

**Entdeckung des neuen  
Candidatus Phylums *Poribacteria***

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg

vorgelegt von

Lars Fieseler

aus

Warburg

Würzburg, Januar 2005

Eingereicht am: 04. Februar 2005

#### Mitglieder der Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. Dr. h.c. Ulrich Scheer

1. Gutachter: PD Dr. Ute Hentschel

2. Gutachter: Prof. Dr. Roland Benz

3. Gutachter: PD Dr. Michael Steinert

# Erklärung

Gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Dissertation hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen. Ich erkläre weiterhin, dass ich früher weder akademische Grade erworben habe, noch versucht habe zu erwerben.

Würzburg, im Januar 2005

(Lars Fieseler)

# Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an die folgenden Personen:

PD Dr. Ute Hentschel für ihre stete Diskussionsbereitschaft und die immer freundschaftliche und gute Betreuung meiner Arbeit,

Prof. Dr. Jörg Hacker für meine Aufnahme im European Graduate College „Gene Regulation in and by Microbial Pathogens“,

Prof. Dr. Roland Benz für die Erstellung des Zweitgutachtens,

PD Dr. Michael Steinert für den Beitritt zur Prüfungskommission,

Prof. Dr. Philippe LeBaron für die Möglichkeit meines Aufenthalts im Laboratoire Arago in Banyuls sur Mer, Frankreich,

Prof. Dr. Christa Schleper und Dr. Achim Quaiser für die erfolgreiche Kooperation und Einführung in „large insert“-Klonierungstechniken an der Technischen Universität Darmstadt,

Dr. Matthias Horn für die Kooperation während der phylogenetischen 16S rRNA Analysen, meinen Freunde und Kollegen, besonders Matthias Scheuermayer und Christine Gernert, Hennes Kränzler, Artur Altenhöfer, Martin Eckert und Hilde Merkert,

allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs,

dem Dude für die Musik,

und meinen Eltern Brigitte und Gerhard Fieseler,

und Silke.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung, Summary</b>	17
<b>2. Einleitung</b>	21
2.1 Phylogenetische Charakterisierung mikrobieller Diversität	21
2.2 Die Beschreibung des unbekanntes Genpools nicht kultivierter Mikroorganismen	24
2.3 Porifera	27
2.3.1 Morphologie	28
2.3.2 Die Mikroflora mariner Demospongiae	29
2.3.3 Biotechnologisches Potenzial	33
2.4 Zielsetzung dieser Arbeit	35
<b>3. Methoden</b>	37
3.1 Probennahme	37
3.2 Gewinnung mikrobieller Biomasse aus <i>Aplysina aerophoba</i>	38
3.3 Mikroskopie	38
3.3.1 Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
3.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	39

<b>3.4 Nukleinsäureanalytische Methoden</b>	<b>39</b>
3.4.1 Isolation genomischer DNA	39
<i>Isolation genomischer DNA aus E. coli</i>	39
<i>Isolation genomischer DNA aus Gewebe mariner Demospongiae</i>	39
<i>Extraktion genomischer DNA aus mikrobieller Biomasse aus A. aerophoba</i>	40
<i>Isolation genomischer DNA aus Bakterioplankton</i>	40
<i>Isolation hoch molekularer DNA aus mikrobieller Biomasse aus A. aerophoba</i>	40
<i>Isolation von DNA Fragmenten aus Agarose Minigelen</i>	41
3.4.2 RNA Isolation	41
3.4.3 Elektrophoretische Methoden für die Nukleinsäureanalyse	41
<i>Agarose Minigele</i>	41
<i>Präparative Puls Feld Gelelektrophorese (PFGE)</i>	42
<i>Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)</i>	42
3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung	43
3.4.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)	43
3.4.6 cDNA Synthese und RT-PCR	44
3.4.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA	44
3.4.8 Enzymatische Hydrolyse von hoch molekularer DNA in Agarose	45
3.4.9 Dephosphorylierung von DNA 5'-Enden	45
3.4.10 Klonierungen	45
<i>T/A Klonierungen</i>	45
<i>Klonierung von DNA Restriktionsfragmenten</i>	45
<i>Klonierung hoch molekularer DNA</i>	46
3.4.11 Transfer von Plasmiden in <i>E. coli</i>	46
<i>Herstellung elektrokompetenter E. coli und Elektroporation</i>	46
<i>Transduktion des hoch molekularen DNA Ligationsansatzes in E. coli EPI 100<sup>TM</sup></i>	47
3.4.12 Archivierung der Metagenombank APAE02	47
3.4.13 Plasmid Präparationen	47
<i>Analytische Plasmid-Mini-Präparationen</i>	47
<i>Präparation rekombinanter Fosmide aus APAE02 „Pools“</i>	47
<i>Plasmid-Midi-Präparationen</i>	48

---

3.4.14	Kolonie-Blot Analysen	48
	<i>Transfer von E. coli Einzelkolonien auf Nylonmembranen</i>	48
	<i>Markierung der DNA Sonden</i>	48
	<i>Hybridisierung und Signaldetektion</i>	49
3.4.15	DNA Sequenzierungen	49
3.4.16	Sequenzannotation und Sequenzalignments	49
<b>3.5</b>	<b>Proteinanalytische Methoden</b>	50
3.5.1	Expression der poribakteriellen Oxidoreduktase in <i>E. coli</i>	50
3.5.2	Elektrophoretische Methoden für die Proteinanalyse	50
	<i>Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)</i>	50
	<i>Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen</i>	50
<b>3.6</b>	<b>Funktionelle Screens der Metagenombank</b>	51
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	53
<b>4.1</b>	<b>Beschreibung des neuen Candidatus Phylums <i>Poribacteria</i></b>	53
4.1.1	<i>Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)</i>	53
4.1.2	<i>Phylogenetische Analyse von 16S rRNA Genen</i>	55
4.1.3	<i>Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)</i>	58
4.1.4	<i>Verbreitung von Poribacteria</i>	60
<b>4.2</b>	<b>Konstruktion der Metagenombank APAE02</b>	61
4.2.1	<i>Präparation mikrobieller Biomasse aus Aplysina aerophoba</i>	61
4.2.2	<i>Isolation hoch molekularer genomischer DNA</i>	63
4.2.3	<i>Charakteristika der Metagenombank APAE02</i>	63
<b>4.3</b>	<b>Screening der Metagenombank APAE02</b>	65
4.3.1	<i>Ermittlung der metagenomischen phylogenetischen Diversität</i>	65
4.3.2	<i>Nachweis eines poribakteriellen genomischen DNA Fragments</i>	67

<b>4.4</b>	<b>Sequenzanalyse des poribakteriellen Metagenomklons</b>	68
4.4.1	<i>Annotation der „open reading frames“ (ORFs)</i>	68
	<i>Nachweis eines geteilten rrn Operons</i>	72
	<i>Orthologe ORFs in Rhodopirellula baltica</i>	74
	<i>Putative Transmembranproteine</i>	75
	<i>Charakterisierung weiterer ORFs</i>	77
4.4.2	<i>In silico Detektion einer Molybdän enthaltenen Oxidoreduktase (MOCO)</i>	77
	<i>Heterologe Expression der poribakteriellen Oxidoreduktase</i>	82
<b>4.5</b>	<b>Polyketidsynthesen (PKS)</b>	83
4.5.1	<i>Phylogenetische Analyse</i>	83
4.3.2	<i>Annotation der PKS Typ I Systeme</i>	86
<b>4.6</b>	<b>Funktionelle Screens der Metagenombank APAE02</b>	87
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	89
<b>5.1</b>	<b>Mikrobielle Diversität</b>	89
<b>5.2</b>	<b>Das neue Candidatus Phylum <i>Poribacteria</i></b>	90
5.2.1	<i>Phylogenetische Position</i>	90
5.5.2	<i>Struktur des poribakteriellen rrn Operons</i>	92
5.5.3	<i>Annotation poribakterieller „open reading frames“ (ORFs)</i>	93
	<i>Orthologe ORFs</i>	94
	<i>Poribacteria-spezifische Transmembranproteine</i>	94
	<i>MOCO-Oxidoreduktase</i>	95
	<i>Heterologe Expression der poribakteriellen MOCO-Oxidoreduktase</i>	96
<b>5.3</b>	<b><i>Poribacteria</i> versus <i>Planctomycetes</i></b>	97
<b>5.4</b>	<b>Die Assoziation von <i>Poribacteria</i> mit <i>Demospongiae</i></b>	100
<b>5.5</b>	<b>Metagenomanalysen</b>	102
5.5.1	<i>Abdeckung von Metagenombanken</i>	102
<b>5.6</b>	<b>Polyketidsynthesen (PKS)</b>	105
<b>5.7</b>	<b>Funktionsbasierte Aktivitätsscreens</b>	107



<b>5.8</b>	<b>Ausblick</b>	108
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	109
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	129
7.1	Materialien	129
7.2	Lösungen, Puffer und Medien	137
7.3	Größenstandards für Gelelektrophoresen	141
7.4	Abkürzungsverzeichnis	143
<b>8.</b>	<b>Publikationen</b>	145
<b>9.</b>	<b>Tagungsbeiträge und Workshops</b>	146
<b>10.</b>	<b>Curriculum Vitae</b>	147

Anlagen: CD ROM



# 1. Zusammenfassung

Marine Schwämme (Porifera) sind sessile Invertebraten, deren Biomasse bis zu 60% von assoziierten Mikroorganismen gebildet werden kann. Dieses mikrobielle Konsortium ist phylogenetisch komplex, die monophyletischen Abstammungslinien sind hochgradig wirtsspezifisch und bisher konnte kein Vertreter dieser Mikroflora kultiviert werden. In seiner Zusammensetzung unterscheidet sich dieses Konsortium sowohl von der Mikroflora mariner Sedimente, als auch vom marinen Bakterioplankton.

Durch 16S rRNA Sequenzanalysen und Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) konnte während dieser Arbeit das neue Candidatus Phylum *Poribacteria* kultivierungsunabhängig identifiziert werden. *Poribacteria* bilden definitionsgemäß ein unabhängiges Candidatus Phylum, da sie weniger als 75% Sequenzhomologie innerhalb der 16S rRNA zu anderen prokaryontischen Phyla zeigen. Sie sind verwandt mit *Planctomycetes*. Der Name „*Poribacteria*“ wurde gewählt, da diese Organismen spezifisch mit marinen Porifera assoziiert zu sein scheinen. Bisher konnten *Poribacteria* in Porifera der Ordnungen *Verongida*, *Haplosclerida* und *Lithistida* nachgewiesen werden, während sie in den Ordnungen *Poecilosclerida*, *Agelasida*, *Halichondrida* und *Hadromerida* nicht nachweisbar waren. Im marinen Sediment und im Bakterioplankton wurden *Poribacteria* ebenfalls nicht detektiert. Durch FISH Analysen wurde deutlich, dass *Poribacteria* in *A. aerophoba* (*Verongida*) eine abundante Fraktion der assoziierten Mikroflora bilden.

Da Vertreter des mikrobiellen Konsortiums mariner Schwämme bisher nicht kultiviert werden konnten, wurde das „Metagenom“ dieser Mikroorganismen durch die *ex situ* Isolierung hoch molekularer DNA direkt kloniert. Eine Charakterisierung von Metagenomen erlaubt unabhängig von der Kultivierbarkeit der entsprechenden Organismen direkte Einblicke in deren Genotyp und liefert so eine erste Verbindung zwischen phylogenetischer Diversität und physiologischen Eigenschaften. Für die Erstellung der Metagenombank wurde mikrobielle Biomasse aus *A. aerophoba* vom Mesohyl getrennt und lysiert und die gereinigte DNA in Fosmid Vektoren in *E. coli* kloniert. Die resultierende Metagenombank APAE02 umfasst ca. 1,1 Gb hoch molekularer prokaryontischer genomischer DNA. Eine Bestimmung der in dieser Metagenombank archivierten mikrobiellen Diversität lieferte zusätzlich zu bekannten 16S rRNA kodierenden Loci aus *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* und *Gammaproteobacteria* einen 16S rRNA kodierenden poribakteriellen Fosmidklon. Die Annotation der flankierenden genomischen Regionen des 16S rRNA Gens führte zur

Detektion eines unterbrochenen *rrn* Operons, eines wahrscheinlich neuen Transporters, einer neuen Molybdän enthaltenen Oxidoreduktase und orthologer „open reading frames“ (ORFs) aus *Rhodopirellula baltica* (*Planctomycetes*) in *Poribacteria*. Die Charakterisierung dieses 38,7 kb DNA Fragmentes stellt die Basis für weitere genomische Untersuchungen an *Poribacteria* dar.

Metagenombanken repräsentieren eine reichhaltige Quelle zum Nachweis neuer Enzyme oder Biosyntheseoperons. Somit konnten in der Metagenombank APAE02 neuartige Typ I Polyketidsynthasen (PKS) nachgewiesen werden. Phylogenetische Analysen der Ketosynthasedomäne zeigten, dass diese Systeme nicht herkömmlichen Typ I cis-AT bzw. trans-AT (Acyltransferase) PKS Systemen zugeordnet werden können. Die kodierenden Bereiche der PKS Systeme sind mit nur ca. 10 kb relativ klein. Im Gegensatz zu der Organisation sich wiederholender multipler Module herkömmlicher PKS Typ I Systeme bestehen sie nur aus einem einzigen Modul und könnten vermutlich bei der Synthese von Fettsäuren beteiligt sein. Die Struktur und Funktion der Produkte ist bisher unbekannt.

Generell ist durch *in silico* Analysen eine Abbildung des „funktionellen Repertoires“ unkultivierter Mikroorganismen möglich. Es wäre denkbar, dass durch weitere Studien fundierte Einblicke in den Genpool der *Poribacteria* und anderer Organismen des mikrobiellen Konsortiums aus Poriferen eröffnet werden, um metabolische Eigenschaften zu rekonstruieren und die Mechanismen zur Interaktion mit dem Wirt verstehen zu können.

# 1. Summary

Marine sponges (Porifera) are sessile invertebrates which are associated with a phylogenetically complex, yet host-specific microbial consortium. The microorganisms can contribute up to 60% of the sponge biomass. None of the corresponding bacteria could be cultivated applying standard laboratory culturing techniques.

Among this microbiota 16S rRNA gene sequence analyses and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) revealed the detection of a novel candidate phylum, termed *Poribacteria*, independently of cultivation. By definition *Poribacteria* represent a candidate phylum, because they exhibit less than 75% similarity with 16S rRNA sequences of other bacterial phyla. They are moderately related to *Planctomycetes*. The name “*Poribacteria*” was chosen to acknowledge their specific association with marine Porifera. *Poribacteria* have been detected in sponges of the orders *Verongida*, *Haplosclerida* and *Lithistida*, while they could not be detected in *Poecilosclerida*, *Agelasida*, *Halichondrida* and *Hadromerida* and neither in marine sediments or bacterioplankton. FISH analyses implied that *Poribacteria* represent an abundant and metabolically active part of the microbial consortium of *A. aerophoba*.

Because none of the sponge-associated microorganisms have been cultivated so far, the *ex situ* isolation and cloning of the corresponding “metagenome” was performed. Metagenomics enables first insights into the biology and genotypes of so far uncultured microbes. For the construction of the DNA library microbial biomass was separated from the mesohyl of *A. aerophoba* and lysed, followed by cloning of the purified DNA into a fosmid vector in *E. coli*. The constructed metagenome library harbours ca. 1.1 Gb of procaryotic high molecular weight genomic DNA. A determination of the phylogenetic diversity filed in this library resulted in the detection of sponge specific microbial lineages of the *Cyanobacteria*, *Chloroflexi*, *Acidobacteria* und *Gammaproteobacteria* as well as a poribacterial 16S rRNA gene encoding clone. The annotation of the 16S rRNA gene flanking genomic regions revealed an unlinked *rrn* operon, a putatively novel transporter, channel or pore, a new molybden containing oxidoreductase and orthologous open reading frames (ORFs) of *Rhodopirellula baltica* (*Planctomycetes*) in *Poribacteria*. The 38.7 kb poribacterial clone now provides a starting point for further genomic studies.

Metagenome libraries represent a rich source for the detection of novel enzymes or biosyntheses operons. Therefore the metagenome library was further screened which led to

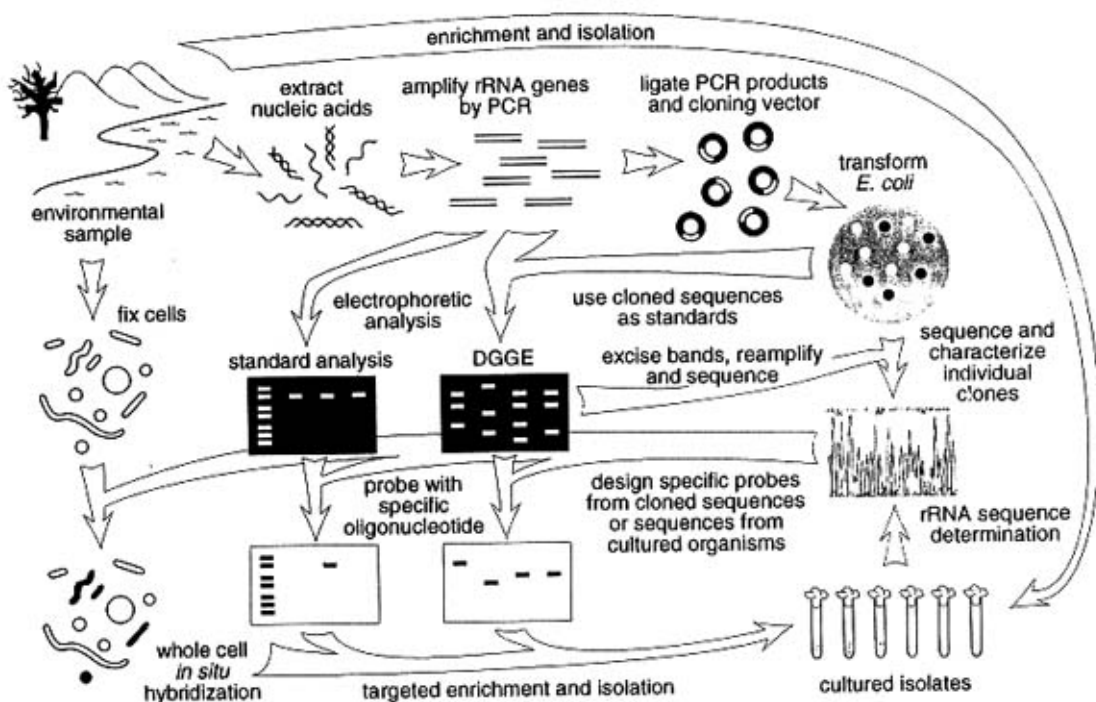
the discovery of a novel kind of type I polyketidesynthases (PKS) among the sponge microbiota. Phylogenetic analyses suggested that the PKS systems do not belong to the conventional cis-AT or trans-AT (acyltransferase) PKS systems. The coding regions are relatively small (10 kb). The systems contain only one module which is in contrast to the iterative multiple modul structure of conventional PKS type I systems. The sponge-derived PKS systems may be involved in the syntheses of fatty acids.

In general *in silico* analyses allows the documentation of genomic features of uncultured microbes. Further sequencing of metagenome clones could provide additional insights into the genepool of *Poribacteria* and other members of the sponge microbial consortium, which could lead to the description of metabolic properties and the mechanisms behind their interaction with the sponge host.

