG	118
Shaw	ESVREALREARRRAGLTQAETDALAGLGDVEEIVARVEETHGVGALAGD-RKDKRWWSG	119
SspS10	ESVREALREARRRAGLTQAETDALAGLGDVEEIVARVEEAHGVGALAGD-RKDKRWWSG	119
	::* * .*****:*:*:***** *****.*****:* * * * *	
Sliv	HRSFSGAKEVLEKALRVAVARRDRHIGDEHLLALLALRPGVPAEVLADHGVTASLSRV	178
Schar	RASFGRGAKDVLERSLRVALAQRDRHIGDEHILLALTVRPGVPAEVLADHGVTYESVVRV	178
Shaw	RTSFGRGAKDVLERSLRVALAQRDRHIGDEHILLALTRPGVPAEVLADHGVTYASLVRV	179
SspS10	RTSFGRGAKDVLERSLRVALAQRDRHIGDEHILLALTRPGVPAEVLADHGVTYEHVLRV	179
	: * .***:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:*:* * : **	
Sliv	LDEGAGKSCA-	188
Schar	LYGSGGEAKAG	189
Shaw	LYGSGGEAKAG	190
SspS10	LYGSGGEAKAG	190
	* .*:*: *	

>*S. hawaiiensis clpC5*

atgacgaaccccgacaccacgtcatccatcctcgtcgcagcctcatcgcggccatcaagaaggtccaccggagccgctcgcaccgctccaggacg
cggtagcgcggaccacctggcgagctggccgaccacgtatcggccactcgtcgcaccaggcccggcgtcggcgctcctggaccgacat
cggcaagagcatgggctcaccggcaggccgcccagaagcggttctgcccgaaggagtcggccgacctcgcaccgagccagggcttaaccgata
cagccgcgccccgacgcggtgatggcgccgcaacgcgtccaaggccgcccacaacgaggggcctgcccagcacctcgttctggcct
gctggccgaacccgaggactcgcgcgaaggcgtatcgcagcggcgctcctcgcagcggctccgcccggccacggcgctcccgc
cgccgtcgcagaggtccggagctggtgccgtacggccaggcccaagaaggtcctggagctcacctcgcgaggccctcgcctcggccacaac
tacatcggcaccgagcacctcgtcgcctgctggagcagcagaacggccaggcgctcctcagcggcctgggcatggcaaggagcggaccgag
cagtacgtcaggggtgctggagaagatcgcgcaggcacaggagaactgctcgcaggtcctga

>*S. hawaiiensis ClpC5*

MTNPDTTSSIRLDDLIAIKKVHPEPLDQLQDAVIAADHLGDVADHLIGHFVDQARRSGASWTDIGKSMGVTRQAAQK
RFVPKESADLDPSQGFNRYTPRARSVMAAHNASKAAHNAEGLPEHLVLLGLAEPEGLAAKAVEQGVSLDAVRAAATA

ALPPAVDEVPELVYPYGOAAKKVLELTFREALRLGHNYIGTEHLLALLEHENGGQVLSGLGIGKERTEQYVTRVLEKIAQA
QENVLDES

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: AII15065.1), *S. chartreusis* NRRL 3882
(NCBI: SOR80094.1) und *S. sp. S10(2016)* (NCBI: AMW12028.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
Sliv      MTNPNPITSSVRLDELITAIAIKKVHPEPLEQLQDAVIAGEHLGGEVADHLIGHFVDQARRSG      60
Schar    MTNPNPITSSVRLDDLIAAIKKVHPEPLEQLQDAVLAADHLGGEVADHLIGHFVDQARRSG      60
Shaw     -MTNPDTTSSIRLDDLIAAIKKVHPEPLDQLQDAVIAADHLGGEVADHLIGHFVDQARRSG      59
SspS10   -MTNPDTTSSIRLDDLIAAIKKVHPEPLDQLQDAVIAADHLGGEVADHLIGHFVDQARRSG      59
          ***.***:***:***:*****   ***:*****:*.***:*****:*****

Sliv      ASWTDIGKSMGVTRQAAQKRFPVKESADLDAGQGFSTRYTPRARNVVMAHNAAKTAGNAE      120
Schar    ASWTDIGKSMGVTRQAAQKRFPVKESADLDPSQGFNRYTPRARNTVMAHNAAKSARNAE      120
Shaw     ASWTDIGKSMGVTRQAAQKRFPVKESADLDPSQGFNRYTPRARSVMMAHNASKAAHNAE      119
SspS10   ASWTDIGKSMGVTRQAAQKRFPVKESNDLDPQGFDRYTPRARNTVMAHTASKAARNAE      119
          *****:***:***:***   *** ** .***.*****.***:***:***

Sliv      GLPEHLVGLVTERESLSAKAIAAQQVTLDAIHEAATAALPPAAAEVPELVYPYGPAACKV      180
Schar    GTPEHLVGLLAEFDGLAALVEQGVSLDTRAAATAALPPAVEEAEPELVYPYGOAAKKV      180
Shaw     GLPEHLVGLLAEPEGLAALVEQGVSLDAVRAAATAALPPAVDEVPELVYPYGOAAKKV      179
SspS10   GLPEHLVGLLAEFDGLAALIKQGVSLDAVREATAALPPALDEVPELVYPYGOAAKKV      179
          * *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

Sliv      LETTFREALRLGHNYIGTEHILLALLEHEHGGVLSGLGDKATERVVDVAEAFIHLT      240
Schar    LETTFREALRLGHNYIGTEHILLALLEHENGGVLSGLGDKATERVVAEAELEKITQAAQ      240
Shaw     LETTFREALRLGHNYIGTEHLLALLEHENGGVLSGLGDKERTEQYVTRVLEKIAQAQ      239
SspS10   LETTFREALRLGHNYIGTEHILLALLEHENGGVLSGLGDKERAEQYVGAVLEKIMQAQ      239
          *****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***

Sliv      EKAEKAGASGEGGAAGEAAGEA      262
Schar    KEVLDES-----      247
Shaw     ENVLDES-----      246
SspS10   KETDEA-----      245
          :.:. .
```

> *S. hawaiiensis* *clpS*

```
ATGGGCGAGTGTGACGTCACCCGCGCCCTGGAGATCGAACGCAACCGGTCACCTCATGAGCTATGTGACGTACGTCTTC
CGAGCCGGACGTCCTCGTGGGTACCATCGTCCACAACGACCCGGTCAACCTCATGAGCTATGTGACGTACGTCTTC
CAGTCGACTTTCGCTACTCCAAGGACAAGGCCACCAAGCTCATGCTCGACGTCCACCACAAGGGCCGGGGCGGTC
GTCTCCAGCGGCAGCCGCGAGGAGATGGAACGCGACGTGCAGGCCATGCACGGCTACGGCCTGTGGGCCACCCT
CCAGCAGGACCGCAAGTAG
```

> *S. hawaiiensis* *ClpS*

```
MGSVTSAPALEIERTESAEEVFVAVPEPDVWPVVTIVHNDPVLNMSYVTVFQSYFGYSKDKATKMLLDVHHKGRAVVSSG
SREEMERDVQAMHGYGLWATLQQDRK
```

Alignment mit Homologen aus *S. lividans* TK 24 (NCBI: EFD68983.1), *S. chartreusis* NRRL 3882
(NCBI: SOR81521.1) und *S. sp. S10(2016)* (NCBI: AMW10759.1).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```
Sliv      MGCVTAAPMEIEKTESAEEVFVAVPEPDVWPVVTIVHNDPVLNMSYVTVFQSYFGYSKDK      60
Shaw     MGSVTSAPALEIERTESAEEVFVAVPEPDVWPVVTIVHNDPVLNMSYVTVFQSYFGYSKDK      60
SspS10   MGSVTSAPALEIERTESAEEVFVAVPEPDVWPVVTIVHNDPVLNMSYVTVFQSYFGYSKDK      60
Schar    MGSVTSAPALEIERTESAEEVFVAVPEPDVWPVVTIVHNDPVLNMSYVTVFQSYFGYSKDK      60
          **.*: **.*:***:***:*****:*****:*****:*****:*****

Sliv      ATKLMMDVHHKGRAVVSSGSREEMERDVQAMHGYGLWATLQQDRK      105
Shaw     ATKLMMDVHHKGRAVVSSGSREEMERDVQAMHGYGLWATLQQDRK      105
SspS10   ATKLMMDVHHKGRAVVSSGSREEMERDVQAMHGYGLWATLQQDRK      105
Schar    ATKLMMDVHHKGRAVVSSGSREEMERDVQAMHGYGLWATLQQDRK      105
          *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****
```

6.4 GenBank-Zugangsnummern (Accession Numbers)

Streptomyces lividans TK24: NCBI NZ_CP009124

Streptomyces coelicolor A3(2): NCBI NC_003888

Streptomyces chartreusis NRRL 3882: NCBI NZ_LT962942

Streptomyces sp. S10(2016): NCBI CP015098

Streptomyces muensis = *Streptomyces* sp. DSM 40835:

Griselimycin-Biosynthesegencluster NCBI KP211414

Streptomyces hawaiiensis NRRL 15010:

ADEP-Biosynthesegencluster NCBI MK047367

putative Dehydratase NCBI MK047368

putative MaoC-Familie-Dehydratase NCBI MK047369

putative Pyrrolin-5-carboxylat-Reduktase NCBI MK047370

clpP1clpP2 Operon NCBI MK047371

clpP3P4 Operon NCBI MK047372

clpP5 NCBI MK047373

6.5 Literaturverzeichnis

- Ahyoung, A. P., Koehl, A., Vizcarra, C. L., Cascio, D., and Egea, P. F. (2016). Structure of a putative ClpS N-end rule adaptor protein from the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* 25, 689–701. doi:10.1002/pro.2868.
- Akopian, T., Kandrór, O., Raju, R. M., Unnikrishnan, M., Rubin, E. J., and Goldberg, A. L. (2012). The active ClpP protease from *M. tuberculosis* is a complex composed of a heptameric ClpP1 and a ClpP2 ring. *EMBO J.* 31, 1529–1541. doi:10.1038/emboj.2012.5.
- Anagnostopoulos, C., and Spizizen, J. (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81, 741–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561900> [Accessed March 21, 2018].
- Andersson, F. I., Tryggvesson, A., Sharon, M., Diemand, A. V, Classen, M., Best, C., et al. (2009). Structure and function of a novel type of ATP-dependent Clp protease. *J. Biol. Chem.* 284, 13519–13532. doi:10.1074/jbc.M809588200.
- Angert, E. R. (2005). Alternatives to binary fission in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 214–224. doi:10.1038/nrmicro1096.
- Baltz, R. H. (2011). Function of MbtH homologs in nonribosomal peptide biosynthesis and applications in secondary metabolite discovery. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 1747–1760. doi:10.1007/s10295-011-1022-8.
- Bellier, A., Gominet, M., and Mazodier, P. (2006). Post-translational control of the *Streptomyces lividans* ClgR regulon by ClpP. *Microbiology* 152, 1021–1027. doi:10.1099/mic.0.28564-0.
- Bellier, A., and Mazodier, P. (2004). ClgR, a novel regulator of *clp* and *lon* expression in *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* 186, 3238–3248. doi:10.1128/JB.186.10.3238-3248.2004.
- Bennett, P. M., Grinsted, J., and Richmond, M. H. (1977). Transposition of TnA does not generate deletions. *Mol. Gen. Genet.* 154, 205–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/331086> [Accessed July 8, 2016].
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 62, 293–300. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14888646> [Accessed July 8, 2016].
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *J. Bacteriol.* 186, 595–600. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729683> [Accessed July 8, 2016].
- Bilyk, O., Brötz, E., Tokovenko, B., Bechthold, A., Paululat, T., and Luzhetskyy, A. (2016). New simocyclinones: Surprising evolutionary and biosynthetic insights. *ACS Chem. Biol.* 11, 241–250. doi:10.1021/acscchembio.5b00669.
- Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. V (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Bolanos-Garcia, V. M., and Davies, O. R. (2006). Structural analysis and classification of native proteins from *E. coli* commonly co-purified by immobilised metal affinity chromatography. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1760, 1304–1313. doi:10.1016/j.bbagen.2006.03.027.
- Böttcher, T., and Sieber, S. A. (2008). β -lactones as specific inhibitors of ClpP attenuate the production of extracellular virulence factors of *Staphylococcus aureus*. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 14400–14401. doi:10.1021/ja8051365.
- Böttcher, T., and Sieber, S. A. (2009). Structurally refined β -lactones as potent inhibitors of devastating bacterial virulence factors. *ChemBioChem* 10, 663–666. doi:10.1002/cbic.200800743.
- 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.

doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3.