## 2. Einleitung

### 2.1 Phylogenetische Charakterisierung mikrobieller Diversität

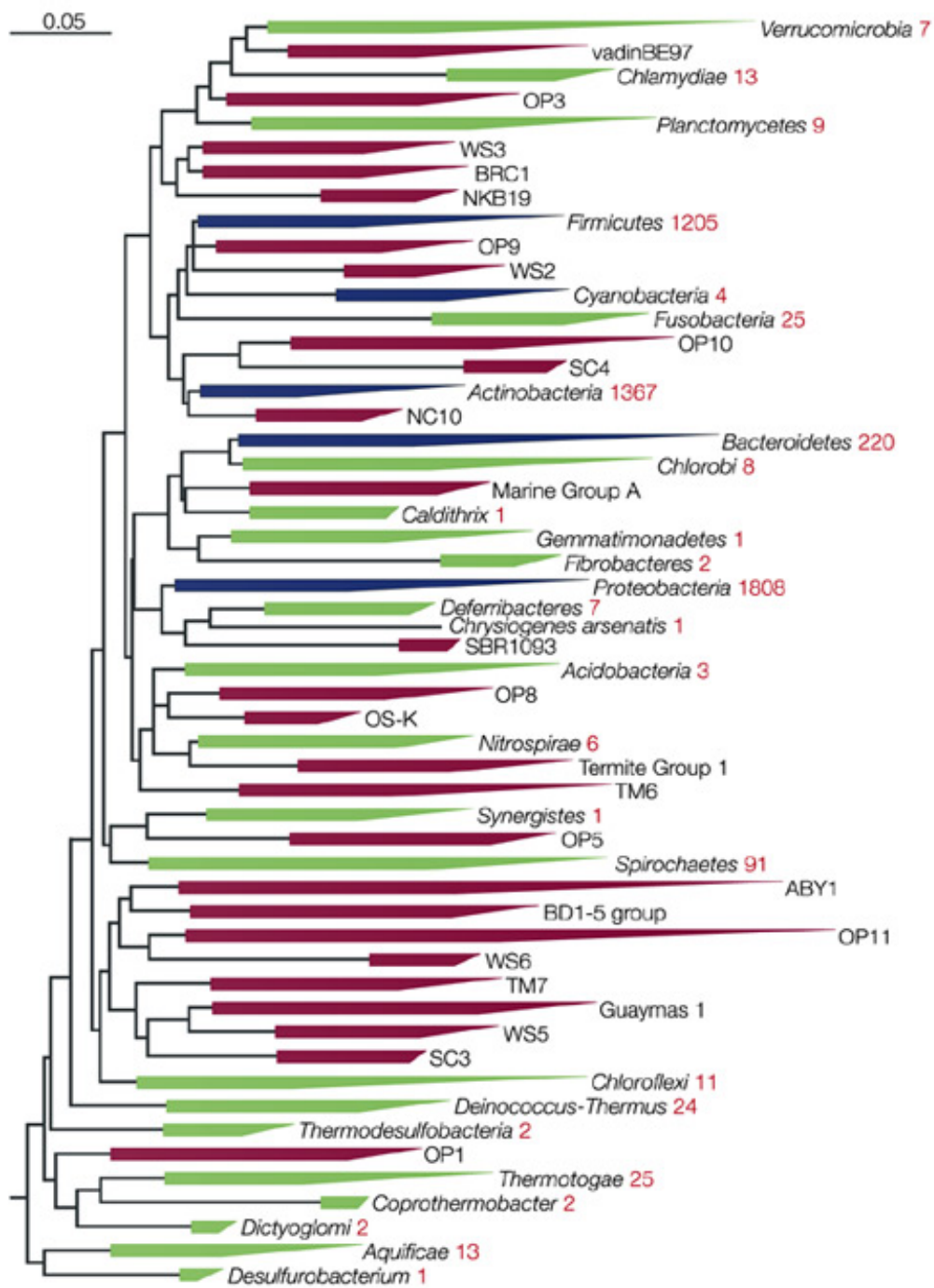
Das Phänomen der „great plate count anomaly“ beschreibt, dass gegenwärtig maximal nur 0,1-1% der existierenden prokaryontischen Organismen durch so genannte Standardmethoden kultiviert werden kann (Amann et al. 1995). Für detaillierte phylogenetische Analysen und zur Identifizierung von Prokaryonten in komplexen mikrobiellen Gemeinschaften werden daher, unabhängig von der Kultivierbarkeit der entsprechenden Organismen, 16S rRNA Sequenzanalysen herangezogen (Olsen et al. 1986, Woese et al. 1990, Wagner et al. 1993, Amann et al. 1995, Hugenholtz et al. 1998a, Head et al. 1998). Abbildung 1 gibt schematisch die Methoden wieder, mit denen mikrobielle Gemeinschaften phylogenetisch charakterisiert werden können.



**Abbildung 1** Schematische Darstellung des „whole 16S rRNA approaches“ zur Analyse mikrobieller Konsortien (aus Head et al. 1998).

Die 16S rRNA ist ein ubiquitäres Makromolekül, welches im Komplex mit Proteinen der kleinen bakteriellen ribosomalen 30S Untereinheit vorkommt. Während der Translation interagiert die 16S rRNA mit der mRNA. Die 16S rRNA eignet sich besonders gut für die molekulare Klassifizierung von Bakterien, da neben hoch konservierten Sequenzbereichen variable Signaturbereiche auftreten, die eine Differenzierung unterschiedlicher Bakterien bis zur Artenebene erlauben. In Kombination mit FISH kann ein detailliertes Abbild über die Struktur komplexer, nicht kultivierter mikrobieller Gemeinschaften erstellt werden (Amann et al. 1995). Neben der 16S rRNA können weitere phylogenetische Marker zur Analyse phylogenetischer Verwandtschaftsverhältnisse, wie zum Beispiel *rpoB*, die beta Untereinheit der RNA Polymerase, EF-Tu, ein Elongationsfaktor des Translationsprozesses oder *recA*, eine Rekombinase, herangezogen werden. Während paralleler Analyse dieser Marker erscheinen die phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisse kongruent. In Standarduntersuchungen wird meist auf die 16S rRNA Sequenz zurückgegriffen, weil ein enorm großer Referenzdatensatz in öffentlich zugänglichen Datenbanken archiviert ist. Momentan befinden sich in diesen Datenbanken ca. 70000 16S rRNA Sequenzen (Ribosomal Database Project II, Cole et al. 2003 bzw. NCBI Datenbank, Stand Dezember 2004). Durch die mikrobielle Diversitätsanalyse mittels phylogenetischer Markermoleküle entstand in den letzten drei Jahrzehnten schnell das Bild einer sehr viel größeren mikrobiellen Diversität als sie in Stammsammlungen repräsentiert wird. Momentan sind 26 bakterielle Phyla bekannt aus denen Kulturen vorliegen. Parallel dazu wurden in den vergangenen Jahren 26 weitere bakterielle Phyla auf 16S rRNA Sequenzebene nachgewiesen, von denen bisher keine kultivierten Vertreter vorliegen. Diese werden im allgemeinen als „candidate phylum“ (engl.: „Candidatus Phylum“) bezeichnet (Keller und Zengler 2004, Abbildung 2). Somit hat die Charakterisierung von 16S rRNA Genen wesentlich zur Beschreibung neuer mikrobieller Abstammungslinien beigetragen. Da sich 16S rRNA Untersuchungen allerdings lediglich auf die Analyse eines einzelnen phylogenetischen Markermoleküls beschränken, können – außer in Kombination mit autoradiographischen Techniken (Lee et al. 1999) – keine Rückschlüsse auf physiologische oder funktionelle Eigenschaften der entsprechenden Organismen gezogen werden (Beja 2004). Hinweise auf deren Physiologie ergeben sich lediglich aufgrund des Verwandtschaftsniveaus zu bestimmten funktionellen Gruppen innerhalb eines bereits ausreichend charakterisierten bakteriellen Phylums.





**Abbildung 2** Phylogenetische Analyse aller 52 bisher identifizierten bakteriellen Phyla und Candidatus Phyla (aus Keller und Zengler 2004).

## 2.2 Die Beschreibung des unbekanntes Genpools nicht kultivierter Mikroorganismen

Da eine phylogenetische Charakterisierung unbekannter Mikroorganismen via 16S rRNA Analysen keine Einblicke in physiologische Charakteristika erlaubt, wurde in den vergangenen Jahren der „revers-genetische“ Ansatz der Metagenomik etabliert. Die Genomik beschreibt allgemein die Sequenzanalyse des gesamten Genoms eines Organismus. Zum aktuellen Zeitpunkt sind in öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken 208 vollständige mikrobielle Genome abgelegt worden (Archaea: 20, Bacteria: 188, <http://www.ncbi.nih.gov/genomes/Complete.html>, Stand Dezember 2004). Die Annotation der kodierenden Bereiche des Genoms ermöglicht eine detaillierte spezifische Rekonstruktion von Stoffwechselwegen und erlaubt Einblicke in physiologische Eigenschaften und funktionelle Mechanismen (Beja 2004, Tyson et al. 2004, Hallam et al. 2004).

Durch enorme Fortschritte der Molekularbiologie werden immer mehr Genome in kürzester Zeit sequenziert. Ein sich abzeichnender Trend ist die zunehmende Genomsequenzierung nicht-kultivierter Mikroorganismen. Oft handelt es sich bei diesen Untersuchungsobjekten um Symbionten (z.B. obligat intrazelluläre Organismen wie *Neochlamydia* sp. (Horn et al. 2004) oder *Buchnera* sp. (Shigenobu et al. 2000), physiologisch und zellbiologisch sehr ungewöhnlichen Organismen (z.B. *Epulopiscium fishelsonii*, bisher größtes heterotrophes Bakterium, welches interzelluläre Tochterzellen hervorbringt, Nelson 2003, 2004) oder seit kurzem um Organismen aus komplexen mikrobiellen Konsortien (z.B. *Leptospirillum* sp. oder *Ferroplasma* sp., Tyson et al. 2004). Aufgrund der phylogenetischen Komplexität des Ausgangsmaterials wird letzterer Ansatz u.a. als „Metagenomik“ bezeichnet (Handelsman 2004, Riesenfeld et al. 2004). Die Metagenomik überschreitet dabei zusehends die Beschreibung einzelner genomischer Fragmente und neuartiger „open reading frames“ (ORFs). Tyson et al. (2004) beschreiben in ihrer Arbeit die Rekonstruktion von zwei fast kompletten bakteriellen Genomen und dreier weiterer lückenhafter Genome aus einem mikrobiellen Biofilm geringer Diversität.

Mikrobielle Biomasse und genomische DNA werden für diese Untersuchungen *ex situ* aus einem entsprechenden Habitat isoliert ohne die Organismen zu kultivieren. Durch Metagenomanalysen kann theoretisch jedes Gen eines nicht-kultivierten Prokaryonten isoliert und Stoffwechselwege *in silico* beschrieben werden (Handelsman 2003, Tyson et al. 2004, Hallam et al. 2004). Darüber hinaus werden evolutionäre Mechanismen und Auswirkungen der Genomplastizität sichtbar und erlauben Einblicke in die Adaptation eines Organismus auf

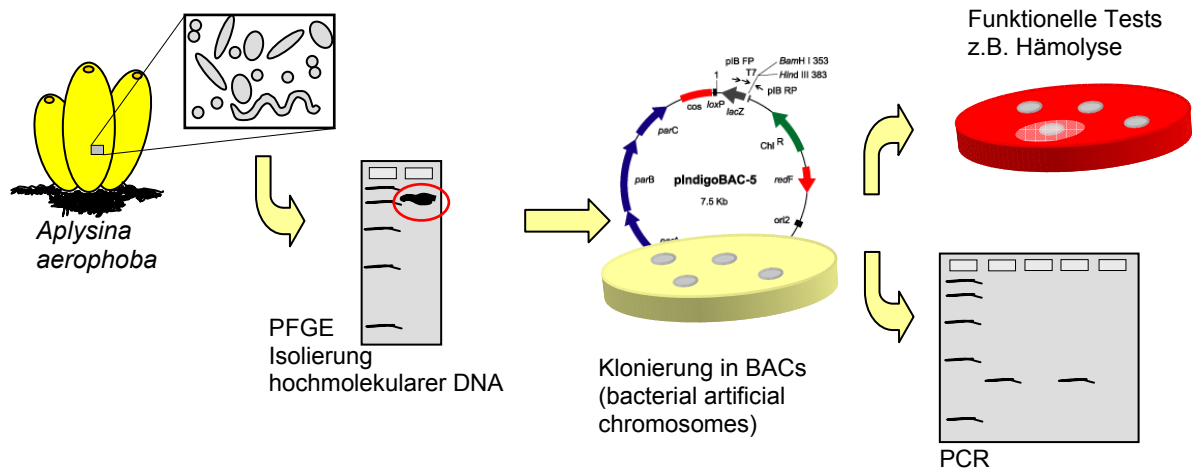
Umweltveränderungen (Horn et al. 2004, Quaiser et al. 2003). Die nicht-kultivierte mikrobielle Fraktion, welche eine der größten Quellen neuer biotechnologisch wertvoller Genprodukte repräsentieren könnte, kann durch Metagenomik somit direkt erschlossen werden (Lorenz et al. 2002).

Der Ansatz des direkten Klonierens von DNA Fragmenten aus Umweltproben wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen dokumentiert (Beja et al. 2000a, Liles et al. 2003, Schmeisser et al. 2003, López-García et al. 2004). Eine einflussreiche Publikation lieferte die Entdeckung des Proteorhodopsins eines gammaproteobakteriellen Metagenomklones, was fundamentale Einblicke über die Energiegewinnung dieser Organismen im offenen Ozean erbrachte (Beja et al. 2000b). Quaiser et al. (2002, 2003) charakterisierten erste genomische Fragmente eines unkultivierten Crenarchaeums und entsprechende Fragmente unkultivierter *Acidobacteria* aus Böden. Die Charakterisierung acidobakterieller genomischer Fragmente lieferte Hinweise auf horizontale Gentransferereignisse zwischen *Acidobacteria* und *Rhizobiales*. Schleper et al. (1997, 1998) charakterisierten mittels des direkten Klonierens großer genomischer DNA-Fragmente die DNA-Polymerase des unkultivierten Endosymbionten *Crenarchoeum symbiosum* des marinen Schwammes *Axinella mexicana* und wiesen zwei koexistierende *C. symbiosum* Varianten nach, welche spezifisch mit *A. mexicana* assoziiert sind.

Für die Erstellung von Metagenombanken wird hoch molekulare DNA *ex situ* aus einer Umweltprobe isoliert und kloniert und liefert somit die Genomäquivalente der im jeweiligen Habitat vorkommenden Mikroorganismen. Für die Klonierung der DNA Fragmente werden „bacterial artificial chromosome“-Vektoren (BACs) oder davon abgeleitete Vektoren wie z.B. Fosmide verwendet. Die Vektoren basieren auf der Grundstruktur des *E. coli* F-Faktors und sind dafür geeignet extrem große DNA Fragmente zu klonieren. Maximal können in BACs ~300 kb, in Fosmiden ~40 kb kloniert werden. Diese „low-copy“ Vektoren werden pro Zellteilung je einmal stabil an die Tochterzelle weitergegeben. Die Information über die Verteilung der Plasmide während der Zellteilung ist jeweils vektorkodiert. Die Verwendung dieser Vektoren in Kombination mit genotyp-optimierten Wirtsstämmen zur Konstruktion von „large insert libraries“ garantiert die stabile Archivierung der genomischen Fremd-DNA. Für „random shot gun sequencing“-Projekte werden kleinere DNA Fragmente (~3 kb) in „high-copy“ Klonierungsvektoren kloniert. Abbildung 3 zeigt schematisch die Vorgehensweise zur Erstellung und Durchmusterung einer Metagenombank wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde.

Die Identifikation spezifischer Metagenomklone kann unterschiedlich vorgenommen werden. Im Allgemeinen werden in Metagenombanken phylogenetische Markergene (rRNA Gene,

*rpoB*, *recA* etc.) detektiert und analysiert, um ein genomisches Fragment einem Organismus spezifisch zuordnen zu können (Riesenfeld et al. 2004). Ausgehend von diesen Klonen können weitere genomische Fragmente zusammengefügt werden. Alternativ dazu können Metagenombanken mittels des „random shot gut sequencing approach“ oder der Bestimmung terminaler „Insert“-Sequenzen charakterisiert werden.



**Abbildung 3** Methodische Vorgehensweise zur Isolation und Analyse eines Metagenoms in BAC-Genbanken, schematische Darstellung (nach Hentschel et al. 2003).

Eine Unterscheidung der Sequenzen nach GC-Gehalt erlaubt ein Zusammenfügen von Sequenzgerüsten und eine Eingrenzung des phylogenetischen Ursprungs (Venter et al. 2004, Treusch et al. 2004, Tyson et al. 2004). Anhand von Tetranukleotidfrequenzen können genomische Fragmente artspezifisch assembliert werden (Teeling et al. 2004). Durch diese Ansätze ist es möglich aus einzelnen DNA Fragmenten unterschiedlicher Genome jeweils einzelne annähernd komplette Genome zusammenzufügen.

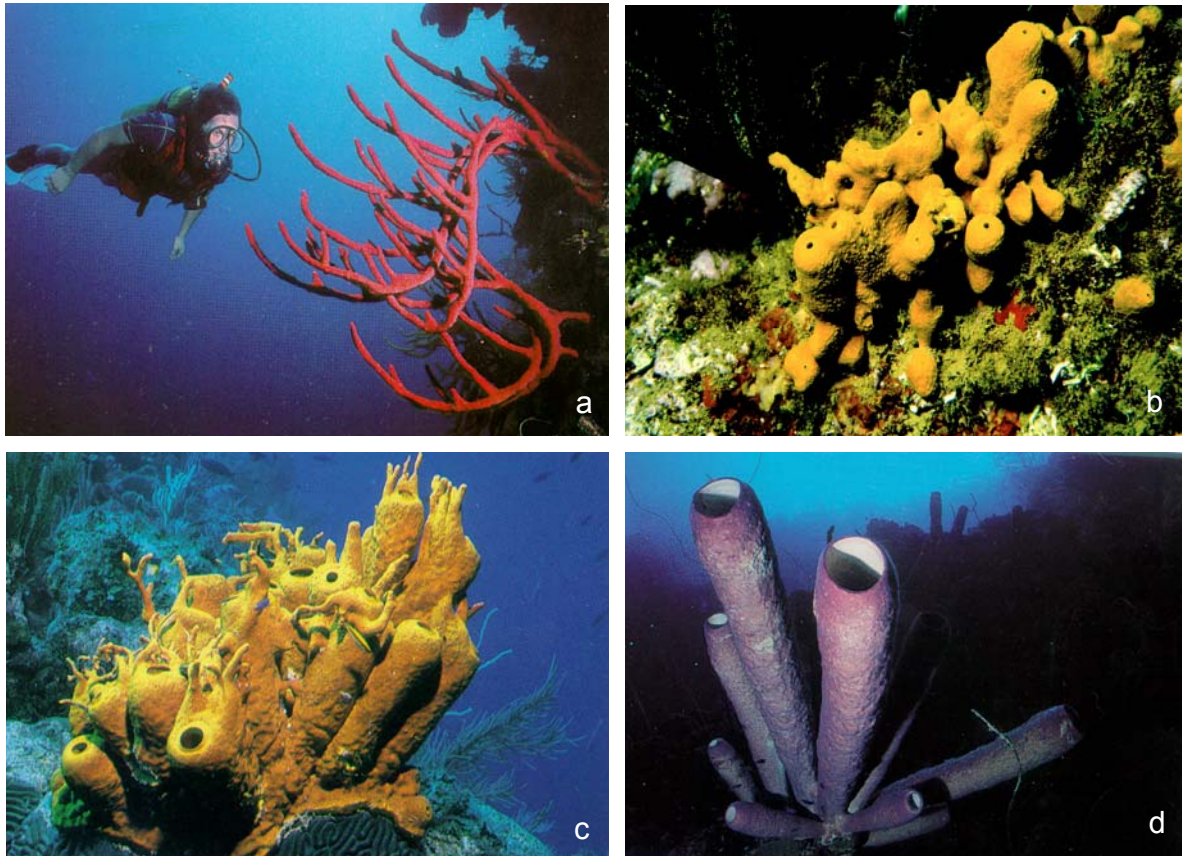
Unabhängig von phylogenetischen Charakterisierungen und dem Assemblieren genomischer Fragmente kann eine Metagenombank mittels PCR direkt nach pharmazeutisch oder biotechnologisch interessanten Genen untersucht werden. Somit können charakteristische Schlüsselenzyme unterschiedlichster Stoffwechselwege und Biosynthesepersonen identifiziert und charakterisiert werden (Piel et al. 2004a, 2004b, Knietsch et al. 2003). Parallel zu diesen Untersuchungen werden Metagenombanken funktionell auf biotechnologisch interessante Genprodukte getestet. Biologische Aktivitäten einzelner Metagenomklone können durch funktionelle Tests auf Selektionsnährböden nachgewiesen werden (Schloss and Handelsman 2003, Courtois et al. 2003, Lorenz et al. 2002, Gillespie et al. 2002, MacNeil et al. 2001, Rondon et al. 2000, Henne et al. 2000, Brady and Clardy 2000).

Entsprechend des biologischen Dogmas „vom Genotyp zum Phänotyp“ liefert die Charakterisierung von Metagenombanken, nach Zusammensetzung genomischer „Contigs“ wie bei einzelnen Genomen, ein detailliertes genomisches Abbild des „funktionellen Repertoires“ einzelner Organismen (Tyson et al. 2004, Hallam et al. 2004). Bisher sind Metagenombanken aus den mikrobiellen Konsortien aus Böden und marinen Sedimenten (Brady et al. 2000, Rondon et al. 2000, Henne et al. 2000, Quaiser et al. 2002, 2003, Knietzsch et al. 2003, Liles et al. 2003, Hallam et al. 2004), aus marinen Bakterioplankton (Beja et al. 2000, Venter et al. 2004), aus Biofilmen (Schmeisser et al. 2003, Tyson et al. 2004), aus Symbionten eines Käfers (Piel et al. 2002) und aus mikrobiellen Konsortien mariner Poriferen (Schleper et al. 1998, Piel et al. 2004a, b) konstruiert worden.

## 2.3 Porifera

Poriferen gehören zu den ältesten Metazoen der Erde. Fossile Funde sind auf ein Alter von ca. 580 Millionen Jahren datiert (Li et al. 1998). Seit dem Präkambrium hat sich die Morphologie und Lebensstrategie der Poriferen nur wenig geändert. Poriferen sind sessile, überwiegend marine Invertebraten, die in tropischen Riffen, aber auch in anderen benthischen Habitaten vorkommen. Man unterscheidet heute ca. 6000 Arten (Hooper et al. 2002).

Marine Poriferen filtrieren das sie umgebene Meerwasser. Während des Filterungsvorganges werden Nahrungspartikel, wie unter anderem Bakterioplankton aufgenommen und phagozytiert. Die Filtrierleistung kann max. bis zu  $1 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1} \text{ kg}^{-1}$  betragen und ist damit sehr effizient. Die Keimzahl des Meerwassers wird während des Filtrationsprozesses um bis zu vier Potenzen reduziert (Reiswig 1974, Pile 1997, Turon et al. 1997, Wehrl 2001).

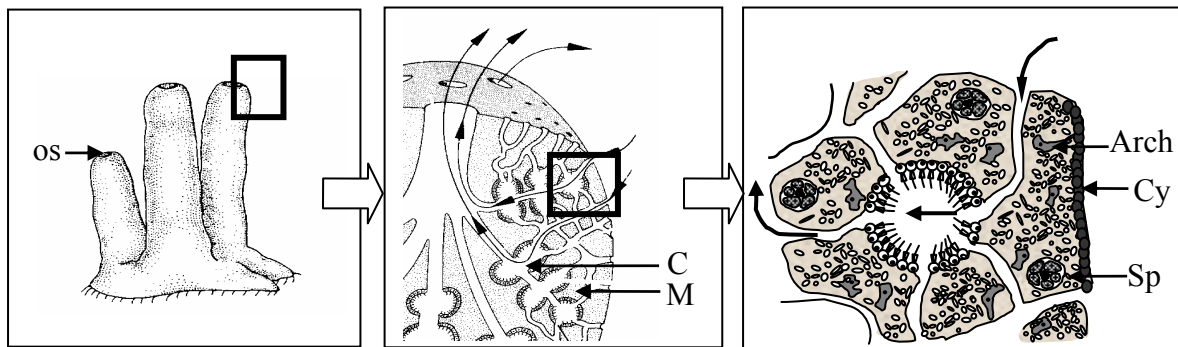


**Abbildung 4** Marine *Aplysina* sp. (Ordnung *Verongida*) a: *A. cauliformis*, b: *A. aerophoba*, c: *A. fistularis*, d: *A. archeri*.

### 2.3.1 Morphologie

Der in dieser Arbeit verwendete marine Modellorganismus *Aplysina aerophoba* (Ordnung *Verongida*) gehört zur Klasse der Demospongiae. Abbildung 4 zeigt neben *A. aerophoba* aus dem Mittelmeer weitere *Aplysina* sp. aus der Karibik.

Morphologisch entspricht *A. aerophoba* dem für diese Klasse typischen Leucon-Organisationstyp. Das den Körperbau dominierende Mesohyl wird von einer Vielzahl verzweigter Kanäle, dem aquiferen System, durchzogen, welches in spezialisierte Kompartimente, die Choanozytenkammern, mündet. Die Choanozyten besitzen polare Cilien, deren Rotation den Wasserstrom im aquiferen System antreibt. Das filtrierte Wasser wird über apikale Osculi wieder ausgestoßen. Außen sind Poriferen von einem Epithel, dem Pinacoderm, umgeben. Abbildung 5 zeigt schematisch die morphologische Organisation und fasst den Körperbau zusammen.



**Abbildung 5** Schematische Darstellung der morphologischen Organisation mariner Demospongiae. os: Osculum, C: Choanozytenkammer, M: Mesohyl, Arch: Archaeozyte, Sp: Speicherzelle, Cy: Cyanobakterien. Die Pfeile illustrieren den Strom des filtrierte Meerwassers (nach Hentschel et al. 2003). Weitere Erklärungen im Text.

Das Mesohyl, die innere Matrix der Poriferen, besteht nicht aus einem echten Gewebe, sondern vielmehr aus einer dynamischen Verteilung verschiedener einzelner Zellen: spezialisierte Choanozyten, omnipotente Archaeozyten, Amoebozyten, Speicherzellen und Sklerozyten. Archaeozyten und Amoebozyten phagozytieren und lysieren Nahrungspartikel, wie u.a. Bakterien und einzellige Algen des marinen Bakterioplanktons, die während des Filtrationsprozesses über die Choanozytenkammern aufgenommen werden. Archaeozyten und Amoebozyten sind amöboide Zellen, welche sich frei im Mesohyl bewegen. Die extrazelluläre Matrix wird bei Poriferen von einem kollagenähnlichen Proteingerüst gebildet. Dieses besteht hauptsächlich aus Spongin, welches von den Sklerozyten produziert und sezerniert wird (Bergquist 1978, Brusca und Brusca 1990).

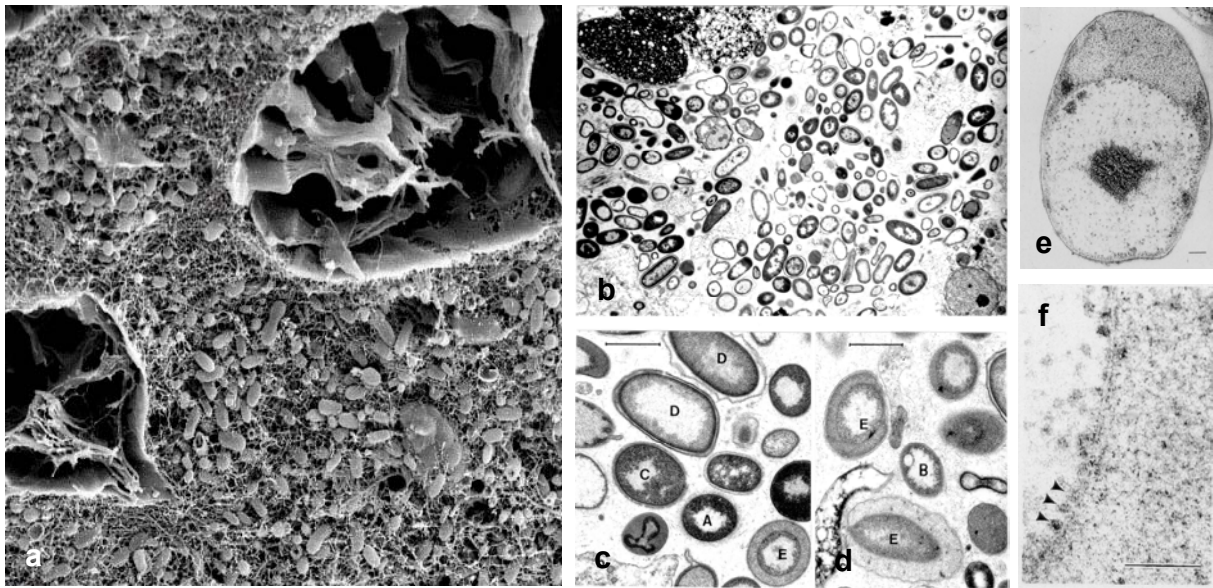
### 2.3.2 Die Mikroflora mariner Demospongiae

Der Hauptteil der Biomasse einiger mariner Demospongiae (z.B. bei *Agelasida* sp., *Dicytoceratida* sp., *Lithistida* sp. und *Verongida* sp.) wird von Mikroorganismen gebildet (40-60%,  $10^8$ - $10^9$  Bakterien  $g^{-1}$ ) (Vacelet 1975, Vacelet und Donadey 1977, Willenz und Hartmann 1989, Friedrich et al. 2001, Webster und Hill 2001). Andere Ordnungen besitzen nur in sehr geringer Dichte assoziierte Mikroorganismen. Zu diesen zählen u.a. *Astrophorida* sp., *Poecilosclerida* sp. und *Haplosclerida* sp. (Vacelet und Donadey 1977, Wilkinson 1978). Beim Vergleich dieser Taxa untereinander fällt auf, dass die Dichte assoziierter Mikroorganismen zunimmt, je komplexer das aquifere System ausgebildet ist (Vacelet und Donadey 1977, Wilkinson 1978).

Generell ist bei Demospongiae mit einer hohen Dichte assoziierter Bakterien das lichtexponierte Pinacoderm mit phototrophen *Cyanobacteria* wie *Aphanocapsa* sp., *Synechocystis* sp. und *Prochloron* sp. assoziiert (Rützler 1985, Wilkinson 1992). Im Mesohyl dominieren heterotrophe und selten autotrophe Bakterien. Diese liegen größtenteils extrazellulär, aber auch intrazellulär und in wenigen Fällen sogar intranukleär vor (Vacelet und Donadey 1977, Wilkinson 1978a, b, c, Friedrich et al. 1999). Die mikrobielle Flora ist permanent mit den entsprechenden Wirten assoziiert wie Langzeitstudien von Taylor et al. (2004) an geographisch und klimatisch unterschiedlichen Standorten an unterschiedlichen Arten zeigen konnten (siehe auch Friedrich et al. 2001, Thoms et al. 2003). Warum diese Mikroflora stabil ist und ob in diesen Systemen mutualistische, kommensale oder neutrale Interaktionen vorliegen, ist bisher noch unklar. Offensichtlich existieren Mechanismen, die es den Mikroorganismen erlauben von ihrem Wirt nicht phagozytiert zu werden, da Poriferen zwischen zu phagozytierenden und assoziierten Mikroorganismen unterscheiden können (Wilkinson et al. 1984).

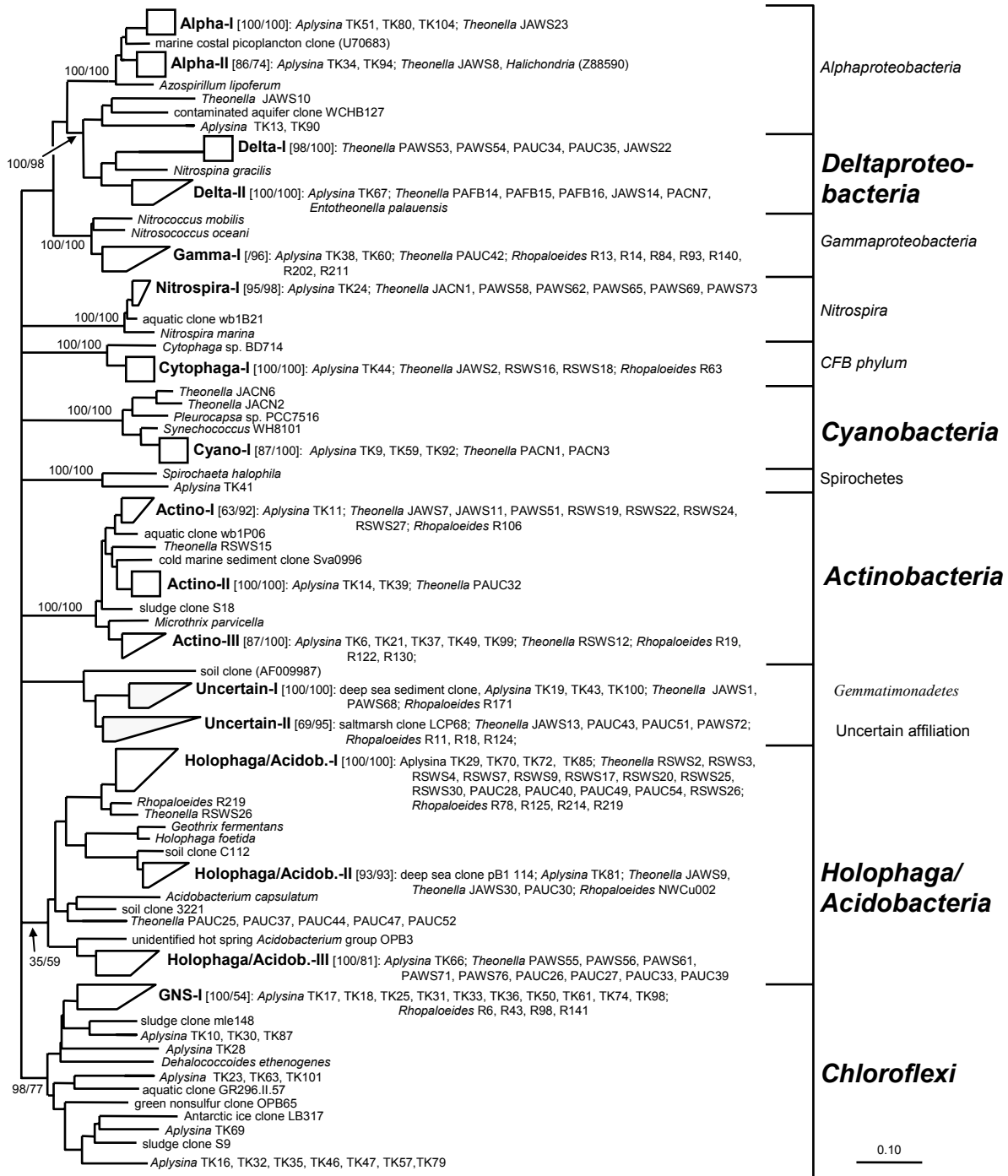
Vacelet (1975) und Wilkinson (1978) beschrieben die assoziierte mikrobielle Flora erstmals in den 1970er Jahren durch mikroskopische Verfahren in Demospongiae des Mittelmeeres. Mittels Transmissionselektronenmikroskopie wurden fünf unterschiedliche bakterielle Morphotypen (A-E nach Vacelet; 1-5 nach Wilkinson) beschrieben, von denen die Typen C, D und E abundant im Mesohyl von *Aplysina* sp. vorliegen. Einer dieser Morphotypen (Typ E nach Vacelet, Typ 4 nach Wilkinson) besitzt eine auffallende morphologische subzelluläre Struktur. Diese besteht aus einem großen membran-umschlossenen Kompartiment, welches DNA enthält. Fuerst et al. (1998, 1999) beschrieben den gleichen abundant auftretenden bakteriellen Morphotyp in Poriferen aus dem „Great Barrier Reef“ vor Australien. Phylogenetisch ist dieser Typ assoziierter Bakterien bisher nicht näher charakterisiert worden. Vergleichbare nukleus-ähnlichen Strukturen sind bisher nur innerhalb des bakteriellen Phylums *Planktomycetes* bekannt. Sie werden als „Pirellusom“ bezeichnet (Lindsay et al. 1997). Ein umfassender Übersichtsartikel über *Planktomycetes* wurde von Fuerst (1995) publiziert. Abbildung 6 zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen der mesohyl-assoziierten Bakterien aus *A. aerophoba*. Neben dem typischen E-Morphotyp ist außerdem *Pirellula marina* (*Planktomycetes*) abgebildet.





**Abbildung 6** Elektronenmikroskopische Aufnahmen mesohylassoziierter Bakterien aus *Aplysina* sp. a: REM, Übersichtsdarstellung, oben rechts: Choanozytenkammer (Foto: H. Merkert, Universität Würzburg); b-f: TEM, b-d: bakterielle Morphotypen A-E (Friedrich et al. 1999, Größenmaßstab 1 µm); e: *Pirellula marina*; f: Vergrößerte Darstellung der Membran des Pirellusoms aus *P. marina* (e, f: Lindsay et al. 1997, Größenmaßstab 0,1 µm).

Wie durch 16S rRNA Sequenzanalysen gezeigt wurde, ist die phylogenetisch komplexe Mikroflora sehr spezifisch für einige Demospongiae und unterscheidet sich deutlich vom marinen Bakterioplankton (Hentschel et al 2002). Die monophyletischen Gruppen der abundanten Abstammungslinien konnten in geografisch weit entfernten und taxonomisch unterschiedlichen Spezies nachgewiesen werden und können folgenden Phyla zugeordnet werden: *Chloroflexi*, *Alpha-*, *Gamma-* und *Deltaproteobacteria*, *Actinobacteria*, *Nitrospira*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria* und *Spirochetes* (Abbildung 7, Webster et al. 2001a, Hentschel et al. 2002, Imhoff and Stöhr 2003, Hill 2004). Darüber hinaus liegen neue bisher nicht klassifizierbare phylogenetische Abstammungslinien vor. Zu diesen zählen u.a. Organismen des neuen Phylums *Gemmatimonadetes*. Entsprechend des „great plate count anomaly“-Phänomens konnte bisher kein Vertreter dieser spezifischen Mikroflora kultiviert werden (Hentschel et al. 2002). Außerdem sind bisher keine Daten über physiologische Charakteristika vorhanden. Aufgrund dieser Bedingungen stellen Metagenomanalysen einen guten Ansatz zur weiteren Beschreibung dieser diversen Mikroorganismen dar.

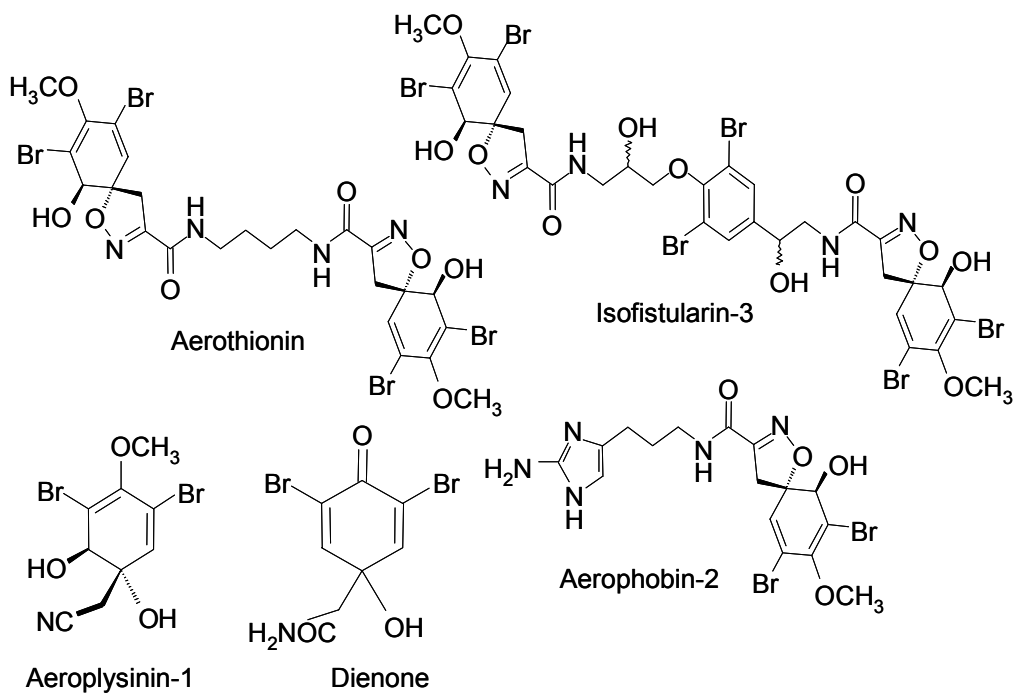


**Abbildung 7** Phylogenetische Analyse des mikrobiellen Konsortiums aus *Aplysina aerophoba*, *Theonella swinhoei* und *Rhopaloeides odorabile* (nach Hentschel et al. 2002). Abundante Abstammungslinien sind am rechten Abbildungsrand hervorgehoben.

### 2.3.3 Biotechnologisches Potenzial

Poriferen sind eine der reichhaltigsten Quellen von Sekundärmetaboliten (Salomon et al. 2004). Diese dienen in erster Linie der chemischen Abwehr von Fraßfeinden und verhindern das Überwachsen der Oberflächen durch Epiphyten, ein Prozess, der auch als „Biofouling“ bezeichnet wird (Proksch 2003). Überwiegend handelt es sich bei diesen Substanzen um Alkaloide, Terpene, Makrolide, Polyketide oder Peptide (Blunt et al. 2004, Proksch 2003). Die chemische Diversität dieser Substanzen ist aufgrund der vielfältigen Modifikationen des chemischen Grundgerüsts sehr hoch.