- Bradford, P. A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933–951. doi:10.1128/CMR.14.4.933.
- Brötz-Oesterhelt, H., Beyer, D., Kroll, H.-P., Endermann, R., Ladel, C., Schroeder, W., et al. (2005). Dysregulation of bacterial proteolytic machinery by a new class of antibiotics. *Nat. Med.* 11, 1082–1087. doi:10.1038/nm1306.
- Brötz-Oesterhelt, H., and Sass, P. (2014). Bacterial caseinolytic proteases as novel targets for antibacterial treatment. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 23–30. doi:10.1016/j.ijmm.2013.09.001.
- Butler, M. S., Blaskovich, M. A. T., and Cooper, M. A. (2016). Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 70, 3–24. doi:10.1038/ja.2013.86.
- Campbell, N. A., Reece, J. B., Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., et al. (2010). *Biology*. 10th ed. Pearson doi:10.1007/s13398-014-0173-7.2.
- Carney, D. W., Compton, C. L., Schmitz, K. R., Stevens, J. P., Sauer, R. T., and Sello, J. K. (2014a). A simple fragment of the cyclic acyldepsipeptides is necessary and sufficient for ClpP activation and antibacterial activity. *ChemBioChem* 15, 2216–2220. doi:10.1016/j.micinf.2011.07.011.Innate.
- Carney, D. W., Schmitz, K. R., Truong, J. V., Sauer, R. T., and Sello, J. K. (2014b). Restriction of the conformational dynamics of the cyclic acyldepsipeptide antibiotics improves their antibacterial activity. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 1922–1929. doi:10.1021/ja410385c.
- Challis, G. L., Ravel, J., and Townsend, C. A. (2000). Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem. Biol.* 7, 211–224. doi:10.1016/S1074-5521(00)00091-0.
- Chater, K. F. (1993). Genetics of differentiation in *Streptomyces*. *Annu. Rev. Microbiol.* 47, 685–713. doi:10.1146/annurev.mi.47.100193.003345.
- Christiansen, G., Philmus, B., Hemscheidt, T., and Kurmayer, R. (2011). Genetic variation of adenylation domains of the anabaenopeptin synthesis operon and evolution of substrate promiscuity. *J. Bacteriol.* 193, 3822–3831. doi:10.1128/JB.00360-11.
- Cobb, R. E., Wang, Y., and Zhao, H. (2015). High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system. *ACS Synth. Biol.* 4, 723–728. doi:10.1021/sb500351f.
- Conlon, B. P., Nakayasu, E. S., Fleck, L. E., Lafleur, M. D., Isabella, V. M., Coleman, K., et al. (2013). Activated ClpP kills persisters and eradicates a chronic biofilm infection. *Nature* 503, 365–370. doi:10.1038/nature12790.
- Cundliffe, E., and Demain, A. L. (2010). Avoidance of suicide in antibiotic-producing microbes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37, 643–672. doi:10.1007/s10295-010-0721-x.
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., et al. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457–461. doi:10.1038/nature10388.
- D’Costa, V. M., McGrann, K. M., Hughes, D. W., and Wright, G. D. (2006). Sampling the antibiotic resistome. *Science (80-.)*. 311, 374–377. doi:10.1126/science.8153624.
- De Crécy-Lagard, V., Servant-Moisson, P., Viala, J., Grandvalet, C., and Mazodier, P. (1999). Alteration of the synthesis of the Clp ATP-dependent protease affects morphological and physiological differentiation in *Streptomyces*. *Mol. Microbiol.* 32, 505–517. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01364.x.
- Demidyuk, I. V., Shubin, A. V., Gasanov, E. V., and Kostrov, S. V. (2010). Propeptides as modulators of functional activity of proteases. *Biomol. Concepts* 1, 305–322. doi:10.1515/bmc.2010.025.

- Derrien, B., Majeran, W., Effantin, G., Ebenezer, J., Friso, G., van Wijk, K. J., et al. (2012). The purification of the *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast ClpP complex: additional subunits and structural features. *Plant Mol. Biol.* 80, 189–202. doi:10.1007/s11103-012-9939-5.
- Dickschat, J. S. (2011). Biosynthesis and function of secondary metabolites. *Beilstein J. Org. Chem.* 7, 1620–1621. doi:10.3762/bjoc.7.190.
- Dogra, N., Arya, S., Singh, K., and Kaur, J. (2015). Differential expression of two members of Rv1922-LipD operon in *Mycobacterium tuberculosis*: Does rv1923 qualify for membership? *Pathog. Dis.* 73. doi:10.1093/femspd/ftv029.
- Dougan, D. A., Reid, B. G., Horwich, A. L., and Bukau, B. (2002). ClpS, a substrate modulator of the ClpAP machine. *Mol. Cell* 9, 673–683. doi:10.1016/S1097-2765(02)00485-9.
- Doull, J. L., and Vining, L. C. (1990). Physiology of antibiotic production in actinomycetes and some underlying control mechanisms. *Biotechnol. Adv.* 8, 141–158. doi:10.1016/0734-9750(90)90010-9.
- Du, D., Katsuyama, Y., Onaka, H., Fujie, M., Satoh, N., Shin-ya, K., et al. (2016). Production of a novel amide-containing polyene by activating a cryptic biosynthetic gene cluster in *Streptomyces* sp. MSC090213JE08. *ChemBioChem* 17, 1464–1471. doi:10.1002/cbic.201600167.
- Du, D., Katsuyama, Y., Shin-ya, K., and Ohnishi, Y. (2017). Reconstitution of a type II polyketide synthase catalyzing polyene formation. *Angew. Chemie* 57, 1954–1957. doi:10.1002/ange.201709636.
- Du, L., Liu, R. H., Ying, L., and Zhao, G. R. (2012). An efficient intergeneric conjugation of DNA from *Escherichia coli* to mycelia of the lincomycin-producer *Streptomyces lincolnensis*. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 4797–4806. doi:10.3390/ijms13044797.
- Famulla, K., Sass, P., Malik, I., Akopian, T., Kandror, O., Alber, M., et al. (2016). Acyldepsipeptide antibiotics kill mycobacteria by preventing the physiological functions of the ClpP1P2 protease. *Mol. Microbiol.* 101, 194–209. doi:10.1111/mmi.13362.
- Fedhila, S., Msadek, T., Nel, P., and Lereclus, D. (2002). Distinct *clpP* genes control specific adaptive responses in *Bacillus thuringiensis*. *J. Bacteriol.* 184, 5554–5562. doi:10.1128/JB.184.20.5554-5562.2002.
- Felnagle, E. A., Barkei, J. J., Park, H., Podevels, A. M., McMahon, M. D., Drott, D. W., et al. (2010). MbtH-like proteins as integral components of bacterial nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry* 49, 8815–8817. doi:10.1021/bi1012854.
- Feng, J., Michalik, S., Varming, A. N., Andersen, J. H., Albrecht, D., Jelsbak, L., et al. (2013). Trapping and proteomic identification of cellular substrates of the ClpP protease in *Staphylococcus aureus*. *J. Proteome Res.* 12, 547–558. doi:10.1021/pr300394r.
- Finking, R., and Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58, 453–488. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123615.
- Fisch, K. M. (2013). Biosynthesis of natural products by microbial iterative hybrid PKS-NRPS. *RSC Adv.* 3, 18228–18247. doi:10.1039/c3ra42661k.
- Fischbach, M. A., and Walsh, C. T. (2006). Assembly-line enzymology for polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: Logic, machinery, and mechanisms. *Chem. Rev.* 106, 3468–3496. doi:10.1021/cr0503097.
- Fisher, D. J., Wood, N. A., Rodrigues de Almeida, N., Ouellette, S. P., Blocker, A. M., Conda-Sheridan, M., et al. (2018). Initial characterization of the two ClpP paralogs of *Chlamydia trachomatis* suggests unique functionality for each. *J. Bacteriol.* 201, JB.00635-18. doi:10.1128/jb.00635-18.
- Flärdh, K., and Buttner, M. J. (2009). *Streptomyces* morphogenetics: Dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 36–49. doi:10.1038/nrmicro1968.
- Flett, F., Mersinias, V., and Smith, C. P. (1997). High efficiency intergeneric conjugal transfer of plasmid DNA from *Escherichia coli* to methyl DNA-restricting streptomycetes. *FEMS Microbiol. Lett.* 155,

223–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9351205> [Accessed July 8, 2016].

- Frees, D., Gerth, U., and Ingmer, H. (2014). Clp chaperones and proteases are central in stress survival, virulence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Med. Microbiol.* 304, 142–149. doi:10.1016/j.ijmm.2013.11.009.
- Frees, D., Qazi, S. N. A., Hill, P. J., and Ingmer, H. (2003). Alternative roles of ClpX and ClpP in *Staphylococcus aureus* stress tolerance and virulence. *Mol. Microbiol.* 48, 1565–1578. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03524.x.
- Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P., and Ingmer, H. (2007). Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 63, 1285–1295. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05598.x.
- Gaillot, O., Pellegrini, E., Bregenholt, S., Nair, S., and Berche, P. (2000). The ClpP serine protease is essential for the intracellular parasitism and virulence of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 1286–1294. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01773.x.
- Gao, W., Kim, J. Y., Anderson, J. R., Akopian, T., Hong, S., Jin, Y. Y., et al. (2015). The cyclic peptide ecumicin targeting ClpC1 is active against *Mycobacterium tuberculosis* in vivo. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 880–889. doi:10.1128/AAC.04054-14.
- Gastmeier, P., and Fätkenheuer, G. (2015). Infektiologie: Dilemma mit Begriffen und Zahlen. *Dtsch. Arztebl. Int.* 112, 674–675.
- Gavrish, E., Sit, C. S., Cao, S., Kandror, O., Spoering, A., Peoples, A., et al. (2014). Lassomycin, a ribosomally synthesized cyclic peptide, kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ATP-dependent protease ClpC1P1P2. *Chem. Biol.* 21, 509–518. doi:10.1016/j.chembiol.2014.01.014.
- Gerardin, Y., Springer, M., and Kishony, R. (2016). A competitive trade-off limits the selective advantage of increased antibiotic production. *Nat. Microbiol.* 1, 16175. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.175.
- Gersch, M., List, A., Groll, M., and Sieber, S. A. (2012). Insights into structural network responsible for oligomerization and activity of bacterial virulence regulator caseinolytic protease P (ClpP) protein. *J. Biol. Chem.* 287, 9484–9494. doi:10.1074/jbc.M111.336222.
- Golakoti, T., Yoshida, W. Y., Chaganty, S., and Moore, R. E. (2001). Isolation and structure determination of nostocyclopeptides A1 and A2 from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc* sp. ATCC53789. *J. Nat. Prod.* 64, 54–59. doi:10.1021/np000316k.
- Gominet, M., Seghezzi, N., and Mazodier, P. (2011). Acyl depsipeptide (ADEP) resistance in *Streptomyces*. *Microbiology* 157, 2226–34. doi:10.1099/mic.0.048454-0.
- Goodreid, J. D., Wong, K., Leung, E., McCaw, S. E., Gray-Owen, S. D., Lough, A., et al. (2014). Total synthesis and antibacterial testing of the A54556 cyclic acyldepsipeptides isolated from *Streptomyces hawaiiensis*. *J. Nat. Prod.* 77, 2170–2181. doi:10.1021/np500158q.
- Gottesman, S., Roche, E., Zhou, Y. N., and Sauer, R. T. (1998). The ClpXP and ClpAP proteases degrade proteins with carboxy-terminal peptide tails added by the SsrA-tagging system. *Genes Dev.* 12, 1338–1347. doi:10.1101/gad.12.9.1338.
- Gribun, A., Kimber, M. S., Ching, R., Sprangers, R., Fiebig, K. M., and Houry, W. A. (2005). The ClpP double ring tetradecameric protease exhibits plastic ring-ring interactions, and the N termini of its subunits form flexible loops that are essential for ClpXP and ClpAP complex formation. *J. Biol. Chem.* 280, 16185–16196. doi:10.1074/jbc.M414124200.
- Grimaud, R., Kessel, M., Beuron, F., Steven, A. C., and Maurizi, M. R. (1998). Enzymatic and structural similarities between the *Escherichia coli* ATP-dependent proteases, ClpXP and ClpAP. *J. Biol. Chem.* 273, 12476–12481. doi:10.1074/jbc.273.20.12476.
- Guyet, A., Gominet, M., Benaroudj, N., and Mazodier, P. (2013). Regulation of the *clpP1clpP2* operon by the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces lividans*. *Arch. Microbiol.* 195, 831–41.

doi:10.1007/s00203-013-0918-2.