Auch *A. aerophoba* besitzt bioaktive Sekundärmetabolite wie z.B. die bromierten Alkaloide Isofistularin-3, Aerothionin, Aerophobin-2, Aeroplysinin-1 und Dienon (Abbildung 8, Sharma und Burkholder 1967, Tymiak und Rinehart 1981, Kreuter et al. 1990, Teeyapant et al. 1993, Carney und Rinehart 1995, Weiss et al. 1996, Ebel et al. 1997). Die Alkaloide kommen intrazellulär in spezialisierten Speicherzellen vor und befinden sich in geringerer Konzentration frei in der extrazellulären Matrix (Thompson et al. 1983, Turon et al. 2000). Sie scheinen kontinuierlich produziert zu werden und bilden 12% der Trockenmasse von *A. aerophoba* (Teeyapant et al. 1993).



**Abbildung 8** Charakteristische bromierte Alkaloide aus *Verongida* sp.

Noch ist es unklar, ob marine Poriferen die entsprechenden Sekundärmetabolite selbst synthetisieren oder ob die Synthese durch assoziierte Mikroorganismen erfolgt. In der Literatur gibt es für beide Szenarien Beispiele (Faulkner et al. 1993, Unson et al. 1994, Jensen und Fenical 1996, Haygood et al. 1999, Schmidt et al. 2000, Proksch et al. 2002, Salomon et al. 2004, Hildebrand et al. 2004, Piel et al. 2004b). Die zitierten Übersichtsartikel von Salomon et al. (2004) und Blunt et al. (2004) beschreiben detailliert welche Substanzen u.a. in marinen Poriferen gefunden wurden. Piel (2004c) fasst zusammen, welche der entsprechenden Synthesen mikrobiellen Ursprungs sind. Bei Polyketiden sind oftmals eindeutige Strukturübereinstimmungen der „poriferen“ Sekundärmetabolite mit mikrobiellen Sekundärmetaboliten aus *Actinobacteria*, *Myxobacteria* oder *Cyanobacteria* auffällig, weshalb vermutet wird, dass die Synthese von Bakterien geleistet wird (Faulkner et al. 1993, Schmidt et al. 2000, Piel 2002, Piel et al. 2004b, Salomon et al. 2004). Bakterien dieser Phyla, besonders der *Cyanobacteria* und *Actinobacteria*, sind Bestandteil der charakteristischen, bisher nicht kultivierbaren mikrobiellen Flora vieler mariner Poriferen (Hentschel et al. 2002, Webster et al. 2001). In den meisten Fällen sind die entsprechenden Biosynthesegene, welche für die Sekundärmetabolitsynthesen benötigt werden, nicht bekannt. Durch den Einsatz der Metagenomik kann erstmals ein kultivierungsunabhängiger direkter Zugang zu diesen biotechnologisch interessanten bakteriellen Biosynthesegenen ermöglicht werden. Piel et al. (2004b) zeigen den erfolgreiche Nachweis der Onnamid Biosynthesegene innerhalb einer Metagenombank von assoziierten Bakterien des marinen Poriferen *Theonella swinhoei* (*Lithistida*), welcher eine hohe Diversität unterschiedlicher Polyketide zeigt. Die Struktur des entsprechenden kodierenden Bereiches der identifizierten Onnamid Biosynthesegene deutet auf einen prokaryontischen Ursprung hin. Außerdem wurde in jener Metagenombank ein wahrscheinlich demospongiae-spezifisches PKS Cluster nachgewiesen, welches nicht klassischen cis- und trans-AT PKS Systemen zugeordnet werden konnte (Piel et al. 2004a). Die Verbreitung dieser neuen PKS Systeme in marinen Habitaten und insbesondere in Demospongiae ist noch nicht beschrieben worden. Die Struktur und Funktion der kodierten Polyketide ist ebenfalls noch unbekannt.

## 2.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Promotionsarbeit war die Bestimmung der phylogenetischen Identität des abundant mit einigen marinen Schwämmen assoziierten bakteriellen E-Morphotypes (Vacelet 1975, Fuerst et al 1998, 1999, Friedrich et al. 1999) mittels 16S rRNA basierter Techniken. Darüber hinaus sollte die Verbreitung und Spezifität der entsprechenden Mikroorganismen in unterschiedlichen marinen Porifera Ordnungen und im marinen Sediment und Bakterioplankton untersucht werden.

Da es bisher nicht möglich war Vertreter des mikrobiellen Konsortiums mariner Poriferen zu kultivieren, sollte eine Metagenombank ausgehend von der Mikroflora des Modellorganismus *A. aerophoba* in *E. coli* erstellt werden, um erste Einblicke in genomische Charakteristika der phylogenetisch diversen Prokaryonten zu ermöglichen. Dazu sollte die Trennung mikrobieller Biomasse vom Mesohyl aus *A. aerophoba* etabliert und die Methodik der *ex situ* Isolation hoch molekularer DNA auf dieses Modellsystem übertragen werden. Damit die phylogenetische Diversität, die in der resultierenden Metagenombank archiviert wurde, beschrieben werden konnte, sollte ein Verfahren zum Nachweis klonierter 16S rRNA Gene erarbeitet werden, das eine Unterscheidung und Trennung von 16S rRNA Genen aus *E. coli* ermöglicht. Poribakterielle 16S rRNA kodierende Metagenomklone sollten identifiziert und die Sequenz des klonierten 16S rRNA Locus annotiert werden, um erste Eigenschaften der poribakteriellen Genomstruktur charakterisieren zu können. Da Metagenombanken darüber hinaus die Beschreibung neuer Enzyme oder Biosyntheseoperons ermöglichen, sollten bakterielle Typ I Polyketidsynthasen (PKS) nachgewiesen und *in silico* beschrieben werden.



### 3. Methoden

Alle während dieser Arbeit eingesetzten Geräte und Materialien, chemische Substanzen, Enzyme und „Kits“, Oligonukleotide, Klonierungs- und Expressionsvektoren, Mikroorganismen und Rezepturen für eingesetzte Lösungen, Puffer und Medien sind im Anhang (Kapitel 7) tabellarisch verzeichnet. Standardmethoden sind Maniatis et al. (1989) und Sambrook et al. (2001) entnommen.

#### 3.1 Probennahme

Der marine Schwamm *Aplysina aerophoba* wurde bei Tauchgängen im Mittelmeer vor der Küste von Banyuls sur Mer, Frankreich, aus einer Wassertiefe von 5 bis 15 m im April 2000 bzw. 2001 gesammelt, während *Aplysina fistularis*, *Aplysina insularis*, *Aplysina archeri*, *Aplysina lacunosa*, *Aplysina archeri*, *Verongula gigantea* und *Smenospongia aurea*, sowie *Aplysina cauliformis*, *Pseudoceratina crassa*, *Xestospongia muta*, *Chondrilla nucula*, *Agelas wiedenmayeri* und *Agelas cerebrum*, *Ptilocaulis* sp. und *Ectyoplasia ferox* vor der Insel Little San Salvador, Bahamas, aus einer Wassertiefe von 5 bis 15 m im Juli 2000 gesammelt wurden. *Aplysina fistularis* wurde außerdem vor San Diego, Kalifornien, USA, *Aplysina cavernicola* vor Elba, Italien, *Theonella swinhoei* vor den Caroline Islands, Palau, *Agelas wiedenmayeri* vor den Florida Keys, USA, gesammelt. Die Proben einzelner Arten wurden in Plastiktüten zur Oberfläche gebracht und sofort konserviert. Gewebestücke von ca. 1 cm<sup>3</sup> wurden dazu separat in 2,5 ml Cryogefäßen bei -80°C gelagert. Diese Proben wurden anschließend für die Isolation von DNA mittels des „Fast DNA Spin Kit for soil“ (Q-Biogene) verwendet.

## 3.2 Gewinnung mikrobieller Biomasse aus *Aplysina aerophoba*

Gewebe von *A. aerophoba* wurde direkt nach der Probennahme mechanisch homogenisiert. Dazu wurden Gewebestücke (max. 15 g) mit einem Skalpell in kleine Blöcke von ca. 5 mm<sup>3</sup> geschnitten und in 50 ml Falcon Röhren in 30 ml eiskaltem Calcium/Magnesium-freiem künstlichem Meerwasser (CMFASW) aufgenommen. Die Abwesenheit von Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> Ionen bewirkt eine Dissoziation eukaryontischer Zellen des Mesohyls. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Gewebestücke in einem Mörser mit einem Pistil homogenisiert, die resultierende Zellsuspension wiederum in Falconröhren dekantiert und 5 min stark geschüttelt (Vortex). Die Suspension wurde durch Faltenfilter filtriert, um grobe Gewebebestandteile zu entfernen und anschließend über differentielle Zentrifugation fraktioniert. Die erste Zentrifugation erfolgte bei 4°C, 100 x g, 15 min. Das Pellet hatte eine gelbe Farbe und beinhaltete die eukaryontische Zellenfraktion. Der Überstand wurde erneut dekantiert und bei 4°C, 12000 x g, 30 min zentrifugiert. Das resultierende braune Pellet beinhaltete die prokaryontische Zellfraktion. Abschließend wurden die prokaryontischen Zellen in eiskaltem CMFASW resuspendiert und dreimal gewaschen. Am Ende der Präparation blieb der Überstand klar. Unter Verwendung einer Thoma-Kammer wurde die Zellkonzentration bestimmt. Das bakterielle Zellpellet wurde in 15% Glycerin/CMFASW aufgenommen und bei -80°C in 2,5 ml Cryogefäßen gelagert und direkt für die Präparation hoch molekularer DNA eingesetzt oder für Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) fixiert.

## 3.3 Mikroskopie

### 3.3.1 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Aus *A. aerophoba* fraktionierte prokaryontische Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd/PBS resuspendiert und über Nacht bei 4°C fixiert. Anschließend wurde das fixierte Material in 50% Ethanol/PBS aufgenommen und bei -20°C gelagert. Aliquots wurden auf Objektträgern bei 40°C hitzefixiert und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 70% und 96%) für je 3 min dehydriert und anschließend luftgetrocknet. FISH wurde in einer isotonischen „feuchten Kammer“ bei 46°C in Hybridisierungspuffer und variablen Konzentrationen von Formamid (0-35%) für 4 h durchgeführt. Die Sonden (Tabelle 13) wurden in einer Konzentration von 2 ng µl<sup>-1</sup> eingesetzt. Nach der Hybridisierung wurde der Hybridisierungspuffer vorsichtig abgegossen. Die Objektträger wurden dann in Waschpuffer



bei 48°C, 20 min inkubiert. Der Waschpuffer wurde abgegossen und die Objektträger mit eiskaltem  $d_2H_2O$  gespült und luftgetrocknet. DNA wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) gefärbt. Abschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern in Citifluor eingebettet. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

### 3.3.2 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Gewebestücke von *A. aerophoba* wurden in 2,5% Glutaraldehyd/PBS 12 h fixiert, drei mal für 20 min in PBS gewaschen und abschließend für 12 h in 2% Osmium Tetroxid/PBS inkubiert. Die Gewebestücke wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert (30%, 50%, 70%, 90% und 100%), dreimal für 20 min in Propylenoxid inkubiert und abschließend in Epon 812 für vier Tage bei 60°C eingebettet. Die polymerisierten Blöcke wurden an einem Ultramikrotom semi-, bzw. ultradünn geschnitten. Zur Kontrastierung wurden die Schnitte für 10 min in 0,5% Uranylacetat/Methanol und in Reynold's Bleicitrat für 5 min gefärbt. Die Auswertung erfolgte am Elektronenmikroskop.

## 3.4 Nukleinsäureanalytische Methoden

### 3.4.1 DNA Isolation

#### *Isolation genomischer DNA aus E. coli*

2 ml Übernachtskultur wurden 2 min bei  $13000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml TNE gewaschen. Lysiert wurden die Zellen nach Resuspensierung in 270  $\mu\text{l}$  TNEX, 30  $\mu\text{l}$  Lysozymlösung ( $5 \text{ mg ml}^{-1}$ ) bei 37°C für 30 min. Anschließend wurden 15  $\mu\text{l}$  Proteinase K Lösung ( $20 \text{ mg ml}^{-1}$ ) zugesetzt und ca. 1 h bei 65°C inkubiert bis die Lösung klar wurde. Genomische DNA wurden nach Zugabe von 15  $\mu\text{l}$  5 M NaCl Lösung mit 500  $\mu\text{l}$  100% Ethanol gefällt und 10 min bei  $13000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert. Das DNA Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 100  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen und bei -20°C gelagert.

#### *Isolation genomischer DNA aus Gewebe mariner Demospongiae*

Die Isolation genomischer DNA aus Gewebestücken mariner Demospongiae wurde mittels des „Fast DNA Spin Kit for soil“ (Q-Biogene) gemäß den Angaben des Herstellers vorgenommen. Die Gewebestücke wurden mit flüssigem Stickstoff gekühlt und mechanisch

in einem Mörser pulverisiert. Die Zellyse erfolgte durch „bead beating“, DNA wurde durch Bindung an eine Silikatmatrix isoliert, mit 70% Ethanol gewaschen und mit  $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Die eluierte DNA wurde bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

#### *Extraktion genomischer DNA aus mikrobieller Biomasse aus A. aerophoba*

Fraktionierte bakterielle Zellen wurden in 400  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen. Zur Zellyse wurden 50  $\mu\text{l}$  Lysozymlösung (5  $\text{mg ml}^{-1}$ ) hinzugegeben und der Ansatz bei  $37^\circ\text{C}$  für 30 min inkubiert. Anschließend wurden 30  $\mu\text{l}$  Proteinase K Lösung (20  $\text{mg ml}^{-1}$ ) zugesetzt und ca. 1 h bei  $65^\circ\text{C}$  inkubiert bzw. bis die Lösung klar wurde. Nach der Zellyse wurde der Ansatz mit 400  $\mu\text{l}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) versetzt und 10 min bei Raumtemperatur extrahiert. Danach wurde der Ansatz 10 min,  $13000 \text{ U min}^{-1}$  zentrifugiert. Phenolrückstände der oberen wässrigen Phase wurden mittels Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion (24:1, v/v) entfernt. DNA wurde durch Zugabe von 0,6% (v/v) Isopropanol präzipitiert und mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA Pellet wurde luftgetrocknet und in 50  $\mu\text{l}$   $\text{d}_2\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Verdünnungen (1:100) dieser Preparation wurden für weitere Arbeiten verwendet.

#### *Isolation genomischer DNA aus Bakterioplankton*

Drei Liter Meerwasser aus 10 m Tiefe in unmittelbarer Nähe einer *A. aerophoba* Kolonie und aus dem offenen Meer (ca. 3 m Tiefe) wurde mittels „bottle top“ Filtern sterilfiltriert. Die Filter wurden in kleine Stücke geschnitten und in 300  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen. Die Zellyse wurde wiederum mittels Lysozym und Proteinase K vorgenommen. Genomische DNA wurde mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert.

#### *Isolation hoch molekularer DNA aus mikrobieller Biomasse aus A. aerophoba*

Gewebeassoziierte Bakterien aus *A. aerophoba* wurden zur Isolation von hoch molekularer DNA in Agarose eingeschlossen. Dazu wurde der Zelltitel auf eine Konzentration von  $2 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $0,5 \times 10^9$  und  $0,2 \times 10^9$  Zellen  $\text{ml}^{-1}$  in TE eingestellt. Die Zellsuspension wurde im Wasserbad auf  $50^\circ\text{C}$  vorgewärmt und mit einer ebenfalls  $50^\circ\text{C}$  warmen 1% „low melt“ Agaroselösung im Verhältnis 1:1 vermischt. Von dieser Suspension wurden je 1 ml in 1 ml Einwegspritzen aufgezogen. Die Spritzen wurden mit Parafilm verschlossen und auf Eis gelegt bis die Agarose geliert war. Zur Lyse der eingebetteten Bakterien wurden die „Agaroseplugs“ in 50 ml Lysozympuffer transferiert und langsam rotierend bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation in Proteinase K Puffer für zweimal 24 h bei

50°C. Proteinase K wurde durch Inkubation in TE, 1 mM PMSF bei Raumtemperatur für dreimal 1 h inaktiviert. PMSF wurde anschließend durch Equilibrierung in TE für dreimal 1 h entfernt. Die Agaroseplugs wurden in TE bei 4°C gelagert (Quaiser et al. 2002). Hoch molekulare DNA wurde durch präparative Puls Feld Gelelektrophorese isoliert (3.4.3).

#### *Isolation von DNA Fragmenten aus Agarose-Minigelen*

Nach der Elektrophorese von Restriktionsansätzen oder PCR (3.4.5) wurden DNA Fragmente aus Agarosegelen mittels des „QIAquick gel extraction kit“ (Qiagen) gemäß Herstellerangabe eluiert.

### **3.4.2 RNA Isolation**

Das komplette Gencluster der drei kodierenden Untereinheiten (oxrMSL) der poribakteriellen Oxidoreduktase wurde über die Restriktionsschnittstellen *XmaI* und *HindIII* „in frame“ in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) kloniert und in *E. coli* M15 Zellen transformiert. RNA wurde aus *E. coli* M15 Zellen mittels des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit (Qiagen) entsprechend Herstellerangaben isoliert. Dazu wurden die Zellen bei 37°C in 50 ml LB unter Zusatz von 100 µg ml<sup>-1</sup> Ampicillin in einem Schüttler bei 180 U min<sup>-1</sup> bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,6 angezogen. Anschließend wurde die Transkription mit 0,1 mM IPTG für 1 h induziert. Aus jeweils 2 ml dieser Kulturen wurde RNA isoliert.

### **3.4.3 Elektrophoretische Methoden für die Nukleinsäureanalyse**

#### *Agarose-Minigele*

Für Routineanalysen wurde DNA in Abhängigkeit der Größe der zu untersuchenden Fragmente in 0,7-4% Agarosegelen in 1 x TAE bei 6 V cm<sup>-1</sup> elektrophoretisch aufgetrennt. Agarosegele wurden mit Ethidiumbromid (10 mg ml<sup>-1</sup>) gefärbt, mit d<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O gewaschen und unter einem UV-Transilluminator fotografiert. Isolierte RNA wurde gemäß Standardprotokollen in 1,5% Agarosegelen unter Zusatz von MOPS und Formaldehyd elektrophoretisch aufgetrennt.

### *Präoperative Puls Feld Gelelektrophorese (PFGE)*

Die Agaroseplugs wurden zur Auftrennung hoch molekularer DNA in Pulsfeldagarosegele eingegossen. Zur Aufreinigung der DNA im Gel wurden 2-Phasengele verwendet, welche in zwei Schritten gegossen wurden (Quaiser et al. 2002). Die obere erste Phase bestand aus 1% PFGE-Agarose und 2% PVP (ca. 1/5 des Gels), die untere zweite Phase (4/5 des Gels) bestand nur aus 1% PFGE Agarose. Für die erste Größenselektion wurde die DNA bei 4,5 V cm<sup>-1</sup>, 1-4 s Puls, 36 h, 10°C in 0,5 x TAE auf ca. 100 kb komprimiert. Durch Migration der DNA durch die obere PVP-Phase konnten Hemmstoffe ohne Auftreten von Scherkräften entfernt werden. Die Kompressionszone wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA sofort 2 h, 6 V cm<sup>-1</sup> bei Raumtemperatur in Dialyseschläuchen in 2 ml TE elektroeluiert. Am Ende der Elektroelution wurde ein kurzer Umkehrpuls (1 min, 6 V cm<sup>-1</sup>) angelegt, um elektroeluierte DNA vom Dialyseschlauch zu lösen. Die elektroeluierte DNA wurde sofort mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend an 3' und 5' Enden mittels T4 DNA Polymerase und T4 Polynukleotid Kinase „blunt“ geglättet und phosphoryliert. Dazu wurde das „EpiFos<sup>TM</sup> Fosmid Library Production Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers (Epicentre) verwendet.

Eine zweite Größenselektion in einem Puls Feld Agarosegel ohne PVP bei 6 V cm<sup>-1</sup>, 0,1-1 s Puls, 9 h, 10°C wurde zur Kompression bei ca. 50 kb benutzt (Abbildung 15). DNA der Kompressionszone wurde wiederum aus dem Gel ausgeschnitten und elektroeluiert. Abschließend wurde die DNA mittels Vivaspin-Zentrifugenröhrchen (Vivascience) konzentriert und für die Erstellung der Metagenombank APAE02 verwendet.

### *Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE)*

Für DGGE wurden 16S rDNA Fragmente mittels 16S rDNA spezifischen „GC-clamp“ Primern amplifiziert. Nach der PCR wurden die Produkte über 10% Polyacrylamidgele 6 h bei 150 V, 60°C voneinander getrennt. Jedes Gel wurde mit einem denaturierenden Harnstoff Gradienten von 0-100% gegossen (DCode<sup>TM</sup> System, BioRad). DGGE Gele wurden in Ethidiumbromid gefärbt und unter einem UV-Transilluminator fotografiert. 16S rDNA Fragmente wurden mit einem sterilen Skalpel aus dem Gel ausgeschnitten, in 20 µl ddH<sub>2</sub>O gelegt und 12-16 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden diese Fragmente einzeln via PCR reamplifiziert und direkt sequenziert.

### 3.4.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösung

Konzentrationen von DNA oder RNA wurden spektrophotometrisch bei 260 nm in Quarzküvetten mit einer Breite von 1 cm gemessen. Eine Absorption  $A_{260}=1$  entspricht  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  doppelsträngiger DNA,  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  RNA bzw.  $33 \mu\text{g ml}^{-1}$  einzelsträngiger Oligonukleotide. Die Reinheit der DNA wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm bestimmt. DNA ist von hoher Reinheit bei einem Absorptionsquotienten  $A_{260}/A_{280}$  von 1,8 ( $c = (\text{OD}_{260} \times A \times B) / 1000$ , mit c: Nukleinsäurekonzentration, A: 50 für dsDNA, 40 für RNA, 33 für einzelsträngige Oligonukleotide, B: Verdünnungsfaktor). Darüber hinaus konnten DNA Konzentrationen nach Gelelektrophoresen unter Verwendung von Massenstandards bestimmt werden.

### 3.4.5 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Synthese von DNA Fragmenten, u.a. für die Erstellung von 16S rDNA Genbanken und zur sequenzspezifischen Identifikation individueller Metagenomklone, gemäß Standardprotokollen unter Verwendung von *Taq* DNA Polymerase (Qiagen), verwendet. Für die Amplifikation von 16S rRNA Genen diente jeweils genomische DNA von *E. coli* und *Pirellula marina* (*Planctomyces*) als Kontrolle. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils  $50 \mu\text{l}$  ( $5 \mu\text{l}$  10 x *Taq* DNA Polymerase Puffer;  $1 \mu\text{l}$  100 mM dNTPs, je  $1 \mu\text{l}$  jedes Primers ( $25 \mu\text{M}$ ),  $1 \mu\text{l}$   $100 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$  DNA-Matrize oder direkt aus einer Kolonie gepickte Bakterienzellen, 1 U *Taq* DNA Polymerase,  $40 \mu\text{l}$   $\text{ddH}_2\text{O}$ ). Oligonukleotidprimer, die jeweiligen „Annealing“-Temperaturen und die entsprechende Größe der PCR Produkte sind in Tabelle 11 aufgelistet (Anhang, Kapitel 7). PCR Zyklen wurden bezüglich der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Größe des erwarteten PCR Produktes eingestellt (Startdenaturierung: 2-5 min,  $96^\circ\text{C}$ , 1. Denaturierung: 30 s,  $96^\circ\text{C}$ , 2. Primer Hybridisierung: 30 s,  $53\text{-}68^\circ\text{C}$ , 3. Elongation: 30 s bis 4 min,  $72^\circ\text{C}$ , Endelongation: 2 min,  $72^\circ\text{C}$ , 30 Zyklen). Die optimale Hybridisierungstemperatur ( $T_M$ ) kann für jeden Primer nach  $T_M = 4(G+C) + 2(A+T)$  bestimmt werden.

Zum Nachweis spezifischer Gene in Metagenomklonen wurden Genbank-„Pools“ (3.4.14) und anschließend die Kolonien einzelner Klone eines „Pools“ via PCR überprüft. Für Kolonie-PCRs wurden Zellen der Kolonien direkt mit einer Pipettenspitze in dem Reaktionsansatz resuspendiert. Die Startdenaturierung betrug bei einer Kolonie-PCR 5 min. Für die Expression der poribakteriellen Oxidoreduktase (3.5) wurden die kodierenden ORFs mittels *Pfx* DNA Polymerase amplifiziert.

Um die Sensitivität zum Nachweis planktomyceten-ähnlicher 16S rRNA Gene zu erhöhen, wurden neben konventionellen PCRs so genannte „nested“ PCRs durchgeführt. Dazu wurden 16S rRNA Gene in einer ersten PCR mittels „universeller“ Primer (27f und 1492r) amplifiziert. Das Amplikon diente in einer zweiten PCR als Matrize für die spezifische Amplifikation von planktomyceten-ähnlichen 16S rRNA Genen mittels der Primer pla46f und pla886r/1389r.

PCR Produkte wurden mittels des „PCR purification kit“ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers für weitere Anwendungen wie RFLP Analysen, direkte Sequenzierungen oder Klonierungen gereinigt.

### **3.4.6 cDNA Synthese und RT-PCR**

Zum Nachweis des vollständigen Transkriptes der poribakteriellen Oxidoreduktase wurde isolierte RNA mittels des Omniscript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase Kits (Qiagen) in cDNA gemäß Herstellerangaben umgeschrieben. Unter Verwendung spezifischer Primer für jede der drei kodierenden Untereinheiten des Enzyms (s. Tabelle 11, Anhang, Kapitel 7) wurde der Reaktionsansatz 60 min bei 37°C inkubiert. Transkripte wurden ausgehend von synthetisierter cDNA durch PCR nachgewiesen (s. 3.4.5).

### **3.4.7 Enzymatische Hydrolyse von DNA**

Für analytische enzymatische Hydrolysen wurde maximal 0,5 µg DNA in  $d_4H_2O$  aufgenommen, mit 2 µl 10x Reaktionspuffer und 10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl versetzt und entsprechend der optimalen Reaktionstemperatur des eingesetzten Restriktionsenzymes inkubiert. Präparative Ansätze wurden in entsprechend größeren Volumina durchgeführt. Eine vollständige Hydrolyse wurde in Agarosegelen nachgewiesen. Falls notwendig wurde die Reaktion durch Hitzeinaktivierung für 20 min bei 65°C gestoppt, durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol Extraktion oder mittels des „Purification kit“ gemäß Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt.

### 3.4.8 Enzymatische Hydrolyse von hoch molekularer DNA in Agarose

Um ein mechanisches Scheren hoch molekularer DNA zu vermeiden, wurde diese in „Agaroseplugs“ hydrolysiert. Dazu wurden ca. 20 mg eines „Agaroseplugs“ im Reaktionspuffer des entsprechenden Restriktionsenzym für 30 min auf Eis equilibriert und nach Zugabe des Enzyms entsprechend den optimalen Inkubationsparametern inkubiert. Hydrolyse der DNA wurde in PFGE Gelen nachgewiesen.

### 3.4.9 Dephosphorylierung von DNA 5' Enden

Zur Entfernung von 5' Phosphatgruppen an DNA Molekülen durch alkalische Phosphatase (CIP) wurden 0,5-5 µg DNA, 5 µl 10 x CIP Puffer und 1 U Enzym pro nmol 5' Enden in 50 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  aufgenommen. Nach Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die gleiche Menge Enzym erneut hinzugegeben und nochmals 30 min bei 37°C inkubiert, um eine vollständige Dephosphorylierung zu erhalten. Alkalische Phosphatase wurde 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und die DNA mittels Phenolextraktion oder des „Purification kit“ gemäß Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt.

### 3.4.10 Klonierungen

#### *Klonierung von PCR Produkten*

Die Klonierung von *Taq* DNA Polymerase generierten PCR Produkten wurde mittels des pGEM-T<sup>®</sup> Easy Vektor Systems (Promega) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. *Pfx* DNA Polymerase generierte PCR Produkte wurden mittels *Taq* DNA Polymerase nachträglich modifiziert, sodass eine T/A Klonierung vorgenommen werden konnte. Die *Taq* DNA Polymerase hängt an 3' DNA Enden ein Adenin an, sodass eine Klonierung in „T-overhang“-Vektoren ermöglicht wird (Knoche und Kephart 1999).

#### *Klonierung von DNA Restriktionsfragmenten*

DNA Restriktionsfragmente (< 10 kb) wurden in die Vektoren pGEM-T<sup>®</sup> Easy (Promega) und pBluescript KS II (+/-) (MBI Fermentas) ligiert, die ebenfalls mit dem entsprechenden Restriktionsenzym(en) geschnitten und an den 5' Enden dephosphoryliert worden sind („sticky end ligations“). Für die Ligation wurde 1 µl T4 Ligase (50 U) in einem Reaktionsvolumen von 20 µl verwendet (2 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl 100 mM ATP, max. 1 µg gesamt-DNA (50 ng Vektor),  $\text{ddH}_2\text{O}$  ad 20 µl). Das Insert/Vektor Verhältnis wurde auf 3:1

eingestellt. Ligationsansätze wurden bei 16°C für 12-16 h inkubiert. Danach wurde der Ligationsansatz in elektrokompetente *E. coli* Zellen elektroporiert und bei -20°C gelagert.

#### *Klonierung hoch molekularer DNA*

Für die Ligation modifizierter hoch molekularer DNA Fragmente in Fosmidvektoren (pEpiFos5, Epicentre) wurden 300 ng „Insert-DNA“ und 500 ng Fosmid in einem molaren Vektor/Insert Verhältnis von 11:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte 13 h bei 13°C mittels Fast-Link DNA Ligase (Epicentre). Die Ligase wurde anschließend bei 70°C für 10 min hitzeinaktiviert und die Ligation bei -80°C gelagert.

### **3.4.11 Transfer von Plasmiden in *E. coli***

#### *Herstellung elektrokompetenter E. coli und Elektroporation*

Ein Liter LB Medium wurde mit 5 ml einer Übernachtskultur des entsprechenden *E. coli* Stammes inokuliert und bei 37°C bis zu einer  $OD_{600} = 0,6$  geschüttelt. Anschließend wurde die Bakterienkultur auf Zentrifugenbecher aufgeteilt, tariert und für 30 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden 15 min, 6000 x g bei 4°C abzentrifugiert und in insgesamt 1 l eiskaltem  $d_4H_2O$  resuspendiert. Nach der zweiten Zentrifugation wurde das Pellet in insgesamt 0,5 l eiskaltem  $dH_2O$  resuspendiert und erneut gewaschen. Das Zellpellet wurde abschließend in insgesamt 0,5 l eiskalten 10% Glycerin gewaschen und nach der letzten Zentrifugation erneut in eiskalten 10% Glycerin aufgenommen. Das Volumenverhältnis Zellpellet/10% Glycerin betrug 1:1. Von dieser Suspension wurden 80 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

Für die Elektroporation von Plasmiden wurde pro Ligationsansatz ein Aliquot elektrokompetenter *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-2 µl des Ligationsansatzes versetzt. Dieser Ansatz wurde in eiskalte Elektroporationsküvetten mit 1 mm Elektrodenabstand pipettiert und weitere 10 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen wurden mit 2,5 kV elektroporiert und sofort in 1 ml SOC Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein neues 2 ml Gefäß transferiert und bei 37°C für 1 h inkubiert, bevor die Zellen auf Selektionsagar ausplattiert wurden.



### *Transduktion des hoch molekularen DNA Ligationsansatzes in E.coli Epi100<sup>TM</sup>*

Gemäß den Angaben des Herstellers erfolgte eine *in vitro* Verpackung des Ligationsansatzes in MaxPlax<sup>TM</sup> Lambda Phagen für 90 min bei 30°C mit anschließender Infektion von *E. coli* Epi100<sup>TM</sup> Zellen. Dazu wurde *E. coli* Epi100<sup>TM</sup> vor der Infektion in 10 mM MgSO<sub>4</sub> und 0,2% Maltose LB Medium bis zu einer OD<sub>600</sub> von 1,8 bei 37°C geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur mit MaxPlax<sup>TM</sup> Lambda Phagen infiziert. Transduzierte *E. coli* Epi100<sup>TM</sup> Zellen wurden auf LB Medium + 12,5 µg ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol ausplattiert und 12-16 h bei 37°C inkubiert. Die so erstellte Metagenombank erhielt die Bezeichnung APAE02 (AP: *Aplysina*, AE: *aerophoba*). Die Klonierung der Metagenombank APAE02 ist während einer Kooperation mit dem Labor von Christa Schleper zusammen mit Achim Quaiser an der Technischen Universität Darmstadt in der Zeit von Mai bis August 2002 durchgeführt worden.

#### **3.4.12 Archivierung der Metagenombank APAE02**

Kolonien transduzierter *E. coli* Epi100<sup>TM</sup> Zellen wurden steril gepickt und jeweils einzeln in „wells“ 384er Mikrotiterplatten (Nunc) mit LB Medium + 12,5 µg ml<sup>-1</sup> Chloramphenicol + 7,5% Glycerin überführt. Die Mikrotiterplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und mittels eines „384 pin replicators“ (Nunc) wiederum in Mikrotiterplatten bzw. auf Agar kopiert. Je eine Mikrotiterplatte entspricht einem APAE02 Pool. Kulturen sämtlicher rekombinanter und wildtypischer Zelllinien wurden zur Konservierung in 15% Glycerin bei -80°C gelagert.

#### **3.4.13 Plasmid Präparationen**

##### *Analytische Plasmid-Mini-Präparation*

Für analytische Plasmid Präparationen wurden 2 ml einer Übernachtskultur 2 min bei 13000 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl TE resuspendiert und zur Zelllyse mit 150 µl Lysepuffer vorsichtig durch dreimaliges Dekantieren durchmischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde zur Ausfällung von Proteinen und Zellwandbestandteilen 150 µl eiskaltes 3 M Natriumacetat hinzugegeben und 10 min auf Eis inkubiert. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 13000 U min<sup>-1</sup> abzentrifugiert, der klare Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Plasmide wurden durch Zugabe von 350 µl Isopropanol (0,7%; v/v) gefällt und mit 70% Ethanol gewaschen. Das DNA Pellet wurde luftgetrocknet und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### *Präparation rekombinanter Fosmide aus APAE02 „Pools“*

Metagenomklone eines „Pools“ wurden mit 5 ml TE, 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  RNase A von beimpften Agarplatten mittels eines Drigalskispatels abgewaschen und in 15 ml Falconröhrchen resuspendiert. Zellyse und Präparation der Fosmide erfolgte gemäß Standardprotokollen. Fosmide wurden durch Anionenaustausch Chromatographie gereinigt, eluiert und mittels 0,7% (v/v) Isopropanol gemäß den Herstellerangaben (Qiagen) gefällt und luftgetrocknet. Das DNA Pellet wurde in 200  $\mu\text{l}$  TE aufgenommen und diente als Matrize für PCR basiertes, genspezifisches „Screening“ der Metagenombank APAE02.

### *Plasmid-Midi-Präparation*

Die Präparation einzelner rekombinanter Fosmidklone erfolgte unter Nutzung des „Plasmid Midi kit“ und des „Plasmid large construct kit“ gemäß Herstellerangaben (Qiagen). Das „Plasmid large construct kit“ wurde zur Plasmidisolation für nachfolgende „shot-gun“ Subklonierungen und Sequenzierungen verwendet. Dieses „Kit“ beinhaltet eine Exonuclease, die für den enzymatischen Abbau linearer Nukleinsäuren benutzt wird (Qiagen).

## **3.4.14 Kolonie-Blot Analysen**

### *Transfer von E. coli Einzelkolonien auf Nylonmembranen*

Eine Nylonmembran wurde auf LB Medium + 12,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  Chloramphenicol gelegt. Anschließend wurden APAE02 Pools mittels des „384 pin replicators“ (Nunc) auf die Membran kopiert und bei 37°C für 12-16 h inkubiert. Vier Whatman-Papiere wurden auf die Größe der Membran geschnitten und jeweils mit einer der folgenden Lösungen getränkt: 1. 10% SDS, 2. Denaturierungslösung, 3. Neutralisierungslösung, 4. SSC (siehe Anhang, Kapitel 7). Die Membranen wurden jeweils mit der Kolonieseite nach oben nacheinander für 5 min bei Raumtemperatur in der angegebenen Reihenfolge auf die Whatman-Papiere gelegt. Nachdem Zellreste der Einzelkolonien nach der Lyse mit Wattestäbchen entfernt worden sind, wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV Licht auf der Membran fixiert.

### *Markierung der DNA Sonden*

DNA Fragmente, die als Sonde für Hybridisierungen dienten, wurden via PCR amplifiziert. Diese Fragmente wurden vor der Hybridisierung mittels des „ECL™ Kit“ (Amersham) gemäß Herstellerangaben markiert. Zur Markierung wird Meerrettich-Peroxidase kovalent an die Sonden-DNA gebunden. Bei der Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  wird Luminol oxidiert. Dieser Vorgang führt zur Freisetzung von Licht, das durch lichtensitive Filme detektiert werden kann.

### *Hybridisierung und Signaldetektion*

Membranen wurden für 12-16 h bei 42°C nach Vorinkubation für 1 h in Hybridisierungslösung inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte mittels des „ECL<sup>TM</sup>Kit“ gemäß Herstellerangaben (Amersham) auf Röntgenfilmen.

### **3.4.15 DNA Sequenzierungen**

Die Bestimmung der DNA Sequenz erfolgte an einem LI-COR DNA Sequencer 4200 mittels des „SequiTherm EXEL<sup>TM</sup> II Long-Read<sup>TM</sup> DNA Sequencing Kit-LC“ (Epicentre) und an einem ABI 377XL Sequenzierer mittels „AmpliTaQ® FS Big Dye Terminator“ jeweils nach den Angaben der Hersteller. Das klonierte genomische DNA Fragment des nicht kultivierten Poribakteriums (64K2) und der in dieser Arbeit charakterisierte PKS Typ I kodierende Bereich des Metagenomklons 27P20 wurde von AGOWA GmbH in Berlin sequenziert (<http://www.agowa.de>).

### **3.4.16 Sequenzannotation und Sequenzalignments**

Die Annotation der Metagenomklone 64K2 und 27P20 erfolgte unter Anwendung von Vector NTI 6.0 (Informax) zur Identifikation der „open reading frames“ (ORFs) und wurde darüber hinaus mittels des „ORF-finders“ verifiziert. Sequenzhomologien zu Datenbankeinträgen wurden mittels „BlastN“, „BlastX“, „PSI“- und „PHI-Blast“ analysiert (Altschul et al. 1997). Transmembrandomänen identifizierter ORFs wurden via „DAS transmembrane prediction server“ nachgewiesen (Cserzo et al. 1997). tRNA Gene wurden via „tRNAscan-SE search server“ (<http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/>) charakterisiert. Sequenzwiederholungen („repeats“) wurden via „REPuter“ ermittelt (Kurtz und Schleiermacher 1999). Die in dieser Arbeit charakterisierten DNA Sequenzen wurden in die NCBI Datenbank (GeneBank) unter folgenden „Accession“ Nummern eingetragen. 16S rRNA Gene: AY485280 bis AY485299, 64K2: AY713479. Die Sequenz aus 27P20 wurde noch nicht übermittelt.

16S rRNA Sequenzen wurden mittels des „Chimera-Check“ Programms bezüglich Chimärenbildung untersucht (<http://www.rdp.cme.msu.edu/html/>) und mittels des „ARB“ Programms (<http://www.arb-home.de>) aligniert. Aminosäuresequenzen wurden mit „clustalX“ aligniert. Für phylogenetische Analysen wurden Distanzmatrizen, „Maximum Likelihood“- und „Parsimony“-Analysen verwendet. Nach „clustalX“-Alignments wurden phylogenetische Stammbäume via „Phylip“ berechnet und via „treeview“ dargestellt

(Thompson et al. 1997, Retief 2000, Page 1996). Internet URLs sind im Anhang (Kapitel 7) tabellarisch verzeichnet.