- Hall, B. M., Breidenstein, E. B. M., Fuente-Núñez, C. de la, Reffuveille, F., Mawla, G. D., Hancock, R. E. W., et al. (2017). Two isoforms of Clp peptidase in *Pseudomonas aeruginosa* control distinct aspects of cellular physiology. *J. Bacteriol.* 199, e00568-16. doi:10.1128/JB.00568-16.
- Herbst, D. A., Boll, B., Zocher, G., Stehle, T., and Heide, L. (2013). Structural basis of the interaction of MbtH-like proteins, putative regulators of nonribosomal peptide biosynthesis, with adenylating enzymes. *J. Biol. Chem.* 288, 1991–2003. doi:10.1074/jbc.M112.420182.
- Hertweck, C., Luzhetskyy, A., Rebets, Y., and Bechthold, A. (2007). Type II polyketide synthases: gaining a deeper insight into enzymatic teamwork. *Nat. Prod. Rep.* 24, 162–190. doi:10.1039/B507395M.
- Hibi, M., Kawashima, T., Sokolov, P. M., Smirnov, S. V., Kodera, T., Sugiyama, M., et al. (2013). L-Leucine 5-hydroxylase of *Nostoc punctiforme* is a novel type of Fe(II)/ α -ketoglutarate-dependent dioxygenase that is useful as a biocatalyst. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 2467–2472. doi:10.1007/s00253-012-4136-7.
- Hinzen, B., Raddatz, S., Paulsen, H., Lampe, T., Schumacher, A., Häbich, D., et al. (2006). Medicinal chemistry optimization of acyldepsipeptides of the enopeptin class antibiotics. *ChemMedChem* 1, 689–693. doi:10.1002/cmdc.200600055.
- Hofacker, I. L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3429–3431. doi:10.1093/nar/gkg599.
- Hoffmann, D., Hevel, J. M., Moore, R. E., and Moore, B. S. (2003). Sequence analysis and biochemical characterization of the nostopeptolide A biosynthetic gene cluster from *Nostoc* sp. GSV224. *Gene* 311, 171–180. doi:10.1016/S0378-1119(03)00587-0.
- Hong, H. J., Hutchings, M. I., Hill, L. M., and Buttner, M. J. (2005). The role of the novel fem protein Vank in vancomycin resistance in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 280, 13055–13061. doi:10.1074/jbc.M413801200.
- Hopwood, D. A., Kieser, T., Wright, H. M., and Bibb, M. J. (1983). Plasmids, recombination and chromosome mapping in *Streptomyces lividans* 66. *J. Gen. Microbiol.* 129, 2257–2269. Available at: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.616.2351&rep=rep1&type=pdf> [Accessed March 21, 2018].
- Huang, J., Shi, J., Molle, V., Sohlberg, B., Weaver, D., Bibb, M. J., et al. (2005). Cross-regulation among disparate antibiotic biosynthetic pathways of *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microbiol.* 58, 1276–1287. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04879.x.
- Jennings, L. D., Bohon, J., Chance, M. R., and Licht, S. (2008). The ClpP N-terminus coordinates substrate access with protease active site reactivity. *Biochemistry* 47, 11031–11040. doi:10.1021/bi8010169.
- Kadi, N., and Challis, G. L. (2009). Siderophore biosynthesis: A substrate specificity assay for nonribosomal peptide synthetase-independent siderophore synthetases involving trapping of acyl-adenylate intermediates with hydroxylamine. *Methods Enzymol.* 458, 431–457. doi:10.1016/S0076-6879(09)04817-4.
- Katayama-Fujimura, Y., Gottesman, S., and Maurizi, M. R. (1987). A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262, 4477–4485. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3549708> [Accessed July 7, 2017].
- Katz, M., Hover, B. M., and Brady, S. F. (2016). Culture-independent discovery of natural products from soil metagenomes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 129–141. doi:10.1007/s10295-015-1706-6.
- Keiler, K. C., Waller, P. R. H., and Sauer, R. T. (1996). Role of a peptide tagging system in degradation of proteins synthesized from damaged messenger RNA. *Science (80-)*. 271, 990–993. doi:10.1126/science.271.5251.990.
- Keller, U., Lang, M., Crnovcic, I., Pfennig, F., and Schauwecker, F. (2010). The actinomycin biosynthetic

- gene cluster of *Streptomyces chrysomallus*: A genetic hall of mirrors for synthesis of a molecule with mirror symmetry. *J. Bacteriol.* 192, 2583–2595. doi:10.1128/JB.01526-09.
- Kieser, H. M., Kieser, T., and Hopwood, D. A. (1992). A combined genetic and physical map of the *Streptomyces coelicolor* A3(2) chromosome. *J. Bacteriol.* 174, 5496–5507. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1512187> [Accessed March 29, 2017].
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F., and Hopwood, D. A. (2000). *Practical Streptomyces Genetics*. The John Innes Foundation doi:10.4016/28481.01.
- Kim, M. S., Hahn, M. Y., Cho, Y., Cho, S. N., and Roe, J. H. (2009). Positive and negative feedback regulatory loops of thiol-oxidative stress response mediated by an unstable isoform of σ R in actinomycetes. *Mol. Microbiol.* 73, 815–825. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06824.x.
- Kimber, M. S., Yu, A. Y. H., Borg, M., Leung, E., Chan, H. S., and Houry, W. A. (2010). Structural and theoretical studies indicate that the cylindrical protease ClpP samples extended and compact conformations. *Structure* 18, 798–808. doi:10.1016/j.str.2010.04.008.
- Kirstein, J., Hoffmann, A., Lilie, H., Schmidt, R., Helga, R. W., Heike, B. O., et al. (2009a). The antibiotic ADEP reprogrammes ClpP, switching it from a regulated to an uncontrolled protease. *EMBO Mol. Med.* 1, 37–49. doi:10.1002/emmm.200900002.
- Kirstein, J., Molière, N., Dougan, D. A., and Turgay, K. (2009b). Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 589–599. doi:10.1038/nrmicro2185.
- Kirstein, J., Schlothauer, T., Dougan, D. A., Lilie, H., Tischendorf, G., Mogk, A., et al. (2006). Adaptor protein controlled oligomerization activates the AAA+ protein ClpC. *EMBO J.* 25, 1481–91. doi:10.1038/sj.emboj.7601042.
- Kling, A., Lukat, P., Almeida, D. V., Bauer, A., Fontaine, E., Sordello, S., et al. (2015). Antibiotics. Targeting DnaN for tuberculosis therapy using novel griselimycins. *Science* 348, 1106–12. doi:10.1126/science.aaa4690.
- Koo, B. M., Kritikos, G., Farelli, J. D., Todor, H., Tong, K., Kimsey, H., et al. (2017). Construction and analysis of two genome-scale deletion libraries for *Bacillus subtilis*. *Cell Syst.* 4, 291-305.e7. doi:10.1016/j.cels.2016.12.013.
- Koshino, H., Osada, H., Yano, T., Uzawa, J., and Isono, K. (1991). The structure of enopeptins A and B, novel depsipeptide antibiotics. *Tetrahedron Lett.* 32, 7707–7710. doi:10.1016/0040-4039(91)80571-M.
- Laing, E., Mersinias, V., Smith, C. P., and Hubbard, S. J. (2006). Analysis of gene expression in operons of *Streptomyces coelicolor*. *Genome Biol.* 7, R46. doi:10.1186/gb-2006-7-6-r46.
- Leblond, P., Redenbach, M., and Cullum, J. (1993). Physical map of the *Streptomyces lividans* 66 genome and comparison with that of the related strain *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J. Bacteriol.* 175, 3422–3429. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8501047> [Accessed March 29, 2017].
- Lee, B. G., Park, E. Y., Lee, K. E., Jeon, H., Sung, K. H., Paulsen, H., et al. (2010). Structures of ClpP in complex with acyldepsipeptide antibiotics reveal its activation mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 471–478. doi:10.1038/nsmb.1787.
- Leodolter, J., Warweg, J., and Weber-Ban, E. (2015). The *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1P2 protease interacts asymmetrically with its ATPase partners ClpX and ClpC1. *PLoS One* 10, e0125345. doi:10.1371/journal.pone.0125345.
- Lewis, K. (2013). Platforms for antibiotic discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 12, 371–87. doi:10.1038/nrd3975.
- Li, D. H. S., Chung, Y. S., Gloyd, M., Joseph, E., Ghirlando, R., Wright, G. D., et al. (2010). Acyldepsipeptide antibiotics induce the formation of a structured axial channel in ClpP: A model for the ClpX/ClpA-