## 3.5 Proteinanalytische Methoden

### 3.5.1 Expression der poribakteriellen Oxidoreduktase in *E. coli*

Das komplette Gencluster der drei kodierenden Untereinheiten (oxrMSL) der poribakteriellen Oxidoreduktase wurde über die Restriktionsschnittstellen *XmaI* und *HindIII* „in frame“ in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) kloniert und in *E. coli* M15 [pREP4] Zellen transformiert. Positive Klone wurden in  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Ampicillin LB-Medium bis zu einer  $\text{OD}_{600} = 0,6$  inkubiert und die Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden jeweils 2 ml Kultur abzentrifugiert und das Zellpellet 10 min in kochendem Wasser aufgeschlossen. Nach Aufnahme in SDS-Probenpuffer wurde der Proteinrohextrakt mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

### 3.5.2 Elektrophoretische Methoden für die Proteinanalyse

#### *Denaturierende Polyacrylamid Gel Elektrophorese (SDS-PAGE)*

Zur Auftrennung von Proteinen wurden 10-15% Polyacrylamidgele benutzt. Diese bestanden aus einem unteren Trenngel (10-15%) und einem oberen Sammelgel (6%). Das Trenngel wurde bis zu einer Höhe von ca. 1 cm unterhalb des Taschenformers zwischen zwei Glasplatten der verwendeten Apparatur gegossen und mit  $\text{H}_2\text{O}$  überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels wurde das Sammelgel darüber gegossen und ein Taschenformer eingesetzt. Zellpellets bzw. Proteingemische wurden in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 5 min in kochendem Wasser denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 100 V.

#### *Coomassiefärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen*

Zur Färbung elektrophoretisch aufgetrennter Proteine wurden die SDS-Polyacrylamidgele 15 min in 0,25% Coomassie-Blau-G-250-Lösung geschwenkt und anschließend in 10% Essigsäure/20% Methanol gewaschen.

### 3.6 Funktionelle Screens der Metagenombank

Um biologische Aktivitäten einzelner Metagenomklone nachweisen zu können, wurden alle „Pools“ der Metagenombank APAE02 ausgehend von konservierten 384er Mikrotiter-Glycerinkulturen mittels des „384 pin replicators“ auf Testagarplatten oder LB-Agar (jeweils  $12,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  Chloramphenicol) überführt. Alle Agarplatten wurden anschließend bei  $30^\circ\text{C}$  drei Tage inkubiert. Die Metagenombank APAE02 ist während dieser Arbeit hinsichtlich proteolytischer, hämolytischer und antimikrobieller Aktivität untersucht worden. Außerdem wurden die Klone auf eine Überproduktion von Siderophoren gescreent. Proteolytische Aktivität wurde auf 1% Milchpulveragar, hämolytische Aktivität auf 2% Schafblutagar, antimikrobielle Aktivität mittels Überschichtung der Pools mit vorinokuliertem Softagar und Siderophorüberproduktion auf CAS Agar untersucht. Als „Targets“ für die Detektion antimikrobiell aktiver Klone wurden multiresistente humanpathogene Isolate verwendet (Tabelle 10, Anhang, Kapitel 7). Um die Aktivität positiver Klone zu bestätigen, wurden diese jeweils einzeln ein zweites Mal auf den entsprechenden Agarplatten getestet. Darüber hinaus wurden organische Extrakte aus Kulturüberständen und Zellpellets positiver Klone aus 100 ml Kulturen hergestellt und ebenfalls überprüft. Als Lösungsmittel wurden Ethylacetat und Methanol verwendet. Konzentrierte Extrakte wurden auf Sensidisc-Plättchen (Becton Dickinson) aufgetropft und durch Agardiffusionstests auf ihre Aktivität überprüft.

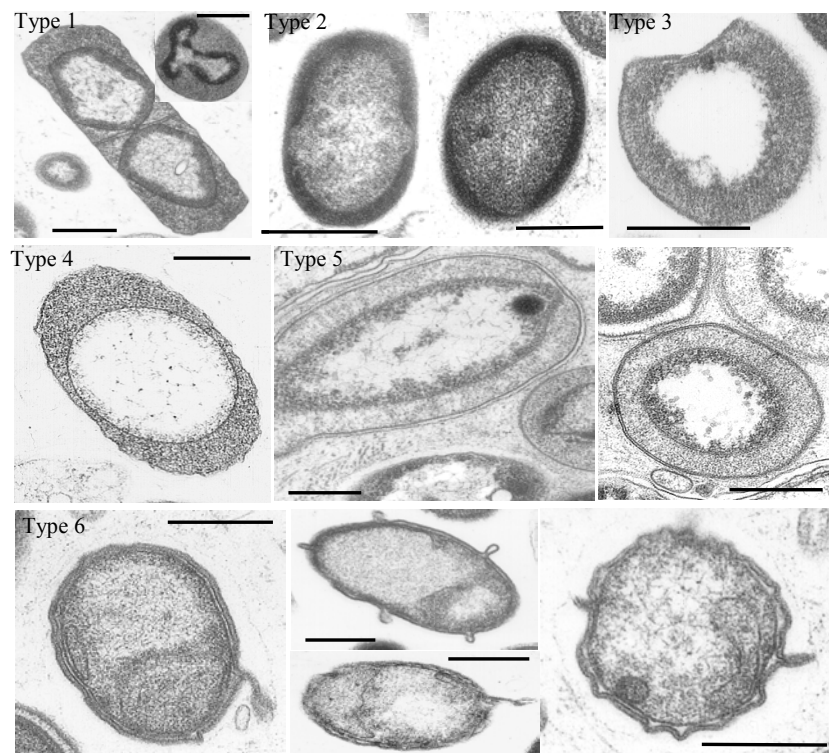


## 4. Ergebnisse

### 4.1 Beschreibung des neuen Candidatus Phylums *Poribacteria*

#### 4.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Mittels TEM konnten im mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* Bakterien nachgewiesen werden, die dem E-Morphotyp (Vacelet 1975, Friedrich et al. 1999) bzw. dem Typ 4 (Wilkinson 1978) morphologisch sehr ähnelten (Abbildung 9). Diese Bakterien wurden in Anlehnung an Fuerst et al. (1998, 1999) in sechs Subtypen (1-6, Tabelle 1) unterteilt. Bei den Subtypen 1-5 wird das nukleus-ähnliche Kompartiment von einer Lipidmembran umschlossen und beinhaltet fibrilläre DNA. Außerhalb dieses Kompartimentes befindet sich das elektronendichte Zytoplasma. Die Morphotypen variieren in ihrer Zellform (kurze und lange Stäbchen und D-förmige Zellen), Zellwandstruktur (gram-negative Zellen und „S-layer“ Typen) und der Dichte des Zytoplasmas. Subtyp 6 zeigt eine reverse Topologie, da sich die DNA im Zytoplasma befindet, während das membran-umschlossene Kompartiment DNA frei ist (Fuerst et al. 1998, 1999). Weiterhin fallen bei diesem Subtyp blasenartige Strukturen an der Zellmembran auf. Diese Morphologie ähnelt der von *Gemmatimonas aurantiaca*, dem ersten repräsentativen Vertreter des neuen Phylums *Gemmatimonadetes* (Zhang et al. 2003). Die Morphologie der Subtypen 1-5 entspricht der von *Planctomycetales*. Um die phylogenetische Identität dieser ungewöhnlichen Bakterien bestimmen zu können, wurden 16S rRNA Genbanken erstellt.



**Abbildung 9** TEM. Subtypen 1-6 der bakteriellen E-Morphotypen (nach Vacelet 1975, Friedrich et al. 1999) assoziierter Bakterien aus *A. aerophoba* (Größenmaßstab 1  $\mu\text{m}$ ).

**Tabelle 1** Morphologische Eigenschaften der bakteriellen Morphotypen mit nukleus-ähnlichen Kompartimenten aus *A. aerophoba* nach Fuerst et al. (1998, 1999).

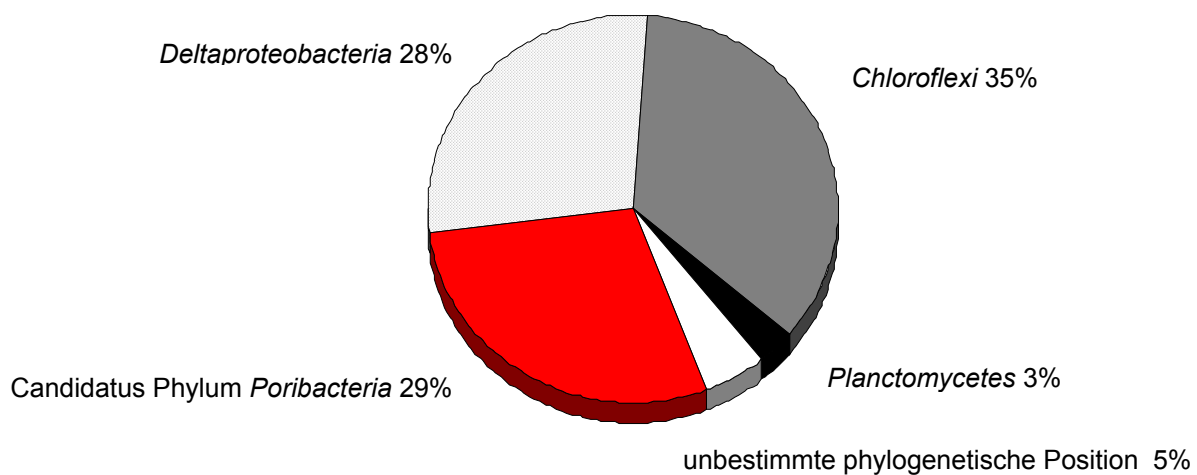
Morphotyp	Eigenschaften
1	Lange Stäbchen mit membranumschlossenen Nukleuskörper und S-layer artiger Zellwand, Zellteilung erfolgt durch Bildung eines Septums.
2	Kurze dicke Stäbchen mit membranumschlossenen Nukleuskörper und elektronendichten Zytoplasma.
3	D-förmige Zellen mit klaren membranumschlossenen Nukleuskörper und S-layer-artiger Zellwand.
4	Stäbchen mit klaren membranumschlossenen Nukleuskörper und gram-negativer Zellwand.
5	Stäbchen mit klarem membranumschlossenen Nukleuskörper und S-layer-artiger Zellwand.
6	Stäbchen mit membranumschlossenen Nukleuskörper, der keine DNA enthält; das Kompartiment enthält RNA, während DNA in Zytoplasma liegt; die Zellwand zeigt blasenförmige Erweiterungen, der periplasmatische Zwischenraum erscheint ungewöhnlich groß; phänotypische Ähnlichkeit zu <i>G. aurantiaca</i> .



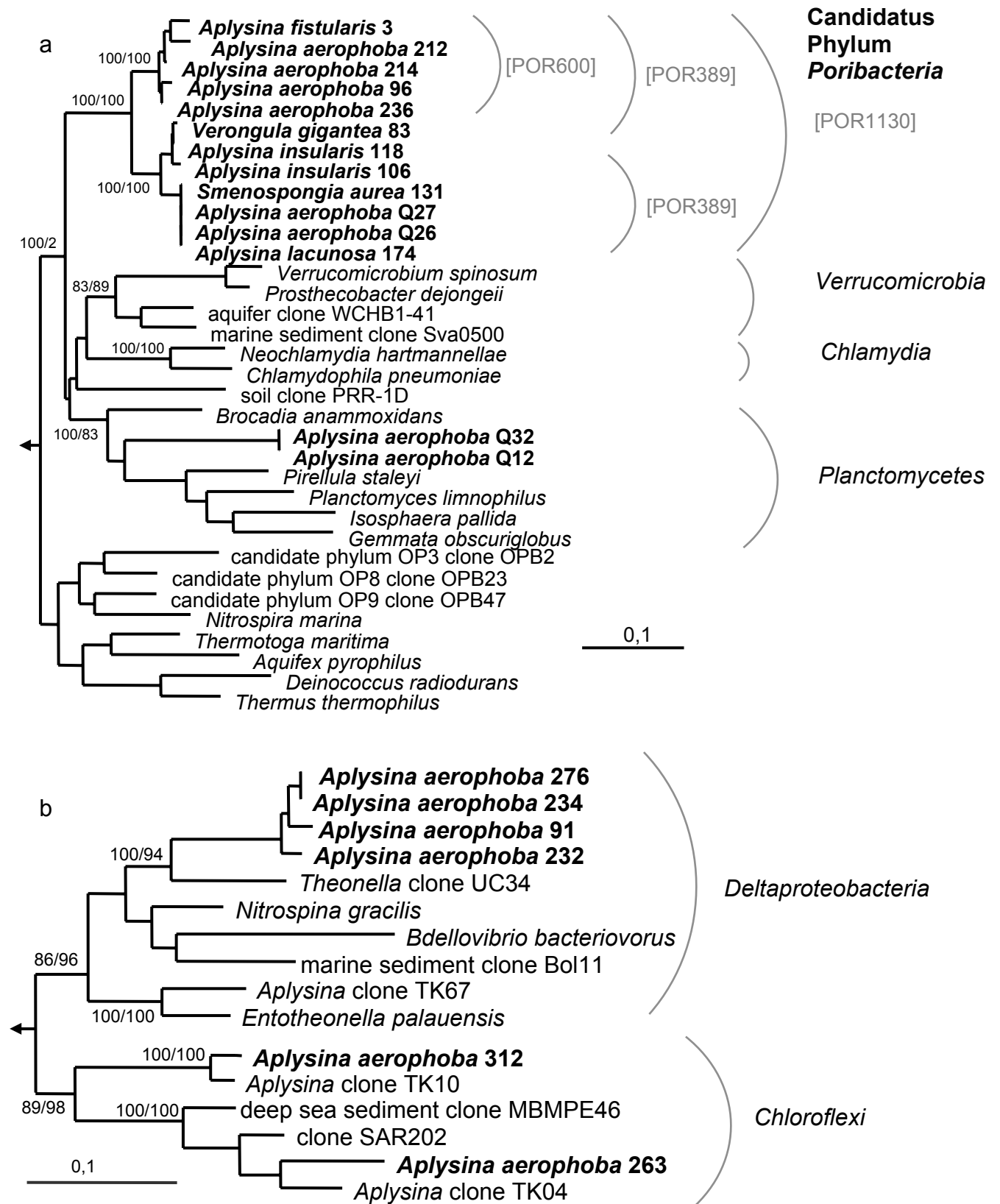
#### 4.1.2 Phylogenetische Analyse von 16S rRNA Genen

Da der beschriebene bakterielle E-Morphotyp überwiegend planktomyceten-ähnliche Charakteristika aufwies, wurden für die Erstellung der 16S rRNA Genbanken planktomyceten-spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation der entsprechenden Gene während der PCR eingesetzt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 11 aufgelistet (Anhang, Kapitel 7). Die Amplifikation aus DNA Präparationen von *A. aerophoba*, *A. fistularis*, *A. insularis*, *A. lacunosa* und *Verongula gigantea* (jeweils *Verongida*) und *Smenospongia aurea* (*Dictyoceratida*) lieferte die erwarteten Reaktionsprodukte von 1,3 kb und 840 bp entsprechend der eingesetzten Primerpaare pla46f und 1390r, bzw. pla46f und pla886r. Unter Verwendung der Primerpaare 27f und 1385r/1390r/1492r konnten 16S rRNA Gene von *Planctomycetes* oder planktomyceten-ähnlichen Organismen nicht nachgewiesen werden. Genomische DNA von *E. coli* und *P. marina* wurde jeweils als Negativ- bzw. Positivkontrolle verwendet. 600 Klone wurden durch Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) mittels der Restriktionsendonukleasen *HaeIII* und *AvaI* charakterisiert. Dabei konnten sechs abundante Restriktionsmuster identifiziert werden. Von insgesamt 157 Klonen wurden ca. 650 b des klonierten 16S rDNA Fragments sequenziert. Davon wurden 13 chimäre Sequenzen von der weiterführenden Analyse ausgeschlossen. 29% (n=41) der 16S rDNA Sequenzen zeigten nur 74,6% Ähnlichkeit zu 16S rRNA Gensequenzen zu bereits beschriebenen Phyla (Tabelle 13, CD-ROM). Diese Sequenzen bildeten in allen angewandten phylogenetischen Analysen eine neue evolutionäre Abstammungslinie, die tief in der Domäne Bacteria abzweigte. Aufgrund der phylogenetisch separaten Position dieser Sequenzgruppe wurde definitionsgemäß die Detektion eines neuen Candidatus Phylums „*Poribacteria*“ postuliert. Phylogenetisch verwandte Phyla sind *Planctomycetes* und *Verrucomicrobial/Chlamydia*. Eine monophyletische Gruppierung des poribakteriellen Phylums zeigte sich in „Maximum Likelihood“- und „Neighbor-Joining“-Stammbäumen, während „Parsimony“-Stammbäume kein stabiles Abzweigungsmuster aufwiesen. Von zwölf repräsentativen poribakteriellen 16S rRNA Genen wurde der klonierte Bereich vollständig sequenziert (1300 b). Diese annähernd vollständigen 16S rRNA Gensequenzen des Candidatus Phylums *Poribacteria* wiesen 13 von 15 konservierten Signatur-nukleotidregionen auf, welche für *Planctomycetes* charakteristisch sind (87%). Die durchschnittliche „in-cluster“-Ähnlichkeit poribakterieller 16S rRNA Gene lag bei 92,7% (Tabelle 13, CD-ROM), was im Vergleich zu anderen Phyla relativ hoch ist (Dojka et al. 2000).

Die restlichen 103 16S rRNA Gensequenzen konnten phylogenetisch zu den *Deltaproteobacteria* (28%; n=40), *Chloroflexi* (35%; n=51), *Planctomycetes* (3%; n=4) und einer Gruppe von Sequenzen mit unbestimmter phylogenetischer Position (5%; n=7) zugeordnet werden. Abbildung 10 fasst die Ergebnisse graphisch zusammen, während Abbildung 11 ein phylogenetisches Dendrogramm zeigt. Die detektierten *Deltaproteobacteria* und *Chloroflexi* wurden bereits von Hentschel et al. (2002) aus dem mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* beschrieben.



**Abbildung 10** Phylogenetische Zusammensetzung der erstellten 16S rRNA Genbanken (n=157).

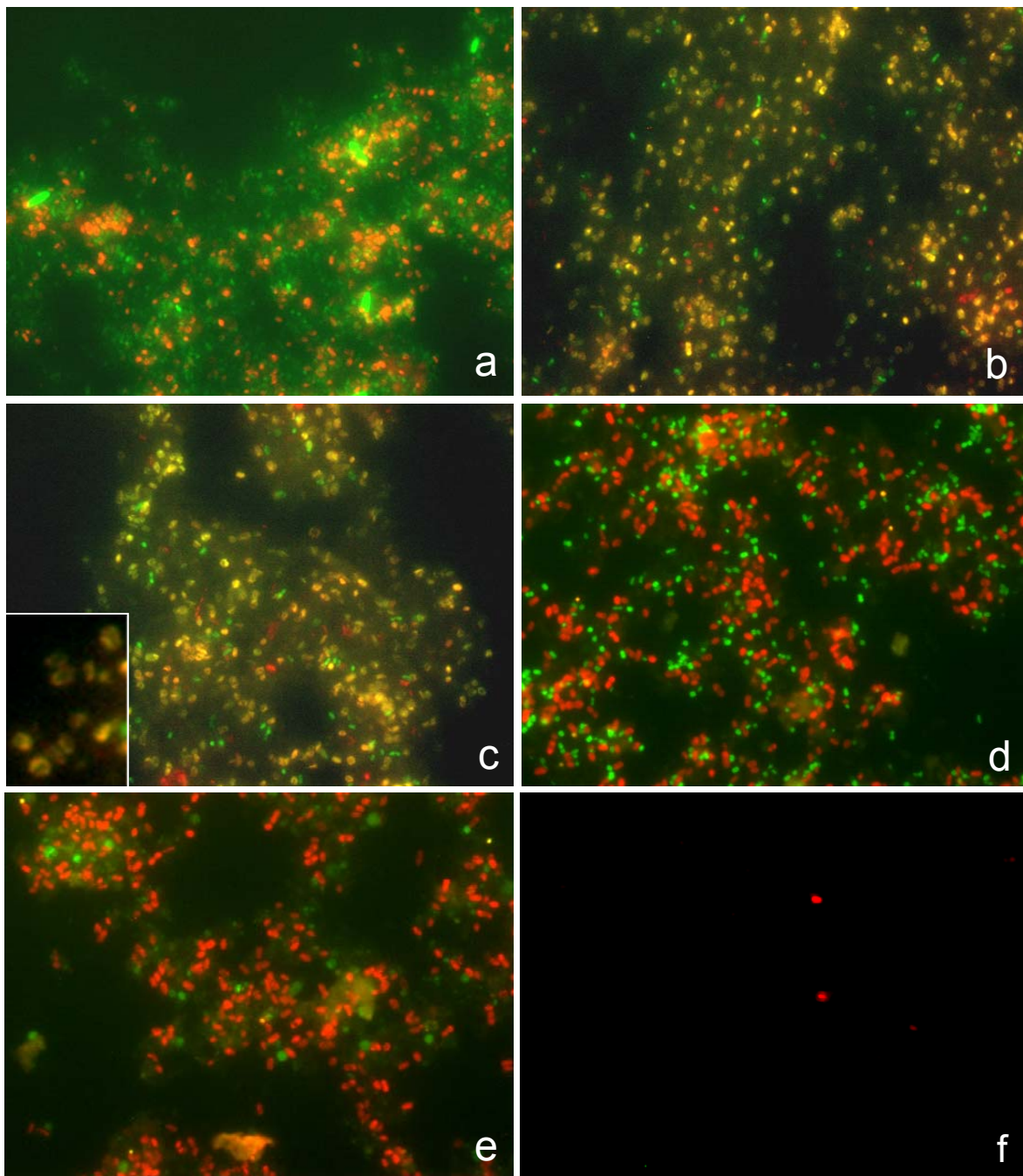


**Abbildung 11** Phylogenetisches „maximum-likelihood“-Dendrogramm der 16S rRNA Sequenzen (1300 b) des Candidatus Phylums *Poribacteria* (a) und der *Deltaproteobacteria* und *Chloroflexi* (b). Die Spezifität neu konstruierter poribakterieller FISH Sonden ist in eckigen Klammern [POR] angedeutet. „Bootstrap“-Werte sind für „Neighbor-Joining“- und „Parsimony“-Analysen wiedergegeben. Maßstab: 10% Divergenz.

### 4.1.3 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Um die Identität des Candidatus Phylums *Poribacteria* und deren Häufigkeit innerhalb des mikrobiellen Konsortiums von *A. aerophoba* zu zeigen, wurden ausgehend von den klonierten poribakteriellen 16S rRNA Genen spezifische FISH Sonden konstruiert (Tabelle 11, Anhang, Kapitel 7). Da FISH mit Gewebepräparationen von *A. aerophoba* aufgrund der hohen Autofluoreszenz des Gewebes nur undeutliche Signale lieferte, wurde ein Protokoll zur Gewinnung mikrobieller Biomasse aus dem Mesohyl von *A. aerophoba* etabliert. Prokaryontische Zellen wurden für FISH fixiert. Kohybridisierungen der Sonden EUB338 I-III mit der poribacteria-spezifischen Sonde POR1130 belegen die Abundanz der *Poribacteria* innerhalb des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba*. Die Identität der *Poribacteria* wurde weiterhin durch Kohybridisierungen mehrerer poribacteria-spezifischer Sonden überprüft. Dazu wurden Hybridisierungen mit den Sonden POR389 und POR1130, bzw. mit POR600 und POR1130 durchgeführt, was jeweils in kolokalisierten Signalen resultierte. Wie durch die Nummerierung der POR Sonden angezeigt wird, unterscheiden sich die Sonden in ihrer jeweiligen spezifischen Zielsequenz innerhalb des 16S rRNA Moleküls. Durch die Fraktionierung der Zellen aus dem Mesohyl von *A. aerophoba* konnten einzelne Signale deutlich voneinander unterschieden und hoch auflösend abgebildet werden. Übereinstimmend mit dem Vorhandensein des nukleus-ähnlichen Kompartiments erschienen die entsprechenden FISH Signale der *Poribacteria* ringförmig (Abbildung 12). *Planctomycetales* zeigten in Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen aufgrund des Pirellusoms ebenfalls ringförmige FISH Signale (Neef et al. 1998).

Da neben poribakteriellen 16S rRNA Genen auch 16S rRNA Gene von *Chloroflexi* und *Deltaproteobacteria* amplifiziert wurden, wurde durch vergleichende Kohybridisierungen mit den entsprechenden spezifischen FISH-Sonden deren respektive Häufigkeit ebenfalls überprüft. Kohybridisierungen mit der chloroflexi-spezifischen Sonde GNS934 und POR1130 zeigten unterschiedliche Signale in gleicher Häufigkeit. Die chloroflexi-spezifische Sonde GNS934 wurde spezifisch für die monophyletischen Abstammungslinie GNS-I der *Chloroflexi* innerhalb des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* konstruiert (Abbildung 7). Kohybridisierungen von POR1130 mit SRB385, einer deltaproteobacteria-spezifischen Sonde (Amann et al. 1995), zeigten, dass *Poribacteria* häufiger vertreten sind als *Deltaproteobacteria*. Hybridisierungen mit planctomyceten-spezifischen Sonden PLA46 und PLA886 lieferten nur vereinzelte Signale (Abbildung 12).



**Abbildung 12** FISH a: *Bacteria* (EUB338 I-III Flu), *Poribacteria* (POR1130 Cy3); b: *Poribacteria* (POR1130 Flu, POR389 Cy3); c: *Poribacteria* (POR1130 Flu, POR600 Cy3) links unten vergrößerter Bildausschnitt; d: *Poribacteria* (POR1130 Cy3), *Chloroflexi* (GNS934 Flu); e: *Poribacteria* (POR1130 Cy3), *Planctomycetes* (PLA886 Flu); f: *Planctomycetes* (PLA46 Cy3). Erläuterungen im Text.

#### 4.1.4 Verbreitung der *Poribacteria*

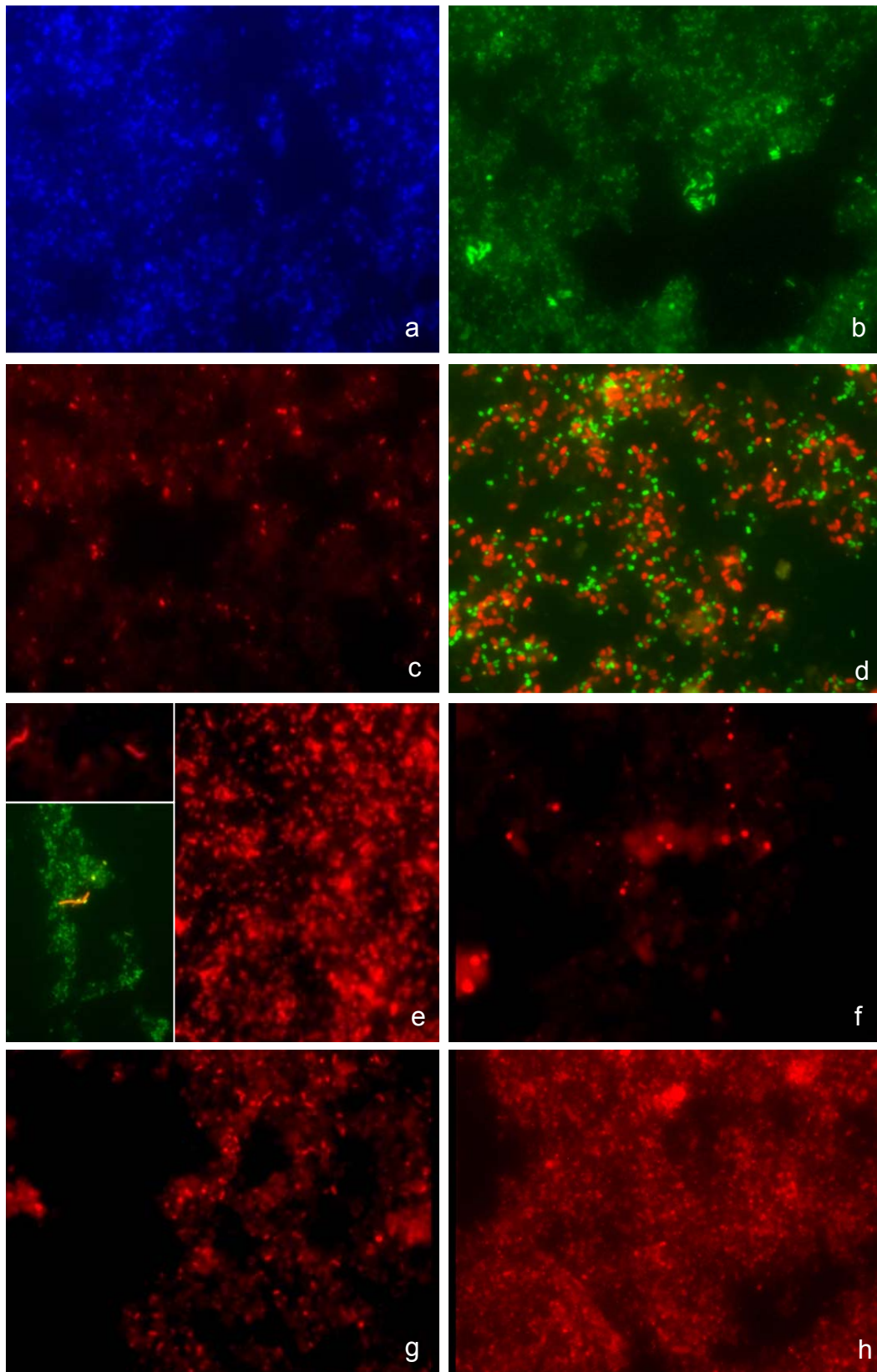
Um die Verbreitung der *Poribacteria* in taxonomisch unterschiedlichen Spezies untersuchen zu können, wurden PCR basierte Tests mit DNA Präparationen aus marinen Bakterioplankton, marinen Sediment, eines marinen Tunicaten und weiteren bakterienhaltigen marinen Demospongiae wie *Aplysina cavernicola*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri* und *Pseudoceratina crassa* (jeweils *Verongida*), *Xestospongia muta* (*Haplosclerida*), *Theonella swinhoei* (*Lithistida*), *Ectyoplasia ferox* (*Poecilosclerida*), *Agelas wiedenmayeri* und *Agelas cerebrum* (*Agelasida*), *Ptilocaulis* sp. (*Halichondria*), *Chondrilla nudula* (*Hadromerida*) durchgeführt. Die beprobten Individuen entstammen unterschiedlichen geografischen Standorten im Mittelmeer, im Pazifik und in der Karibik (siehe Methoden, Kapitel 3.1).

Ausgehend von 16S rRNA Signaturnukleotiden der *Poribacteria* wurden die Primer 389f und 1130r (Tabelle 11) für die PCR eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden jeweils die „universellen“ 16S rRNA Gen Primer 27f und 1492r verwendet. Während die PCR mit Matrizen DNA aus marinen Bakterioplankton und marinem Sediment in konventionellen und „nested“ PCRs immer poribakteria-negativ war, konnten *Poribacteria* in *Aplysina cavernicola*, *Aplysina cauliformis*, *Aplysina archeri* und *Pseudoceratina crassa* (*Verongida*), *Xestospongia muta* (*Haplosclerida*) und *Theonella swinhoei* (*Lithistida*) nachgewiesen werden. Aus DNA Präparationen von *Ectyoplasia ferox* (*Poecilosclerida*), *Agelas wiedenmayeri* und *Agelas cerebrum* (*Agelasida*), *Ptilocaulis* sp. (*Halichondria*) und *Chondrilla nudula* (*Hadromerida*) konnten *Poribacteria* via PCR nicht nachgewiesen werden.

## 4.2 Konstruktion der Metagenombank APAE02

### 4.2.1 Präparation mikrobieller Biomasse aus *A. aerophoba*

Da die Mehrzahl assoziierter Bakterien aus marinen Demospongiae bisher nicht kultiviert werden konnte (Pimentel et al. 2003), wurde im Rahmen dieser Arbeit die Metagenombank APAE02 erstellt. Für die Konstruktion dieser Metagenombank musste mikrobielle Biomasse vom Mesohyl *A. aerophobas* getrennt und isoliert werden, um den Anteil eukaryontischer Zellen zu reduzieren. Nach Etablierung der differentiellen Zentrifugation zur Gewinnung mikrobieller Biomasse (siehe Methoden, Kapitel 3.2) wurde die isolierte prokaryontische Zellfraktion mittels FISH charakterisiert. Hybridisierungen mit den EUB338 Sonden I-III zeigten hohe Signalabundanzen. *Alpha*-, *Gamma*-, und *Deltaproteobacteria*, *Poribacteria*, *Chloroflexi* und gram-positive Bakterien sowohl hohen als auch niedrigen GC-Gehaltes konnten nachgewiesen werden. DAPI Färbungen zeigten, dass die prokaryontische Zellfraktion visuell frei von eukaryontischen Zellkernen war (Abbildung 13). Die eingesetzten Sonden sind in Tabelle 11 (Anhang, Kapitel 7) aufgelistet.

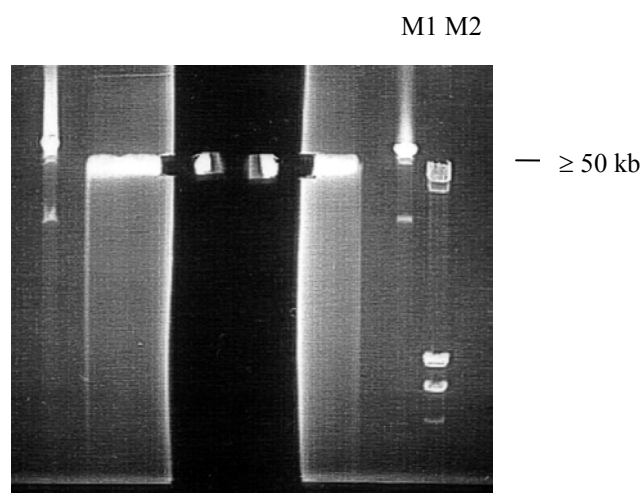


**Abbildung 13** Fluoreszenzmikroskopie. a: DAPI-Färbung, 2-8: FISH. b: *Bacteria* (EUB338 I-III Flu), c: *Deltaproteobacteria* (SRB385 Cy3), d: *Poribacteria* (POR1130 Cy3), *Chloroflexi* (GNS934 Flu), e: *Gammaproteobacteria* (GAMMA42 Cy3), im Bildausschnitt unten links Kohybridisierung mit EUB338I-III (Flu), f: *Alphaproteobacteria* (ALPHA968 Cy3), g: gram-positive *Bacteria* (HGC69 Cy3), h: gram-positive *Bacteria* (NHGC Cy3). Weitere Erläuterungen im Text.



#### 4.2.2 Isolation hoch molekularer genomischer DNA

Die Metagenombank APAE02 konnte ausgehend von  $1 \times 10^9$  prokaryontischen Zellen  $\text{ml}^{-1}$  konstruiert werden, welche in Agarose eingebettet und lysiert wurden. Nach einer zweiten Größenselektion in präparativen Puls Feld Agarosegelen und Kompression der Fragmente auf  $\geq 50$  kb konnte hoch molekulare genomische DNA intakt isoliert werden (Abbildung 14). Die Modifikation isolierter DNA und die Parameter für die „Blunt“-Ligation in den Fosmid Vektor pEpiFos5<sup>TM</sup> wurden spezifisch eingestellt und sind in Kapitel 3.4.3 und 3.4.10, Methoden, beschrieben.



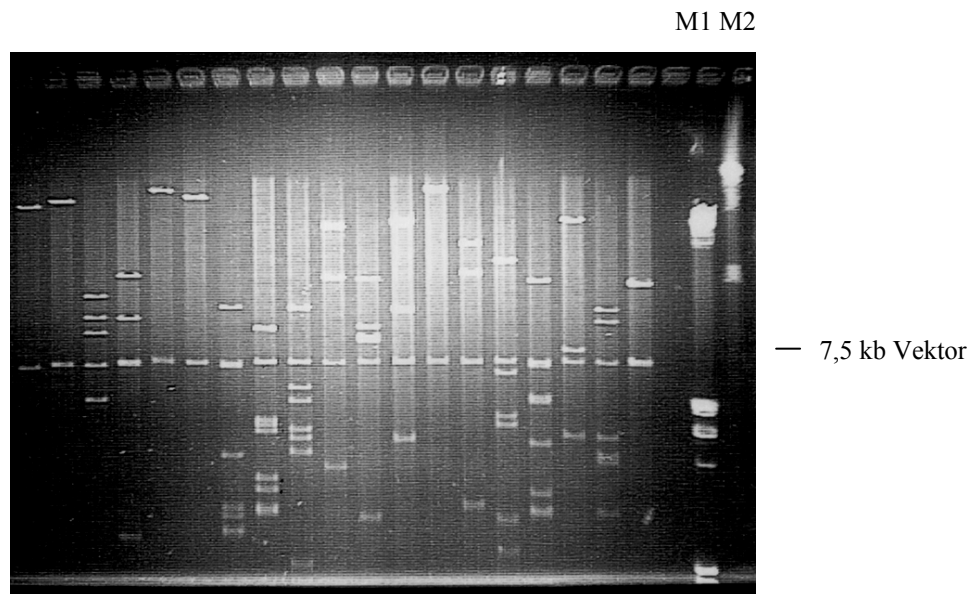
**Abbildung 14** PFGE für die zweite Größenselektion genomischer DNA von mikrobieller Biomasse aus *A. aerophoba*. Hoch molekulare DNA wurde auf  $\geq 50$  kb komprimiert und anschließend elektroeluiert. M: Marker.

#### 4.2.3 Charakteristika der Metagenombank

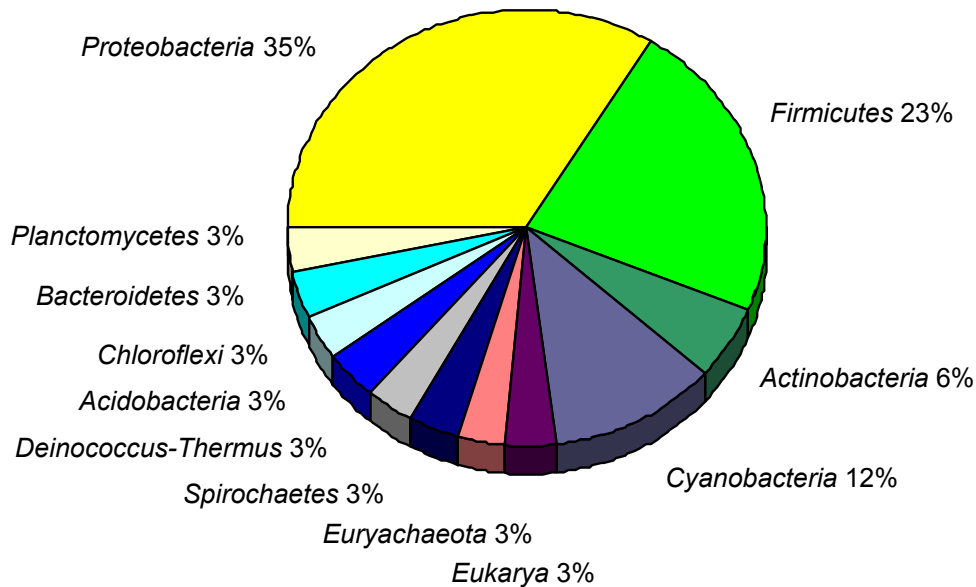
Die Metagenombank APAE02 umfasst insgesamt 29108 Klone, die in 76 384-„well“-Mikrotiterplatten dreifach abgelegt wurden. Jeweils eine dieser Mikrotiterplatten entspricht einem Genbank-„Pool“. Eine *NotI* Restriktionsanalyse von insgesamt 62 zufällig ausgewählten Klonen ergab eine durchschnittliche Fragmentgröße klonierter DNA von  $\sim 38$  kb (Abbildung 15). Dem entsprechend wurden in dieser Metagenombank 1,1 Gb genomischer DNA des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* archiviert.

Zur Überprüfung, ob tatsächlich prokaryontische DNA kloniert wurde und um die Komposition der Metagenombank beschreiben zu können, wurden „Inserts“ zufällig ausgewählter Klone terminal ansequenziert (ca. 600 b). Nach BlastX Analyse und Sequenzdatenbankvergleichen wurden die „Inserts“ aufgrund von Sequenzhomologien

unterschiedlichen Phyla zugeordnet. Insgesamt wurden 24 terminale „Insert“-Sequenzen charakterisiert, die überwiegend von *Proteobacteria* stammten (35%). *Firmicutes* bildeten 23%, *Actinobacteria* 6%, *Cyanobacteria* 12%, und *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Planctomycetes*, *Spirochaetes*, *Bacteroidetes*, *Euryarchaeota* und *Eukarya* jeweils 3% der charakterisierten Metagenomklone. Diese Verteilung entspricht Beobachtungen aus FISH Analysen, die eine hohe Abundanz von *Proteobacteria* und gram-positiven Mikroorganismen zeigten (Abbildung 13). Abbildung 16 zeigt die Komposition der Metagenombank APAE02 und verdeutlicht den überwiegend prokaryontischen Anteil klonierter DNA Fragmente. Eine umfangreiche Sequenzierung terminaler „Insert“-Bereiche und eine Einordnung von DNA Fragmenten zu phylogenetischen Gruppen anhand von Tetranukleotidfrequenzen ist während dieser Arbeit nicht vorgenommen worden, allerdings steht die Metagenombank APAE02 solchen und weiteren Sequenzierungsprojekten prinzipiell zur Verfügung.