- bound state of ClpP. *Chem. Biol.* 17, 959–969. doi:10.1016/j.chembiol.2010.07.008.
- Li, S., Wang, W., Li, X., Fan, K., and Yang, K. (2015). Genome-wide identification and characterization of reference genes with different transcript abundances for *Streptomyces coelicolor*. *Sci. Rep.* 5, 15840. doi:10.1038/srep15840.
- Liu, K., Ologbenla, A., and Houry, W. A. (2014a). Dynamics of the ClpP serine protease: A model for self-compartmentalized proteases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 400–412. doi:10.3109/10409238.2014.925421.
- Liu, L., Jokela, J., Herfindal, L., Wahlsten, M., Sinkkonen, J., Permi, P., et al. (2014b). 4-Methylproline guided natural product discovery: Co-occurrence of 4-hydroxy- and 4-methylprolines in nostoweipeptins and nostopeptolides. *ACS Chem. Biol.* 9, 2646–2655. doi:10.1021/cb500436p.
- Luesch, H., Hoffmann, D., Hevel, J. M., Becker, J. E., Golakoti, T., and Moore, R. E. (2003). Biosynthesis of 4-methylproline in cyanobacteria: Cloning of *nosE* and *nosF* genes and biochemical characterization of the encoded dehydrogenase and reductase activities. *J. Org. Chem.* 68, 83–91. doi:10.1021/jo026479q.
- Lukat, P., Katsuyama, Y., Wenzel, S., Binz, T., König, C., Blankenfeldt, W., et al. (2017). Biosynthesis of methyl-proline containing griselimycins, natural products with anti-tuberculosis activity. *Chem. Sci.* 8, 7521–7527. doi:10.1039/C7SC02622F.
- Madigan, M. T., and Martinko, J. M. (2013). *Brock Mikrobiologie*. 13th ed. München: Pearson.
- Malik, I. T., and Brötz-Oesterhelt, H. (2017). Conformational control of the bacterial Clp protease by natural product antibiotics. *Nat. Prod. Rep.* 34, 815–831. doi:10.1039/c6np00125d.
- Mazodier, P., Petter, R., and Thompson, C. (1989). Intergeneric conjugation between *Escherichia coli* and *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.* 171, 3583–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2656662> [Accessed July 8, 2016].
- Meyer, S., Kehr, J. C., Mainz, A., Dehm, D., Petras, D., Süssmuth, R. D., et al. (2016). Biochemical dissection of the natural diversification of microcystin provides lessons for synthetic biology of NRPS. *Cell Chem. Biol.* 23, 462–471. doi:10.1016/j.chembiol.2016.03.011.
- Michel, K. H., and Kastner, R. E. (1985). A54556 antibiotics and process for production thereof. *US Pat.* 4492650. Available at: <http://en.zl50.com/920130321768369056.html> [Accessed January 14, 2017].
- Milshteyn, A., Schneider, J. S., and Brady, S. F. (2014). Mining the metabiome: Identifying novel natural products from microbial communities. *Chem. Biol.* 21, 1211–1223. doi:10.1016/j.chembiol.2014.08.006.
- Mousa, W. K., and Raizada, M. N. (2015). Biodiversity of genes encoding anti-microbial traits within plant associated microbes. *Front. Plant Sci.* 6, 231. doi:10.3389/fpls.2015.00231.
- Msadek, T., Dartois, V., Kunst, F., Herbaud, M. L., Denizot, F., and Rapoport, G. (1998). ClpP of *Bacillus subtilis* is required for competence development, motility, degradative enzyme synthesis, growth at high temperature and sporulation. *Mol. Microbiol.* 27, 899–914. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.00735.x.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51, 263–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3472723> [Accessed August 3, 2016].
- Munita, J. M., and Arias, C. A. (2016). “Mechanisms of Antibiotic Resistance,” in *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (American Society of Microbiology), 481–511. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Murakami, T., Holt, T. G., and Thompson, C. J. (1989). Thiostrepton-induced gene expression in *Streptomyces lividans*. *J. Bacteriol.* 171, 1459–1466. doi:10.1128/jb.171.3.1459-1466.1989.

- Myronovskiy, M., Welle, E., Fedorenko, V., and Luzhetskyy, A. (2011). β -Glucuronidase as a sensitive and versatile reporter in actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5370–5383. doi:10.1128/aem.00434-11.
- Olivares, A. O., Baker, T. A., and Sauer, R. T. (2015). Mechanistic insights into bacterial AAA+ proteases and protein-remodelling machines. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 33–44. doi:10.1038/nrmicro.2015.4.
- Ollinger, J., O'Malley, T., Kesicki, E. A., Odingo, J., and Parish, T. (2012). Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *J. Bacteriol.* 194, 663–668. doi:10.1128/JB.06142-11.
- Osada, H., Yano, T., Koshino, H., and Isono, K. (1991). Enopeptin A, a novel depsipeptide antibiotic with anti-bacteriophage activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 44, 1463–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778798> [Accessed January 15, 2017].
- Paget, M. S., Kang, J. G., Roe, J. H., and Buttner, M. J. (1998). sigmaR, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* 17, 5776–82. doi:10.1093/emboj/17.19.5776.
- Paterson, D. L., and Bonomo, R. A. (2005). Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657–86. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
- Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., and Pompliano, D. L. (2007). Drugs for bad bugs: Confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 29–40. doi:10.1038/nrd2201.
- Peterson, E., and Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Front. Microbiol.* 9, 2928. doi:10.3389/fmicb.2018.02928.
- Pogue, J. M., Kaye, K. S., Cohen, D. A., and Marchaim, D. (2015). Appropriate antimicrobial therapy in the era of multidrug-resistant human pathogens. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 302–312. doi:10.1016/j.cmi.2014.12.025.
- Pohle, S., Appelt, C., Roux, M., Fiedler, H. P., and Süssmuth, R. D. (2011). Biosynthetic gene cluster of the non-ribosomally synthesized cyclodepsipeptide skyllamycin: Deciphering unprecedented ways of unusual hydroxylation reactions. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 6194–6205. doi:10.1021/ja108971p.
- Raju, R. M., Unnikrishnan, M., Rubin, D. H. F., Krishnamoorthy, V., Kandror, O., Akopian, T. N., et al. (2012). *Mycobacterium tuberculosis* ClpP1 and ClpP2 function together in protein degradation and are required for viability *in vitro* and during infection. *PLoS Pathog.* 8, e1002511. doi:10.1371/journal.ppat.1002511.
- Rex, G., Surin, B., Besse, G., Schneppe, B., and McCarthy, J. E. (1994). The mechanism of translational coupling in *Escherichia coli*. Higher order structure in the *atpHA* mRNA acts as a conformational switch regulating the access of *de novo* initiating ribosomes. *J. Biol. Chem.* 269, 18118–27. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7517937> [Accessed September 5, 2018].
- Robichon, C., Luo, J., Causey, T. B., Benner, J. S., and Samuelson, J. C. (2011). Engineering *Escherichia coli* BL21(DE3) derivative strains to minimize *E. coli* protein contamination after purification by immobilized metal affinity chromatography. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4634–4646. doi:10.1128/AEM.00119-11.
- Rutledge, P. J., and Challis, G. L. (2015). Discovery of microbial natural products by activation of silent biosynthetic gene clusters. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 509–523. doi:10.1038/nrmicro3496.
- Sass, P., Josten, M., Famulla, K., Schiffer, G., Sahl, H.-G., Hamoen, L., et al. (2011). Antibiotic acyldepsipeptides activate ClpP peptidase to degrade the cell division protein FtsZ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 17474–9. doi:10.1073/pnas.1110385108.
- Sauer, R. T., and Baker, T. A. (2011). AAA+ Proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. *Annu. Rev. Biochem.* 80, 587–612. doi:10.1146/annurev-biochem-060408-172623.

- Scheld, M., Talbot, G. H., Gilbert, D., Edwards, J. E., Bradley, J. S., Boucher, H. W., et al. (2008). Bad bugs, no drugs: No ESCAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 48, 1–12. doi:10.1086/595011.
- Schelin, J., Lindmark, F., and Clarke, A. K. (2002). The *clpP* multigene family for the ATP-dependent Clp protease in the cyanobacterium *Synechococcus*. *Microbiology* 148, 2255–2265. doi:10.1099/00221287-148-7-2255.
- Schiefer, A., Vollmer, J., Lämmer, C., Specht, S., Lentz, C., Ruebsamen-Schaeff, H., et al. (2013). The ClpP peptidase of *Wolbachia* endobacteria is a novel target for drug development against filarial infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 1790–1800. doi:10.1093/jac/dkt105.
- Schmitt, E. K., Riwanto, M., Sambandamurthy, V., Roggo, S., Miault, C., Zwingelstein, C., et al. (2011). The natural product cyclomarin kills *Mycobacterium tuberculosis* by targeting the ClpC1 subunit of the caseinolytic protease. *Angew. Chemie - Int. Ed.* 50, 5889–5891. doi:10.1002/anie.201101740.
- Schmitz, K. R., and Sauer, R. T. (2014). Substrate delivery by the AAA+ ClpX and ClpC1 unfoldases activates the mycobacterial ClpP1P2 peptidase. *Mol. Microbiol.* 93, 617–628. doi:10.1111/mmi.12694.
- Selinger, D. W., Saxena, R. M., Cheung, K. J., Church, G. M., and Rosenow, C. (2003). Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res.* 13, 216–223. doi:10.1101/gr.912603.
- Sherwood, E. J., Hesketh, A. R., and Bibb, M. J. (2013). Cloning and analysis of the planosporicin lantibiotic biosynthetic gene cluster of *Planomonospora alba*. *J. Bacteriol.* 195, 2309–2321. doi:10.1128/JB.02291-12.
- Shimizu, Y., Ogata, H., and Goto, S. (2017). Type III polyketide synthases: Functional classification and phylogenomics. *ChemBioChem* 18, 50–65. doi:10.1002/cbic.201600522.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 71–109. doi:10.1128/CMR.00030-10.
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Bio/Technology* 1, 784–791. doi:10.1038/nbt1183-784.
- Smith, S., and Tsai, S. C. (2007). The type I fatty acid and polyketide synthases: A tale of two megasynthases. *Nat. Prod. Rep.* 24, 1041–1072. doi:10.1039/b603600g.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D., and Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* 6, 493–505. doi:10.1016/S1074-5521(99)80082-9.
- Stegmann, E., Pelzer, S., Bischoff, D., Puk, O., Stockert, S., Butz, D., et al. (2006). Genetic analysis of the balhimycin (vancomycin-type) oxygenase genes. *J. Biotechnol.* 124, 640–653. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.04.009.
- Tang, Y., Tsai, S. C., and Khosla, C. (2003). Polyketide chain length control by chain length factor. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 12708–12709. doi:10.1021/ja0378759.
- Tao, L., and Biswas, I. (2015). Degradation of SsrA-tagged proteins in streptococci. *Microbiology* 161, 884–894. doi:10.1099/mic.0.000048.
- Thompson, M. W., Singh, S. K., and Maurizi, M. R. (1994). Processive degradation of proteins by the ATP-dependent Clp protease from *Escherichia coli*: Requirement for the multiple array of active sites in ClpP but not ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.* 269, 18209–18215. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027082> [Accessed June 23, 2017].
- Tong, Y., Charusanti, P., Zhang, L., Weber, T., and Lee, S. Y. (2015). CRISPR-Cas9 based engineering of actinomycetal genomes. *ACS Synth. Biol.* 4, 1020–1029. doi:10.1021/acssynbio.5b00038.

- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 4350–4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=411572&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed December 24, 2014].
- Uguru, G. C., Mondhe, M., Goh, S., Hesketh, A., Bibb, M. J., Good, L., et al. (2013). Synthetic RNA silencing of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *PLoS One* 8, e67509. doi:10.1371/journal.pone.0067509.
- Van Der Heul, H. U., Bilyk, B. L., McDowall, K. J., Seipke, R. F., and Van Wezel, G. P. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: New perspectives from the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep.* 35, 575–604. doi:10.1039/c8np00012c.
- Vass, R. H., and Chien, P. (2016). Two ways to skin a cat: acyldepsipeptides antibiotics can kill bacteria through activation or inhibition of ClpP activity. *Mol. Microbiol.* 101, 183–185. doi:10.1111/mmi.13382.
- Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (2016). *Streptomyces - Mikrobe des Jahres 2016. Tagungsband zur VAAM-Jahrestagung 2016, 13.–16. März Jena, Springer Spektrum.*
- Viala, J., and Mazodier, P. (2002). ClpP-dependent degradation of PopR allows tightly regulated expression of the *clpP3 clpP4* operon in *Streptomyces lividans*. *Mol. Microbiol.* 44, 633–643. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02907.x.
- Viala, J., Rapoport, G., and Mazodier, P. (2000). The *clpP* multigenic family in *Streptomyces lividans*: conditional expression of the *clpP3 clpP4* operon is controlled by PopR, a novel transcriptional activator. *Mol. Microbiol.* 38, 602–612. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02155.x.
- Waksman, S. A., Reilly, H. C., and Harris, D. A. (1948). *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman and Henrici. *J. Bacteriol.* 56, 259–269. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16561569> [Accessed March 20, 2018].
- Weber, T., Blin, K., Duddela, S., Krug, D., Kim, H. U., Bruccoleri, R., et al. (2015). AntiSMASH 3.0-A comprehensive resource for the genome mining of biosynthetic gene clusters. *Nucleic Acids Res.* 43, W237–W243. doi:10.1093/nar/gkv437.
- Weber, T., Laiple, K. J., Pross, E. K., Textor, A., Grond, S., Welzel, K., et al. (2008). Molecular analysis of the kirromycin biosynthetic gene cluster revealed β -alanine as precursor of the pyridone moiety. *Chem. Biol.* 15, 175–188. doi:10.1016/j.chembiol.2007.12.009.
- Wiegert, T., and Schumann, W. (2001). SsrA-mediated tagging in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183, 3885–3889. doi:10.1128/JB.183.13.3885-3889.2001.
- Wong, K. S., Mabanglo, M. F., Seraphim, T. V., Mollica, A., Mao, Y. Q., Rizzolo, K., et al. (2018). Acyldepsipeptide analogs dysregulate human mitochondrial ClpP protease activity and cause apoptotic cell death. *Cell Chem. Biol.*, 1–14. doi:10.1016/j.chembiol.2018.05.014.
- Wright, F., and Bibb, M. J. (1992). Codon usage in the G+C-rich *Streptomyces* genome. *Gene* 113, 55–65. doi:10.1016/0378-1119(92)90669-G.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mpl8 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119. doi:10.1016/0378-1119(85)90120-9.
- Yeo, W. L., Heng, E., Tan, L. L., Lim, Y. W., Lim, Y. H., Hoon, S., et al. (2019). Characterization of Cas proteins for CRISPR-Cas editing in streptomycetes. *bioRxiv*, 526996. doi:10.1101/526996.
- Yu, A. Y. H., and Houry, W. A. (2007). ClpP: A distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett.* 581, 3749–3757. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.076.
- Zeiler, E., List, A., Drag, M., Gersch, M., Groll, M., Wachtel, R., et al. (2013). Structural and functional

insights into caseinolytic proteases reveal an unprecedented regulation principle of their catalytic triad. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 11302–11307. doi:10.1073/pnas.1219125110.

Zeth, K., Ravelli, R. B., Paal, K., Cusack, S., Bukau, B., and Dougan, D. A. (2002). Structural analysis of the adaptor protein ClpS in complex with the N-terminal domain of ClpA. *Nat. Struct. Biol.* 9, 906–911. doi:10.1038/nsb869.

Zipperer, A., Konnerth, M. C., Laux, C., Berscheid, A., Janek, D., Weidenmaier, C., et al. (2016). Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 535, 511–516. doi:10.1038/nature18634.

6.6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Angriffsorte von Antibiotika an und in der bakteriellen Zelle (Madigan and Martinko, 2013). THF: Tetrahydrofolsäure, DHF: Dihydrofolsäure; PABA: Paraaminobenzoessäure.	2
Abbildung 2: Aufbau der Zellwand von Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien (Campbell et al., 2010).....	3
Abbildung 3: Zeitstrahl über die Entdeckung neuer Antibiotikaklassen. Angegeben sind die Zeitpunkte der ersten Veröffentlichung oder Patentierung (Silver 2011, modifiziert).	4
Abbildung 4: Der Lebenszyklus von Streptomyceten (Angert 2005, modifiziert). Aus einer keimenden Spore wächst eine vegetative Hyphe aus, die sich durch Zellteilung verzweigt und ein Substratmycel bildet. Werden Nährstoffe rar, induziert dies die Bildung eines Luftmycels. Durch Zellteilung der Enden von Substratmycelfilamenten entstehen schließlich Sporenketten.	5
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Biosynthese eines Peptids durch eine NRPS. Nach Auswahl und Aktivierung eines Substrats durch die A-Domäne wird dieses an die PCP-Domäne gebunden. Bei der Verknüpfung der Aminosäuren an zwei benachbarten PCP-Domänen durch die C-Domäne kommt es zum nukleophilen Angriff der Aminogruppe der bereits eingebauten Aminosäure an der Carboxylgruppe der neueintretenden Aminosäure und schließlich zur Ausbildung einer Amidbindung.	6
Abbildung 6: Natürliche Enopeptin-Depsipeptid-Derivate. Faktor A, B, C, D, E und H wurden 1985 aus dem Acyldepsipeptid-Extrakt A54556 aus <i>S. hawaiiensis</i> NRRL 15010 isoliert und strukturell aufgeklärt (Hinzen et al., 2006; Michel and Kastner, 1985). Die 1991 isolierten Enopeptine A und B sind Sekundärmetabolite aus <i>Streptomyces</i> sp. RK-1051 (Koshino et al., 1991).	7
Abbildung 7: Strukturen verschiedener ADEP-Derivate. Chiralitätszentren in ADEP2 und ADEP3 sind mit einem Stern markiert.....	8
Abbildung 8: Zusammensetzung und Funktion der bakteriellen Clp-Protease (Brötz-Oesterhelt & Sass 2014, modifiziert). Clp-ATPasen fördern die Oligomerisierung von ClpP-Monomeren zu tetradekameren Komplexen und erkennen Substrate, die nach Entfaltung zum Abbau in die proteolytische Kammer eingeführt werden und dort zerschnitten werden. An der Substraterkennung können Adapterproteine beteiligt sein.	10
Abbildung 9: Sekundäre Strukturelemente eines ClpP-Monomers aus <i>E. coli</i> . Gepunktete Bereiche stellen die Aminosäuren der katalytischen Triade dar (Ser-His-Asp) (Yu & Houry 2007, modifiziert).	11
Abbildung 10: Modell des Wirkmechanismus von ADEPs an ClpP. A) ADEPs fördern die Oligomerisierung von Monomeren zu Tetradekamer-Komplexen und verdrängen die Clp-ATPasen von ihren Bindestellen (a). B) Durch eine Konformationsänderung öffnen sie die Eintrittsporen und ermöglichen den Abbau von ungefalteten, naszierenden Proteinen direkt am Ribosom (b) (Brötz-Oesterhelt & Sass 2014, modifiziert).....	13
Abbildung 11: Regulation der <i>clpP</i> -Genexpression in <i>S. lividans</i> und <i>S. coelicolor</i> und die daraus resultierende Gen- und Proteinexpression. Diese hier zusammengetragenen Zusammenhänge gehen auf vorangegangene Arbeiten der Arbeitsgruppe von Philippe Mazodier zurück.	16
Abbildung 12: Bandenprofil des O'GeneRuler Ladder Mix, ready to use, auf einem 1% Agarose-TAE-Gel.....	38
Abbildung 13: SDS-PAGE Bandenprofile verschiedener Protein-Größenstandards. A) Pierce Unstained Protein MW Marker auf einem 12% Tris-Glycin-Gel nach Färbung mit Coomassie Blue, B) PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (10-250 kDa) auf einem 4-20% Tris-Glycin-Gel, C) NEB Color Prestained Protein Standard, Broad Range (11-245 kDa) auf einem 10-20% Tris-Glycin-Gel, D) SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (3-198 kDa) auf einem NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris Gel mit MES-Puffer.	39
Abbildung 14: Beispielhafter Reaktionsverlauf der Umsetzung einer Aminosäure durch eine isolierte A-Domäne im Substratspezifitäts-Assay.....	53

Abbildung 15: A) Sporulation von <i>S. hawaiiensis</i> auf MS-Agar nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C; B) Einzelkolonien und Pigmentproduktion auf LB-Agar; C) Pigmentproduktion auf MH-Agar nach dreitägiger Inkubation bei 30 °C.	56
Abbildung 16: Bioassay mit <i>S. hawaiiensis</i> -Kulturüberständen mit verschiedenen Medien, getestet gegen <i>B. subtilis</i> 168 trpC2 und eine ADEP-resistente $\Delta clpP$ -Mutante. Je 50 μ l des Überstandes wurden in Löcher in MH-Softagarplatten mit dem jeweiligen Indikatorstamm pipettiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.	56
Abbildung 17: Wachstumskurve von <i>S. hawaiiensis</i> in YM-Milli-Q-Medium, ermittelt durch die Bestimmung der trockenen Zellmasse in 10 ml Kultur zu verschiedenen Zeitpunkten. Die ADEP-Produktion an den entsprechenden Zeitpunkten wurde mittels eines Bioassays anhand der Wachstumsinhibierung von <i>B. subtilis</i> 168 durch ADEPs im Kulturüberstand ermittelt (Abbildung 18). Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei biologischen Replikaten.	57
Abbildung 18: Bioassay mit <i>S. hawaiiensis</i> -Kulturüberständen zu verschiedenen Zeitpunkten des Wachstums (Angaben in h) gegen A) <i>B. subtilis</i> 168 trpC2 und B) <i>B. subtilis</i> 168 trpC2 $\Delta clpP$ als ADEP-insensitive Kontrolle. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei biologischen Replikaten.	57
Abbildung 19: Bioassay mit <i>S. hawaiiensis</i> -Kulturüberständen nach Anzucht in verschiedenen Medien zu verschiedenen Zeitpunkten, getestet gegen <i>B. subtilis</i> 168 trpC2.	58
Abbildung 20: Testkonjugation zwischen <i>E. coli</i> S17-1 pRM4.3 und <i>S. hawaiiensis</i> auf MS-Agar mit verschiedenen MgCl ₂ -Konzentrationen, wie in der Abbildung angegeben. Die Platten wurden nach 24 h (oben) bzw. 48 h (unten) nach Überschichten bezüglich des Konjugationserfolgs bewertet.	58
Abbildung 21: Testkonjugation zwischen <i>S. hawaiiensis</i> und zwei verschiedenen <i>E. coli</i> S17-1 pRM4.3-Klonen, die mittels Standardprotokoll oder durch die Calciumchlorid-Methode chemo-kompetent wurden. Gezeigt sind jeweils zwei biologische Replikate.	59
Abbildung 22: Phänotyp verschiedener <i>S. hawaiiensis</i> -Mutanten nach der Konjugation und Integration verschiedener Plasmide. Bei <i>S. hawaiiensis</i> pIJ6902 verursacht die Integration des Plasmids einen unregelmäßigen Phänotyp mit Sporulations- und Wachstumsdefizit. <i>S. hawaiiensis</i> pIJ10257 zeigt durch die Integration des Plasmids keine Veränderung des Phänotyps.	59
Abbildung 23: Aufreinigung von ADEP1 aus dem Kulturüberstand von <i>S. hawaiiensis</i> A) Überprüfung der nach der Adsorptionschromatographie erhaltenen Fraktionen auf ihren ADEP-Gehalt. Bioassay zum Test von je 20 μ l der einzelnen Fraktionen (Wasser, 20% MeOH, 50% MeOH, 100% MeOH) gegen <i>B. subtilis</i> 168. B) Analytische HPLC des gelösten ADEP-haltigen Rohextrakts mit deutlichen Signalen für Faktor B und ADEP1 bei 298 nm. Überprüfung des aufgereinigten ADEP1 auf Reinheit mittels einer LCMS-Analyse: C) Detektion mit einem Diodenarray-Detektor zeigte einen präzisen Peak bei 300 nm und D) ESI-Scans bestätigten das m/z-Verhältnis von ADEP1 (718,84) im positiven (links) wie negativen Ionisierungsmodus (rechts).	60
Abbildung 24: Bioassay zum Test der antibiotischen Potenz von je 20 μ g ADEP1, ADEP2, ADEP4 und ADEP7 gegen <i>S. hawaiiensis</i> und <i>S. lividans</i> TK24.	61
Abbildung 25: Bioassay zum Test der antibiotischen Potenz von je 10 und 20 μ g Faktor B und ADEP1 gegen <i>S. lividans</i> TK24.	62
Abbildung 26: A) Das <i>ade</i> -BGC mit 12 ORFs. B) Die <i>ade</i> -NRPS-Maschinerie mit Modulen M1-M6 und spezifischen Substraten (Pro/MePro eingebaut durch M6 in orange). Die Domänen sind beschriftet wie folgt: C = Kondensationsdomäne, A = Adenylierungsdomäne, PCR = Peptidyl-Carrier-Protein, MT = Methyltransferase, TE = Thioesterase.	64
Abbildung 27: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der A-Domänenbereiche mit wichtigen Aminosäuren für die Substratspezifität nach Stachelhaus et al. 1999 und Challis et al. 2000. A-Domänen des <i>ade</i> -BGC: Shaw_A1-A6; Pro/MePro-spezifische A-Domänen des Griselimycin-BGC: Smue_A2, A5, A8; Phenylalanin-spezifische A-Domäne der Gramacidin-S-Synthetase: GrsA. Die Positionen der für die Spezifität essentiellen Aminosäuren sind nummeriert mit Bezug auf GrsA. Aktivierte Substrate für die gezeigten A-Domänen: Shaw_A1-Phe, Shaw_A2-Ser, Shaw_A3-Pro, Shaw_A4-Ala, Shaw_A5-Ala, Shaw_A6-Pro/MePro, Smue_A2-MePro, Smue_A5-MePro, Smue_A8-Pro/MePro.	65

Abbildung 28: Relative Substratspezifitäten von A-Domänen ermittelt in einem Hydroxamat-Formierungs-Assay (Kadi and Challis, 2009). Die Spezifitäten von A3 (A) und A6 (B) wurden durch das Testen einer Auswahl von Aminosäuren und einer Kontrolle ohne Aminosäure bestimmt. Normalisierte Absorptionswerte der Assay-Ansätze minus der Absorptions-Werte einer Kontrollreaktion mit gekochtem Protein werden gezeigt für ein repräsentatives aus drei biologischen Replikaten mit je zwei technischen Replikaten. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.	66
Abbildung 29: Möglicher Ablauf der Biosynthese von MePro im Rahmen der ADEP-Biosynthese.....	67
Abbildung 30: Anordnung der PKS-Gene in <i>S. hawaiiensis</i> und PKS-Homologe in <i>Streptomyces</i> sp. MSC090213JE08 und <i>Streptomyces</i> sp. Acta 2897. ACP = Acyl-Carrier-Protein; KS _α = Ketosynthase α; KS _β = Ketosynthase β; KR = Ketoreduktase.....	67
Abbildung 31: Möglicher Ablauf der Biosynthese der C8-Trienseitenkette im Rahmen der Biosynthese von ADEP1.	68
Abbildung 32: Ausgewählte Gene zur Erzeugung von Knockout-Mutanten (magenta) zur Bestätigung des <i>ade</i> -BGC und seiner Grenzen in <i>S. hawaiiensis</i>	68
Abbildung 33: Bioassay mit Kulturüberständen von siRNA gegen <i>adeG</i> -mRNA exprimierenden <i>S. hawaiiensis</i> Mutanten, getestet gegen <i>B. subtilis</i> BKE01020. Es wurde nicht (0) bzw. mit 5 oder 50 µg/ml Thiostrepton induziert. Kulturen mit <i>S. hawaiiensis</i> pJltsr dienten als Leervektorkontrolle. Proben wurden nach 24 und 48 h genommen und je 40 µl Kulturüberstand für den Bioassay verwendet.	70
Abbildung 34: Schematische Darstellung des <i>clpP1clpP2</i> -Operons mit angrenzendem <i>clpX</i> sowie des <i>clpP3clpP4</i> -Operons und dem angrenzenden <i>popR</i> -Gen in umgekehrter Orientierung in <i>S. lividans</i> (SL) und <i>S. hawaiiensis</i> (SH).....	71
Abbildung 35: Relative Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene in <i>S. hawaiiensis</i> in verschiedenen Wachstumsstadien. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: <i>clpP</i> _{ADEP} = magenta; <i>clpP1</i> = hellblau; <i>clpP2</i> = dunkelblau; <i>clpP3</i> = hellgrün; <i>clpP4</i> = dunkelgrün; <i>clpP5</i> = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.	73
Abbildung 36: Relative Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene in <i>S. hawaiiensis</i> , <i>S. lividans</i> pSETclpP _{ADEP} , <i>S. lividans</i> pSETempty und <i>S. lividans</i> TK24 nach 30 und 60 h Inkubation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: <i>clpP</i> _{ADEP} = magenta; <i>clpP1</i> = hellblau; <i>clpP2</i> = dunkelblau; <i>clpP3</i> = hellgrün; <i>clpP4</i> = dunkelgrün; <i>clpP5</i> = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.....	74
Abbildung 37: Relative Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene in <i>S. hawaiiensis</i> , <i>S. lividans</i> pSETclpP _{ADEP} mit 10 µg/ml ADEP1, <i>S. lividans</i> pSETclpP _{ADEP} mit 200 µl DMSO und <i>S. lividans</i> pSETempty nach 30 und 60 h Inkubation. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert von zwei biologischen Replikaten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die relativen Expressionsmengen der <i>clpP</i> -Gene werden je Zeitpunkt in der gleichen Reihenfolge und mit folgendem Farbcode dargestellt: <i>clpP</i> _{ADEP} = magenta; <i>clpP1</i> = hellblau; <i>clpP2</i> = dunkelblau; <i>clpP3</i> = hellgrün; <i>clpP4</i> = dunkelgrün; <i>clpP5</i> = hellviolett. Fehlerbalken zeigen die maximale Abweichung vom jeweiligen Mittelwert.....	75
Abbildung 38: Multiples Aminosäuresequenz-Alignment der ClpP-Homologe aus <i>S. lividans</i> (liv) und <i>S. hawaiiensis</i> (haw). Aminosäuren der katalytischen Triade sind gelb, mögliche Expressionsstarts in ClpP1 und ClpP2 sind blau und bekannte Prozessierungsstellen in <i>S. lividans</i> ClpP1 und ClpP2 sowie übereinstimmende Aminosäuren in <i>S. hawaiiensis</i> sind rot hinterlegt.	77
Abbildung 39: Western Blot mit Zellextrakten von <i>S. lividans</i> TK24 und auf diesem Stamm beruhenden <i>clpP</i> -Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti- <i>Streptomyces</i> ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti- <i>Streptomyces</i> ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28	

- kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs..... 79
- Abbildung 40: Erwartete Größen der ClpP-Proteine in *S. lividans* TK24 und den in diesem Stammhintergrund erzeugten Knockout-Mutanten sowie mit verschiedenen Konstrukten komplementierten Mutanten. Prozessierte ClpP-Versionen sind mit einem Stern gekennzeichnet. 79
- Abbildung 41: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* TK24 und auf diesem Stamm beruhenden *clpP*-Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Alle verwendeten Konstrukte zur Komplementierung beruhen auf dem Plasmid pIJ12551 (Leervektor), in den *clpP1* vom ersten (P1lang) oder vom zweiten (P1kurz) möglichen Startcodon bzw. das vollständige *clpP1clpP2*-Operon (P1P2-Operon) kloniert wurden. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP3 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs..... 80
- Abbildung 42: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* TK24 und auf diesem Stamm beruhenden *clpP*-Knockout-Mutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP1* beruhen auf dem Plasmid pIJ12551, Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP2* beruhen auf dem Plasmid pIJ10257. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP3 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs..... 81
- Abbildung 43: Western Blot mit Zellextrakten von *S. lividans* ShClpP1-Funktionsverlustmutanten. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP1* beruhen auf dem Plasmid pIJ12551, Konstrukte zur Komplementierung mit *clpP2* beruhen auf dem Plasmid pIJ10257. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Für ClpP3 ist keine prozessierte Form bekannt. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs..... 82
- Abbildung 44: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener *clpP*-Knockout-Mutanten gegen den A54556 ADEP-Komplex, sekretiert von *S. hawaiiensis*. Stämme ohne Genus- und Spezies-Bezeichnung beruhen alle auf *S. lividans* TK24. 83
- Abbildung 45: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener komplementierter *S. lividans* TK24 *clpP*-Knockout-Mutanten gegen 20 µg ADEP1..... 84
- Abbildung 46: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität verschiedener *clpP_{ADEP}*-tragender *Streptomyces*-Mutanten gegen den A54556 ADEP-Komplex, sekretiert von *S. hawaiiensis*. Leervektor: pSET152ermE*ΔHindIII; *clpP_{ADEP}*: pSET152*clpP_{ADEP}*..... 85
- Abbildung 47: Western Blot-Analyse verschiedener *clpP_{ADEP}*-tragender *Streptomyces*-Mutanten im Vergleich zu den jeweiligen Wildtyp-Stämmen und *S. hawaiiensis*. S. haw: *S. hawaiiensis*; S. liv: *S. lividans* TK24; S. coel: *S. coelicolor* A3(2); Wt: Wildtyp; leer: pSET152ermE*ΔHindIII; *clpP_{ADEP}*: pSET152*clpP_{ADEP}*. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs..... 85

- Abbildung 48: Erwartete Größen der ClpP-Proteine in *S. lividans* TK24 und den in diesem Stammhintergrund erzeugten Knockout-Mutanten sowie mit verschiedenen Konstrukten komplementierten Mutanten. Prozessierte ClpP-Versionen sind mit einem Stern gekennzeichnet. ClpP_{ADEP}kurz ist eine um 23 Aminosäuren verkürzte Version von ClpP_{ADEP}, die erzeugt wurde, um die Lage der Prozessierungsstelle durch Größenvergleiche im Western Blot abzuschätzen. 86
- Abbildung 49: ADEP-Sensitivität einer induzierbaren *S. lividans* clpP_{ADEP}-Mutante (*S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}, obere Reihe) sowie einer Leervektorkontrolle (*S. lividans* pIJ6902, untere Reihe). Die Stämme wurden auf Müller-Hinton-Agar mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert und gegen 10 µg ADEP1 auf Papierfiltern getestet. 86
- Abbildung 50: Western Blot-Analyse von Zellextrakten von *S. lividans* pIJ6902clpP_{ADEP}, die mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert worden sind (0-10 µg/ml Thiostrepton). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 87
- Abbildung 51: Induzierte Expression von ClpP_{ADEP} (P_{ADEP}) bzw. ClpP_{ADEP}-His (P_{ADEP}-His) in A) *S. lividans* TK24 (Wildtyp), B) *S. lividans* ΔclpP1 (ΔclpP1) und C) *S. lividans* ΔclpP1P2 (ΔclpP1P2). Zellextrakte wurden aus Kulturen hergestellt, die für zwei Tage ohne Induktor (-) oder mit 20 µg/ml Thiostrepton (+) angezogen wurden. Stämme mit pIJ6902 dienten als Leervektorkontrolle. Obere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1); untere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Die aufgetragene Proteinmenge pro Extrakt betrug 50 µg. Einzige Ausnahme stellten die Extrakte der *S. lividans* ΔclpP1P2-Mutanten dar, da hier mit 50 µg kein Signal detektiert werden konnte, so dass 100 µg (anti-P3) bzw. 300 µg (anti-P1 und anti-His₆) aufgetragen wurden. D) Zellextrakte aller clpP_{ADEP}-His tragenden Stämme wurden mit einem primären polyklonalen Maus-anti 6xHistidin-Antikörper (anti-His₆) detektiert. Um den Bandenshift von ClpP_{ADEP}-His durch das Ausbleiben der Prozessierung in *S. lividans* ΔclpP1P2 zu verdeutlichen, wurden die induzierten Proben rechts ein zweites Mal direkt nebeneinander aufgetragen. Prozessierte ClpP-Proteine sind mit einem Stern gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 88
- Abbildung 52: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP1kurz oder ClpP1lang und ClpP_{ADEP} in *S. lividans* ΔclpP1P2. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 90
- Abbildung 53: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP1kurz und ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* ΔclpP1P2. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti 6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 90
- Abbildung 54: Bioassay zum Test der ADEP-Sensitivität von *S. lividans* ΔclpP1P2+P1kurz und *S. lividans* ΔclpP1P2+P1kurz+P_{ADEP} gegen 20 µg ADEP1. 91
- Abbildung 55: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP2kurz oder ClpP2lang und ClpP_{ADEP} in *S. lividans* ΔclpP1P2. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Schwarze

- Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 92
- Abbildung 56: Western Blot-Analyse zur Überprüfung des Effekts der kombinierten Expression von ClpP2lang/ClpP2lang-His und ClpP_{ADEP}/ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* Δ clpP1P2. Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), mittlere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Maus-anti-6xHistidin-Antikörper (anti-His₆). n.e.: Banden konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Prozessierte Formen sind mit einem Stern gekennzeichnet. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. 93
- Abbildung 57: Größenvergleich verschiedener prozessierter und nicht prozessierter ClpP_{ADEP}-His-Proteine mittels Western Blot zur Abschätzung der Lage der N-terminalen Prozessierungsstelle. A) Die mit einem Stern markierten Proteine wurden in *E. coli* überexprimiert und über ein His₆-Tag aufgereinigt (Laura Reinhardt, unveröffentlicht). Bei allen weiteren Proben handelt es sich um Zellextrakte von ClpP_{ADEP}-His exprimierenden *S. lividans* TK24-, *S. lividans* Δ clpP1- und *S. lividans* Δ clpP1P2-Stämmen. Schwarze Pfeile zeigen die Laufhöhe der 28 kDa-Bande des Markers an (SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard), graue Pfeile mit schwarzem Rand das berechnete Molekulargewicht des jeweiligen ClpP-Homologs. B) Die Translationsstarts der verschiedenen ClpP_{ADEP}-His-Versionen sind im Kontext der N-Termini verschiedener ClpP-Homologe dargestellt (vgl. Abbildung 38). Die tatsächliche Prozessierungsstelle von ClpP_{ADEP}-His liegt, wie aus A) ersichtlich, zwischen den Translationsstarts von P_{ADEP}-His und P_{ADEP}RWN-His. Mögliche Translationsstarts von ClpP1 und ClpP2 sind blau markiert. Die für *S. lividans* bestätigten Prozessierungsstellen von ClpP1 und ClpP2 sind rot markiert. 94
- Abbildung 58: Hypothetisches Modell zur Bildung eines funktionalen ClpP-Komplexes in Streptomyceten. A) Das vollständige ClpP2-Propeptid ermöglicht eine Teilprozessierung von ClpP2, vermutlich durch die Bildung eines Homotetradekamers und/oder die Interaktion mit Clp-ATPasen. B) Auf eine Homooligomerbildung von ClpP1 gibt es bisher keine Hinweise. C) In Anwesenheit beider ClpP-Homologe und unter putativer Beteiligung von Clp-ATPasen können sich beide Homologe vollständig prozessieren und der Komplex kann natürliche Substrate, wie PopR, abbauen. Die Interaktion mit den Clp-ATPasen wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sowohl eine asymmetrische Bindung an nur einen ClpP-Heptamerring als auch eine symmetrische Bindung an beide Ringe ist denkbar. 104
- Abbildung 59: Hypothetisches Modell des Effekts von ADEP1 auf die ClpP-Komplexbildung in *Streptomyces* und des Gegeneffekts des ADEP-resistenten ClpP-Homologs ClpP_{ADEP}. Durch Verdrängung der Clp-ATPase von ClpP1 und anschließender Bindung an dieselben Bindestellen bewirkt ADEP1 eine tödliche Überaktivierung von ClpP1-Homotetradekamer- sowie ClpP1/ClpP2-Heterotetradekamerkomplexen. In Anwesenheit von ClpP_{ADEP} wird ClpP1 auf noch unbekannte Weise detoxifiziert und es entsteht ein ADEP-resistenter, aber voll funktionaler ClpP_{ADEP}/ClpP2/Clp-ATPase-Komplex, der den ClpP1/ClpP2/Clp-ATPase-Komplex ersetzt. 107
- Abbildung 60: Western Blot mit *S. hawaiiensis* Zellextrakten nach Wachstum in TSB- oder YM-VE-Medium und Inkubation für ein, zwei oder drei Tage. Während in beiden Medien an Tag 1 noch eine Verzögerung der ClpP1-Prozessierung und eine mutmaßlich unprozessierte ClpP2-Bande sichtbar sind, ist die primäre Bande an Tag 2 und 3 prozessiertes ClpP1. *S. hawaiiensis* scheint in TSB-Medium schneller die Absterbephase zu erreichen als in YM-VE-Medium (vgl. Abbildung 62). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). 111
- Abbildung 61: Western Blot mit *S. hawaiiensis* Zellextrakten nach Wachstum in YM-MilliQ-Medium für bis zu 90 h. Während nach 24 h noch die unprozessierte ClpP1-Bande dominiert, verschiebt sich dies bereits nach 48 h deutlich zur prozessierten ClpP1-Bande, welche nach drei Tagen fast nicht mehr detektierbar ist. Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1). Die Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces*

ClpP3-Antikörper wurde ebenfalls durchgeführt, aber der Western Blot wird aufgrund des Ausbleibens eines Signals nicht gezeigt..... 111

Abbildung 62: Western Blot-Analyse von Zellextrakten von *S. lividans* $\Delta clpP1$ pIJ6902clpP_{ADEP}, die mit variierenden Induktorkonzentrationen kultiviert wurden (0-10 $\mu\text{g/ml}$ Thiostrepton). Obere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1), untere Reihe: Detektion mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). 111

Abbildung 63: Induzierte Expression von ClpP_{ADEP} und ClpP_{ADEP}-His in *S. lividans* $\Delta clpP1$ ($\Delta clpP1$). Zellextrakte wurden aus Kulturen hergestellt, die für zwei Tage ohne Induktor (-) oder mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Thiostrepton (+) angezogen wurden. Stämme mit pIJ6902 dienten als Leervektorkontrolle. Obere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP1-Antikörper (anti-P1); untere Reihe: Die Detektion erfolgte mit einem primären polyklonalen Hasen-anti-*Streptomyces* ClpP3-Antikörper (anti-P3). Die aufgetragene Proteinmenge pro Extrakt betrug 100 μg . Die Identität der schwachen Bande auf Höhe von ClpP_{ADEP}* in den Proben pIJ6902 (-)/(+), P_{ADEP} (-) und P_{ADEP}-His (-) wurde nicht bestimmt. Abgeleitet von der Laufhöhe könnte es sich dabei um ClpP4 handeln. 112

6.7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Minimale Hemmkonzentrationen für repräsentativ ausgewählte klinische Isolate als Maß für die antibakterielle <i>in vitro</i> -Aktivität verschiedener ADEP-Derivate (Brötz-Oesterhelt et al. 2005, modifiziert). PRSP: Penicillin-resistenter <i>Streptococcus pneumoniae</i> ; VRE: Vancomycin-resistente Entereokokken; MRSA: Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>	9
Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete Geräte.	19
Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Chemikalien.	21
Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Antibiotika.	21
Tabelle 5: In dieser Arbeit verwendete Restriktionsendonukleasen.	21
Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Polymerasen.	21
Tabelle 7: Weitere in dieser Arbeit verwendete Enzyme.	22
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Kits.	22
Tabelle 9: In dieser Arbeit verwendete Antikörper.	22
Tabelle 10: In dieser Arbeit verwendete Primer.	25
Tabelle 11: In dieser Arbeit verwendete Plasmide.	27
Tabelle 12: In dieser Arbeit verwendete Wildtyp-Stämme, Klonierungsstämme, Expressionsstämme und Teststämme.	28
Tabelle 13: In dieser Arbeit erzeugte Stämme für Knockout- und Knockdown-Studien in <i>S. hawaiiensis</i>	29
Tabelle 14: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur heterologen Expression zweier Adenylierungsdomänen.	29
Tabelle 15: In dieser Arbeit erzeugte Stämme für Knockouts verschiedener <i>clpP</i> -Gene in <i>S. lividans</i>	30
Tabelle 16: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur Konjugation und anschließenden Expression verschiedener ClpP-Proteine in <i>S. lividans</i> Wildtyp und Knockout-Stämmen. BT1 im Namen verschiedener Mutanten weist auf das verwendete Plasmid pIJ10257 (mit einer Φ BT1-Integrase) hin, im Gegensatz zu pIJ12551 (mit einer Φ C31-Integrase) ohne Namenszusatz, um differenzieren zu können, welches Vektorsystem genutzt wurde, um das jeweilige <i>clpP</i> -Homolog in den jeweiligen Stamm einzubringen.	32
Tabelle 17: In dieser Arbeit erzeugte Stämme zur Konjugation und anschließenden Expression von ClpP _{ADEP} in verschiedenen <i>Streptomyces</i> -Spezies.	33
Tabelle 18: Stämme zur Konjugation und anschließenden induzierbaren Expression von ClpP _{ADEP} in <i>S. lividans</i> Wildtyp und Knockout-Stämmen.	33
Tabelle 19: Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastenherstellung.	38
Tabelle 20: Puffer und Lösungen für Substratspezifitäts-Assays.	38
Tabelle 21: In dieser Arbeit verwendete Software-Tools und Internetanwendungen.	40
Tabelle 22: Bestandteile verschiedener Ansätze für Verdauung mit Restriktionsendonukleasen.	44
Tabelle 23: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.	44
Tabelle 24: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes mit Proof Reading Polymerasen.	45
Tabelle 25: Cyler-Programm für PCRs mit Proof Reading Polymerasen.	45
Tabelle 26: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes für analytische Zwecke.	45
Tabelle 27: Cyler-Programm für PCRs für analytische Zwecke.	46
Tabelle 28: Cyler-Programm für die qPCR.	47

Tabelle 29: Volumina aller Bestandteile im Substratspezifitäts-Assay und die sich daraus ergebenden Endkonzentrationen.	54
Tabelle 30: Abgeleitete Funktionen der putativen ORFs im <i>ade</i> -BGC.	63
Tabelle 31: Vergleich der auf Basis der Aminosäuren der Substratbindetaschen vorhergesagten Substrate und den tatsächlich von den A-Domänen des <i>ade</i> -BGC eingebauten Aminosäuren.	65
Tabelle 32: Prozentuale Identitätsmatrix von <i>clpP</i> -Genen aus <i>S. hawaiiensis</i> (SH) und <i>S. lividans</i> TK24 (SL), erstellt mit Clustal 2.1.	72
Tabelle 33: Prozentuale Identitäts-Matrix von ClpP-Homologen aus <i>S. hawaiiensis</i> (SH) und <i>S. lividans</i> TK24 (SL), erstellt mit Clustal 2.1.	76
Tabelle 34: Funktionalitäten von ClpP-Protein-Kombinationen. Der Übersichtlichkeit halber wurde in dieser Tabelle zusammengefasst, welche Funktionalitäten bei der Expression von verschiedenen ClpP-Homologen in <i>S. lividans</i> $\Delta clpP1P2$ mittels Western Blot detektiert werden konnten. Die Detektion von ClpP3 diente als Biomarker für einen unvollständigen oder unterbundenen Abbau vom natürlichen Substrat PopR und somit für das Fehlen eines proteolytisch aktiven Komplexes. Im Western Blot konnten außerdem vollständig prozessierte („ja“) oder vollständig unprozessierte („nein“) ClpP-Homologe detektiert werden. „Unvollständig“ beschreibt das Vorhandensein der unprozessierten Form gemeinsam mit der prozessierten Form. „Teilprozessierung“ beschreibt eine Prozessierung, die aber nicht der vollständig prozessierten Form entspricht. Aufgrund der genutzten Antikörper konnten verschiedene ClpP-Homologe und ihre Prozessierung unter bestimmten Bedingungen nicht detektiert werden („nicht detektierbar“).	113

6.8 Publikationen

Thomy, D., Culp, E., Adamek, M., Cheng E. Y., Ziemert, N., Wright, G. D., Sass, P., Brötz-Oesterhelt, H., 2019, „The ADEP biosynthetic gene cluster in *Streptomyces hawaiiensis* NRRL 15010 reveals an accessory *clpP* gene as a novel antibiotic resistance factor“, Appl. Environ. Microbiol. 85 (20) e01292-19

Pan, S., Malik, I., **Thomy, D.**, Heinrichfreise, B., Sass, P., 2019, „The functional ClpXP protease of *Chlamydia trachomatis* requires distinct *clpP* genes from separate genetic loci“, Sci. Rep. 9:14129

Chen, H., Daletos, G., Abdel-Aziz, M.S., **Thomy, D.**, Dai, H., Brötz-Oesterhelt, H., Lin, W., Proksch, P., 2015, „Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture“, Phytochem. Letters 12: 35-41

Ola, A.R.B., **Thomy, D.**, Lai, D., Brötz-Oesterhelt, H., Proksch, P., 2013, “Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Fusarium tricinctum* through coculture with *Bacillus subtilis*“, J. Nat. Prod. 76: 2094-2099

6.9 Danksagung

Während der Zeit meiner Doktorarbeit haben mich viele liebe Menschen begleitet, bei denen ich mich an dieser Stelle von Herzen bedanken möchte.

Prof. Dr. Heike Brötz-Oesterhelt hat mich in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen und mir ein spannendes Projekt für meine Promotion überlassen. Für das in mich gesetzte Vertrauen während meiner wissenschaftlichen Arbeiten, aber auch bei meiner Sekretariatstätigkeit und ihrer Vertretung in San Diego möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Ich danke ihr für ihre Unterstützung bei der Bewerbung um ein Promotionsstipendium und für die fortlaufende Sicherstellung meiner Finanzierung, als auch für ihren wissenschaftlichen Rat und fachliche Diskussionen und die Ermutigung zum fachlichen Austausch beim Besuch verschiedenster Konferenzen und Kongresse. Ihre Förderung einer freundschaftlich-kollegialen Atmosphäre im Laboralltag sowie bei Betriebsausflügen und Feiern mit der ganzen Arbeitsgruppe haben meine Promotion zu einer unvergesslichen Zeit gemacht.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Harald Groß für sein Interesse an meinem Projekt und die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit.

Ich danke Herrn Dr. Philippe Mazodier für seinen Besuch an unserem Institut, für sein Interesse an meiner Arbeit und für das Geschenk der anti-*Streptomyces*-ClpP-Antikörper.

Ein riesiges Dankeschön geht an Frau Dr. Martina Holz, die als iGRASP_{seed}-Kordinatorin immer für Fragen zur Verfügung stand, für die lieben Gespräche bei Meetings und bei der VAAM und ihre Anteilnahme am Fortschreiten meiner Promotion.

Ich danke Melanie Stark für die grandiose Einarbeitung in alle Sekretariatsaufgaben in so kurzer Zeit. Ohne dich wäre ich die ersten Wochen allein komplett verloren gewesen!

Herr Dr. Peter Sass hat mich während eines dreimonatigen Praktikums in die Welt der Mikrobiologie eingeführt, was mich schließlich davon überzeugt hat, dass eine Promotion in der Antibiotikaforschung eine gute Entscheidung ist und stand mir, ganz besonders zu Beginn meiner Doktorarbeit, mit Rat und Tat zur Seite. Lieber Peter, vielen Dank für dein geballtes Mikrobiowissen, von dem du so einiges an mich weitergegeben hast. Besonders die kurzen Gespräche über meine geplanten Experimente haben mich oft bestätigt oder Denkfehler aufgespürt und mir so einige Laborfrustration erspart. Ich danke dir für deine Zeit, vor allem wenn es eigentlich keine freie Minute gab, für deine kritischen Fragen, die zum Nachdenken anregen, und für dein offenes Ohr in vielen Belangen. Und für das Auffüllen der Schokoladen- und Gummibärcenvorräte, das Vorlassen an der Kaffeemaschine, das Anfeuern beim Staffellauf...die vielen kleinen Dinge, die aber viel Freude bereiten.

Ein ganz lieber Gruß geht an meine Düsseldorfer Kolleginnen und Kollegen, die in den ersten beiden Jahren meiner Promotion an der HHU Düsseldorf gute Freunde geworden sind. Heike Goldbach-Gecke, Kirsten Famulla, Catherine Ciglia und Lena Hammerschmidt, ihr habt mich von Anfang an so lieb aufgenommen und direkt in eure morgendliche Kaffee-Therapie-Gesprächsrunde integriert. Ob Karneval, Pharmapartys, Mädelsabende oder Kochevents, es gibt so viele schöne Erinnerungen, für die ich mich gerne bedanken möchte. Unvergessen bleiben auch das Backstreet Boys-Konzert mit anschließender Parkhausparty und Catherines Hochzeit in Pescara! An dieser Stelle auch ein großes Dankeschön an Emanuele Ciglia (Hallo du Mövenkopf), Andreas Marmann (ich hatte nie Angst vor dir, nur sehr großen Respekt) und Thomas Gecke (ein Master des Grills und der italienischen Küche) für den ganzen Quatsch, die Gespräche und eine wunderschöne Zeit!

Liebe Kollegen und Wegbegleiter sind so wichtig für das allgemeine Wohlbefinden, zum Feiern in den guten Zeiten, aber ganz besonders für den Beistand in den Zeiten, in denen einfach nichts funktioniert. Meine lieben HBOs, wir haben so viel Zeit miteinander verbracht, an der Uni aber auch außerhalb, wir haben gelacht und geweint, diskutiert und philosophiert, Sport getrieben und uns vollgefuttern, und ich werde schon jetzt ganz emotional, wenn ich daran denke, dass ich euch alle bald nicht mehr jeden Tag sehen werde. Die erste Zeit in Tübingen nach unserem Umzug war schon ganz schön einsam, wodurch ich besonders zu schätzen weiß, dass sich hier mittlerweile so ein großer bunter Haufen von lieben Menschen zusammengefunden hat. Es würde den Rahmen meiner (bereits sehr langen) Danksagung sprengen, wenn ich alle meine Lieblingserinnerungen mit euch aufzählen würde, deshalb halte ich es kurz: Ich danke euch allen für eine ganz wunderbare Zeit!

Gar nicht genug danken kann ich Nadine Silber, meiner Lieblingskollegin, Partnerin in crime in vielen Lebenslagen, Sportkameradin und Mitbegründerin unseres Traditionsunternehmens Nada-Tours. Ohne dich, deine Freundschaft und Unterstützung, deine Spontanität und deine Freude daran, immer mal was Neues auszuprobieren wären meine Promotion und auch meine Freizeit in Tübingen mit Sicherheit nur maximal halb so lustig geworden. Deine positive Art zeigt mir einfach immer wieder, dass Lachen die beste Medizin ist. Und Schlafen natürlich. Ich freu mich schon auf unseren Lebensabend auf dem Selbstversorgerbauernhof ☺

Und auch außerhalb meiner AG habe ich viele liebe Menschen getroffen. Der AG Götz danke ich dafür, dass sie uns nach unserem Umzug so freundlich aufgenommen haben und für die vielen schönen und lustigen Momente, die das gemeinsame Leben im 7. Stock so mit sich bringt. Patrick, Sebastian und allen weiteren Teilnehmern danke ich für so manches Bier um 4 inklusive mehr oder weniger tiefgründiger Gespräche. Mulu danke ich für geteilte Freude und geteiltes Leid, an so vielen Wochenenden im Labor, aber gerne auch mal bei Eis oder Kaffee. Endspurt, Mulu! Meinen Pommies-mit-Pommies-Freundinnen Julia, Luise und Nadine danke ich für viele schöne Abende mit veganem Essen und unseren Stickleben. Beste Grüße gehen auch an Nico, meinen einzigen Pharmazeuten-Freund in der Mikrobiologie, und an alle Freunde des 100 km-Staffellaufs.

Großen Anteil an meinem allgemeinen Wohlbefinden in Tübingen hatten auch meine lieben Mitbewohner. Moni, ich bin so froh, dass es beim ersten Skype-Interview direkt zwischen uns gefunkt hat und du meine erste Tübinger Freundin geworden bist! Danke für ein tolles Jahr als Mitbewohnerinnen und viele weitere als Fastnachbarinnen und was auch immer als nächstes kommt.

Meinen Vermietern Bernd und Karin Kaipf danke ich für die familiäre Atmosphäre und die vielen lieben Gespräche. Danke, dass ihr euch immer gekümmert habt, ob Gastherme, Spülmaschine, Paketannahme oder frisches Obst und Gemüse, auf euch ist einfach immer Verlass!

Ein riesiges Dankeschön geht auch an meine Mitbewohner im lila Haus, ganz besonders Luisa, Markus und Mary. Ich danke euch für die schöne Zeit, unzählige Gespräche in der Küche, Joggen, Weihnachtsmarkt, Partys und alles andere, was mich die Uni hat mal vergessen lassen.

Und natürlich möchte ich auch noch einem ganz besonderen Mitbewohner danken, dem Mitbegründer unseres Kegelstammtisches und drittbesten Koch in Baden-Württemberg: Lieber Leo, es ist so schön, dass du bei uns eingezogen bist und mit mir die Stellung hältst, wenn alle anderen mal wieder ausgeflogen sind. Seitdem weiß ich auch, warum man Risotto erst mit Wein ablöscht und Pudding nicht mit Hafermilch kochen kann, und du weißt jetzt hoffentlich, dass

Düsseldorf weder im Ruhrgebiet noch in Norddeutschland liegt. Ich hoffe wir werden in der Zukunft noch viele Canapés zusammen essen.

Laura Caspers danke ich für ihre Freundschaft und ihre Unterstützung bei den kleinen und großen Problemen des Lebens und das schon seit vielen, vielen Jahren. Gerade, dass wir eigentlich nie über meine Doktorarbeit reden, war die größte Stütze, die du mir geben konntest. Auch wenn uns die Entfernung von so manchem gemeinsamen Abenteuer abhält, ist es doch als wär ich nie weg gewesen, wenn wir uns sehen, und das ist einfach wunderbar.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern und meinem Bruder für die uneingeschränkte Unterstützung, nicht nur während meiner Promotion, sondern in allen Lebenslagen. Es ist schön zu wissen, dass ihr immer da seid, wenn auch nicht physisch, dann aber am Telefon. Unsere Telefonkonferenzen und meine Kurzurlaube zu Hause waren immer gut und nötig, um meinen Akku mal wieder aufzuladen. Ihr habt meine zeitweise Laborfrustration in allen Nuancen mitbekommen und könnt mich trotzdem noch leiden, das ist schön zu wissen und dafür danke ich euch. John, ich bin froh, dass dir Tübingen genauso gut gefällt wie mir und du mich so fleißig besucht hast. Egal, wo es als nächstes hingehet (auch wenn es keinen Bäcker vom Vortag gibt), meine Pension hat für dich immer ein Zimmer frei und ich hoffe du kommst weiterhin ganz oft zu Besuch!

Von ganzem Herzen danke ich meinem Freund und Partner Tom Scott. Tom, your unlimited support and advice, in all things scientific, but also in every other sphere, have been tremendously important to me and also had a huge impact on my getting through the PhD. At those times when I was ready to give up and open a vegan café or a guinea pig farm, you bore the grumpy me without complaint and always kept me going and believed in me. Thank you so much!