**Abbildung15** *NotI* Restriktionsanalyse zufällig ausgewählter Metagenomklone nach PFGE. M: Marker.



**Abbildung 16** Phylogenetische Komposition der Metagenombank APAE02 nach terminaler Sequenzanalyse zufällig ausgewählter Klone (n=24).

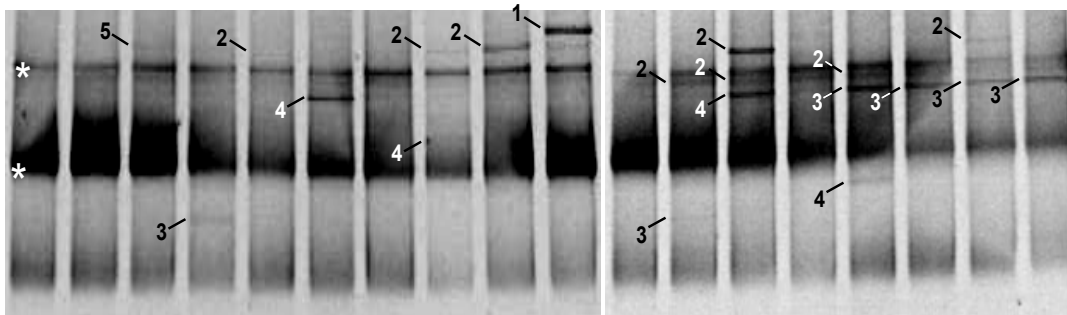
## 4.3 Screening der Metagenombank APAE02

### 4.3.1 Ermittlung der phylogenetischen 16S rRNA Diversität

Um die phylogenetische Diversität der Metagenombank APAE02 zu ermitteln, wurde ein PCR basierter 16S rRNA Gen Screen durchgeführt. Genomische DNA von *E. coli* Epi100™ diente als Kontrolle. Die PCR Produkte aus allen 76 Genbank-„Pools“ wurden mittels Denaturierender Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) analysiert. Dazu wurde während der Reaktion eine „GC-Klammer“ an die amplifizierten PCR Produkte angehängt, um eine bessere Auflösung im DGGE-Gel zu ermöglichen. Für die Amplifikation wurden die „universellen“ 16S rRNA Gen Primer 341fGC und 907r verwendet (Tabelle 12). Durch die DGGE Analyse konnten 16S rRNA Genfragmente aus *E. coli* von klonierten 16S rRNA Genfragmenten der mikrobiellen Biomasse aus *A. aerophoba* elektrophoretisch getrennt und unterschieden werden (Abbildung 17). In dieser Arbeit wurde DGGE erstmals für das Screening einer Genbank eingesetzt.

Insgesamt 40 von 76 „Pools“ waren 16S rRNA Gen-positiv. *Cyanobacteria*-16S rRNA Gene konnten in 23 von 40 „Pools“ nachgewiesen werden, *Chloroflexi*-16S rRNA Gene in 10 von

40, *Acidobacteria*-16S rRNA Gene in 4 von 40 und *Gammaproteobacteria*-16S rRNA Gene in 3 von 40 „Pools“. *Alpha*- und *Deltaproteobacteria*, *Nitrospira*, *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* konnten auf 16S rRNA Ebene nicht in der Metagenombank APAE02 nachgewiesen werden. Die 16S rRNA Gene zeigten 92-98% Ähnlichkeit zu 16S rRNA Genen aus monophyletischen *A. aerophoba*-spezifischen 16S rRNA Gengruppen, welche von Hentschel et al. (2002) als mikrobielle Signaturflora beschrieben worden sind (Abbildung 7). Zusätzlich konnte durch diesen Screen ein poribacteria-positiver „Pool“ identifiziert werden. Das poribakterielle 16S rRNA Genfragment war nur als schwache Bande im DGGE Gel erkennbar.



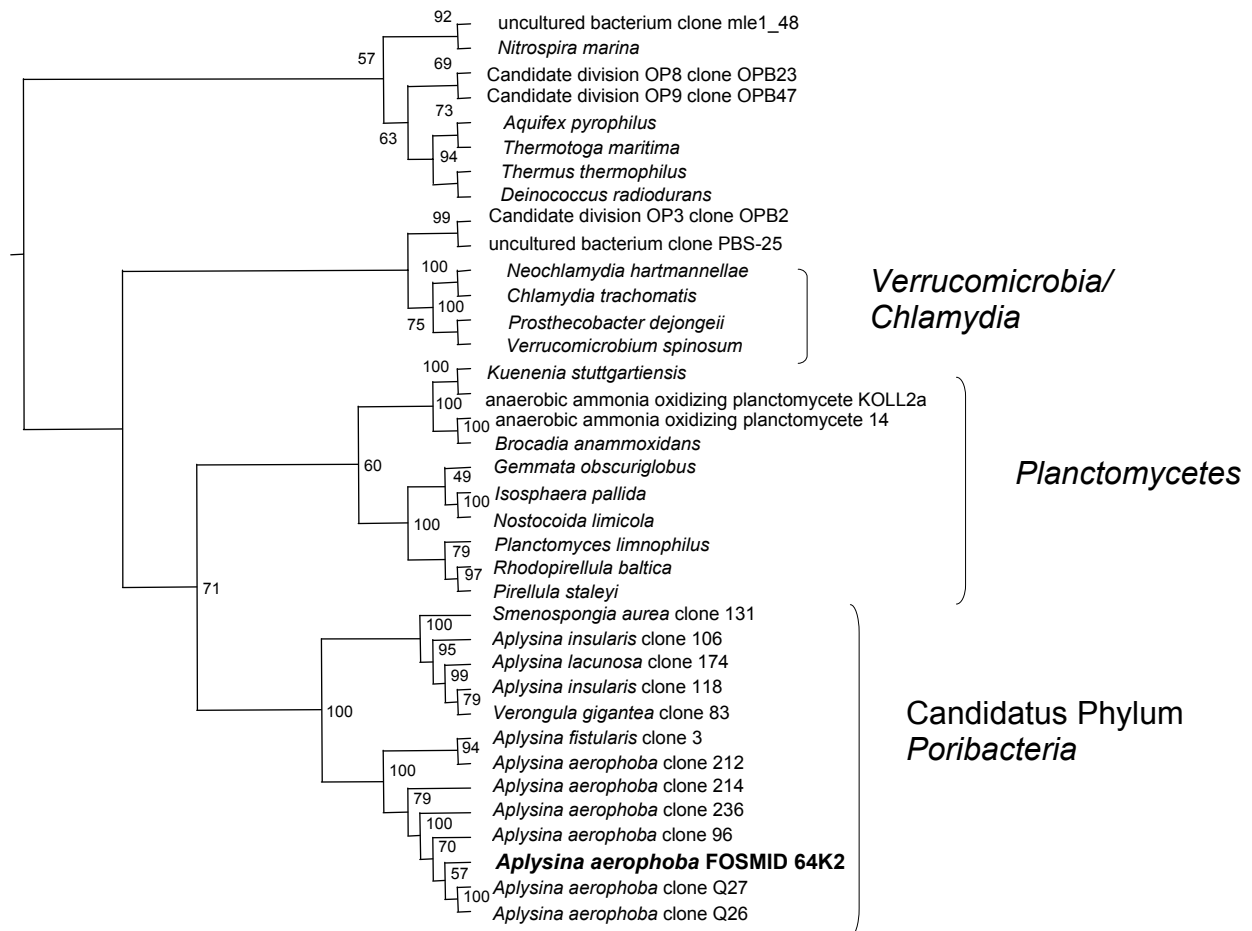
**Abbildung 17** Auszug DGGE analysierter Metagenombank-„Pools“. Linke Spur: *E. coli*, der Stern „\*“ kennzeichnet das *E. coli* 16S rRNA Genfragment, das aus allen „Pools“ amplifiziert wurde. 1: *Acidobacteria*, 2: *Cyanobacteria*, 3: *Chloroflexi*, 4: *Gammaproteobacteria*, 5: Candidatus Phylum *Poribacteria*. Markierte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und sequenziert.

### 4.3.2 Nachweis eines poribakteriellen genomischen DNA Fragments

Der poribakterielle Metagenomklon 64K2 wurde innerhalb des positiven „Pools“ 64 durch Kolonieblots nachgewiesen (Abbildung 18). Dazu wurde mit poribacteria-spezifischen 16S rRNA Gen Primern (389f und 1130r, Tabelle 12, Anhang, Kapitel 7) das entsprechende 16S rRNA Gen partiell amplifiziert. Das Fragment wurde mittels des „ECL-kits“ (Amersham) markiert und als Sonde für die Hybridisierung des Kolonieblots verwendet. Durch eine phylogenetische Analyse des 16S rRNA Genfragments mittels automatischem clustalX Alignments konnte das genomische Fragment dieses Klons (64K2) dem Candidatus Phylum *Poribacteria* zugeordnet werden (Abbildung 19). Die entsprechenden Abzweigungsmuster waren in Distanzmatrix- und „Maximum Likelihood“- Analysen identisch. „Parsimony“- Stammbäume zeigten ein abweichendes Verzweigungsmuster. Die Gruppierung des poribakteriellen Sequenzclusters war in allen angewandten Analysen stabil. An diesen Klon terminal angrenzende Klone konnten via PCR in der Metagenombank APAE02 nicht detektiert werden. Somit war ein Assemblieren weiterer genomischer „Contigs“ nicht möglich.



**Abbildung 18** Kolonieblot des „Pools“ 64 mittels ECL-markierter 16S rRNA Gen Sonde zur Identifikation des poribakteriellen Metagenomklons.



**Abbildung 19** Phylogenetische Analyse des 16S rRNA Gens des poribakteriellen Metagenomklons (64K2) nach Berechnung von Distanz Matrizen für >1300 Nukleotidpositionen. „Outgroup“: *E. coli*.

## 4.4 Sequenzanalyse des poribakteriellen Metagenomklones

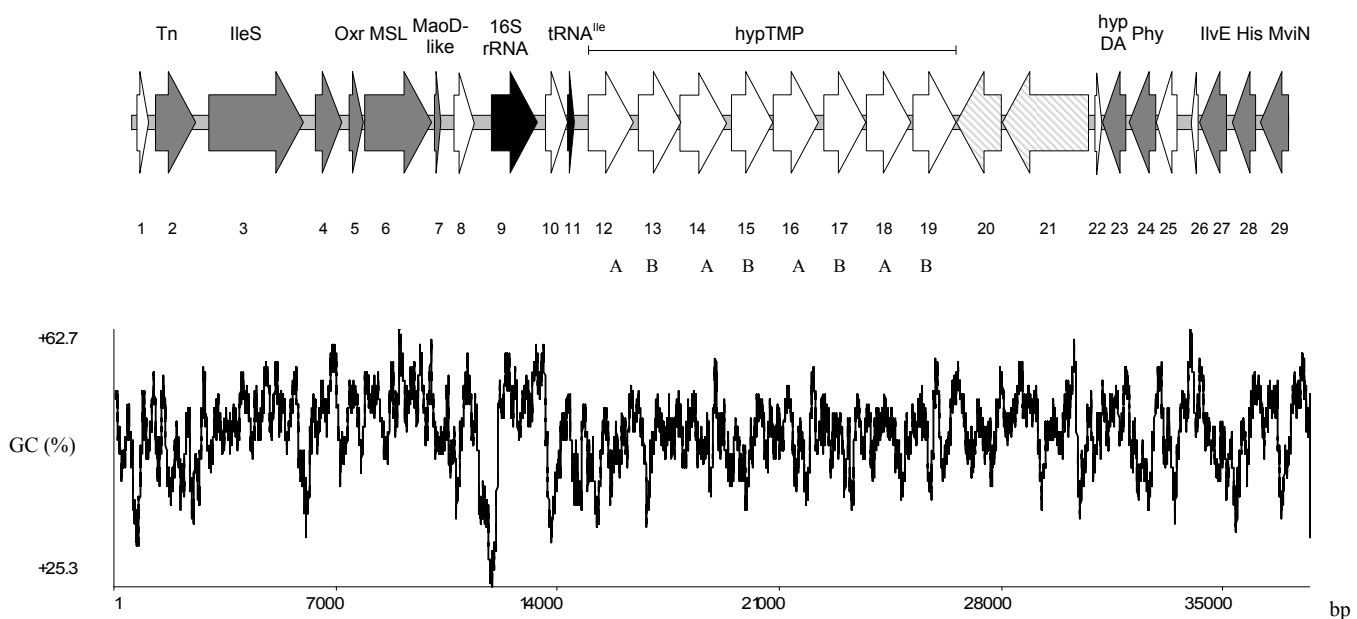
### 4.3.1 Anotation der „open reading frames“ (ORFs)

Die Sequenz des poribakteriellen Genomfragments umfasst 38784 bp mit einem durchschnittlichen GC Gehalt von 50,5%. Über das gesamte Fragment sind keine Variationen innerhalb des GC Gehaltes festzustellen. Insgesamt wurden 29 „open reading frames“ (ORFs) identifiziert. Davon konnten 13 funktionell annotiert werden. 13 ORFs besitzen Homologien zu konserviert hypothetischen Proteinen, während die ORFs 1, 8, 10, 22, 25 und 26 keine signifikanten Ähnlichkeiten zu in öffentlichen Datenbanken abgelegten kodierenden Sequenzen zeigten und daher hypothetische Proteine repräsentieren. Neben den

proteinkodierenden ORFs befinden sich auf diesem genomischen Fragment zwei RNA kodierende Gene. Der kodierende Bereich dieses DNA Fragmentes nimmt insgesamt 86,1% der Sequenz ein. Tabelle 2 fasst die Charakteristika dieses genomischen poribakteriellen Fragments allgemein zusammen. Die Orientierung der identifizierten ORFs ist in Abbildung 20 graphisch dargestellt, während Tabelle 3 deren Annotation wiedergibt.

**Tabelle 2** Allgemeine Charakteristika des poribakteriellen Metagenomklons (64K2).

Größe	GC-Gehalt	kodierender Bereich	ORFs	rRNA	tRNA	Hypothetische Proteine	Konserviert hypoth. Proteine	Bekannte Proteine	Orthologe in <i>R. baltica</i>
38784 bp	50,5%	86,1%	29	16S	tRNA <sup>Ile</sup>	6	13	8	2



**Abbildung 20** Die physikalische Genkarte des poribakteriellen genomischen Fragments (64K2) stellt die Orientierung der identifizierten ORFs dar. RNA kodierende Gene sind schwarz, funktionell annotierte ORFs grau und unbekannte ORFs weiß dargestellt; schraffierte ORFs: Orthologe in *R. baltica*. Die Nummerierung der ORFs ist Tabelle 4 entsprechend angegeben. A, B: paraloge Gruppen der ORFs 12-19. Im unteren Teil zeigt ein GC-Plot die Verteilung des GC-Gehaltes über das gesamte Fragment.

**Tabelle 3** Identifizierte RNA kodierende Gene und „open reading frames“ (ORF) des poribakteriellen genomischen Fragments 64K2.

entsp. Größe [aa]: entsprechende Größe des kodierten Proteins [Aminosäuren]; Genprodukt und Organismus: Homolog mit höchster Übereinstimmung nach „BlastP“-Analyse; Größe [aa]: Größe des homologen Proteins [Aminosäuren], + Größe in Basen. Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

ORF	Lokus	entsp. Größe [aa]	Genprodukt, COG	Organismus	Accession Nr.	Größe [aa]	Identität [%]	E-Wert	Bemerkungen
1	115 – 486	124	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
2 (Tn)	725– 2077	451	Transposase und inaktivierte Derivate, COG3385	<i>Nostoc punctiformis</i> ; ( <i>Cyanobacteria</i> )	ZP_00111913	446	49	e-125	Palindrom: 705 – 726, 2158 – 2184 (21bp)
3 (IleS)	2524 – 5703	1060	Isoleucyl-tRNA Synthetase, COG0060	<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824; ( <i>Firmicutes</i> )	NP_349638	1035	45	0.0	-
4 (OxrM)	6125– 7000	292	aerobe CO Dehydrogenase mittlere Untereinheit, COG1319	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021; ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_436362	286	39	2e-42	Kofaktoren: Molybden, FAD (Flavoprotein), 2Fe2S (Ferredoxin)
5 (OxrS)	7250– 7723	158	aerobe CO Dehydrogenase kleine Untereinheit, COG2080	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099; ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_103667	158	68	3e-53	Struktur: Hexamer
6 (OxrL)	7769– 10021	751	4-Hydroxybenzoyl-CoA Reduktase große Untereinheit, COG1529	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099; ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_103666	754	47	0.0	Energiegewinnungsprozesse
7 (M)	10244– 10522	93	QbsE, COG1977	<i>Pseudomonas fluorescens</i> ; ( <i>Gammaproteobacteria</i> )	AAL65287	90	37	2e-08	MoaD-like protein Coenzym Transport und Metabolismus
8	19769 – 11461	231	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
9 (16S rRNA)	12035– 13581	1547 <sup>+</sup>	16S rRNA	-	-	-	-	-	geteiltes <i>rrn</i> Operon
10	13858– 14607	250	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
11 (tRNA-Ile)	14722– 14795	74 <sup>+</sup>	tRNA-Ile	-	-	-	-	-	tRNA-Isoleucin
12 (hypTMP)	15300– 16802	501	NosY, COG1277	<i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099; ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_435892	275	28	3e-09	ORF12-19: Konserviert hypothetische Transmembran-proteine,
13 (hypTMP)	16980 – 18407	476	<i>gll1302</i> , COG1277, COG1668	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC7421; ( <i>Cyanobacteria</i> )	BAC89243	494	26	2e-08	Gruppierung spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, zwei
14 (hypTMP)	18376– 19938	521	NosY, COG1277, COG1668	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_435892	275	25	2e-07	paraloge Gruppen A und B sind



15 (hypTMP)	20117 – 21511	465	NosY COG1277, COG1668, COG0842	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_435892	275	33	2e-07	alternierend angeordnet
16 (hypTMP)	21518 – 23041	508	PH0865, COG1277, COG1668	<i>Pyrococcus hirokoshii</i> ; ( <i>Euryarchaeota</i> )	NP_142795	322	25	4e-08	COG1277: ABC-Typ Transport-system, Permease
17 (hypTMP)	23217 – 24641	475	gll1303, COG1277, COG1668, COG0842	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC7421; ( <i>Cyanobacteria</i> )	BAC89244	472	26	7e-08	COG1668: ABC-Typ Na <sup>+</sup> efflux Pumpe, Permease
18 (hypTMP)	24651– 26141	497	NosY, COG1277, COG1668	<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021 ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_435892	275	30	1e-08	COG0842: ABC-Typ “multidrug” Transportsystem, Permease
19 (hypTMP)	26217 – 27768	484	putative NosY, COG1277, COG1668, COG0842	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009; ( <i>Alphaproteobacteria</i> )	NP_947409	275	36	9e-09	COG0842: ABC-Typ “multidrug” Transportsystem, Permease
20	29192 – 27787	502	Konserviert Hypothetisches Protein RB2170	<i>Rhodopirellula baltica</i> ; ( <i>Planctomycetes</i> )	NP_864781	493	64	0.0	Othologe in <i>R. baltica</i> Hypothetische Sulfatase
21	32130 – 29346	965	Konserviert Hypothetisches Protein RB6511	<i>Rhodopirellula baltica</i> ; ( <i>Planctomycetes</i> )	NP_867307	1002	31	e-118	Othologe in <i>R. Baltica</i> Hypothetisches Signalpeptid
22	32552 – 32649	66	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
23 (hypDa)	33385– 32600	262	Xylanase/Chitin Deacetylase COG0726	<i>Leptospira interrogans</i> serovar Lai str. 56601; ( <i>Spirochaetes</i> )	NP_714641	476	32	3e-10	Polysaccharid Deacetylase, pfam01522
24 (PhyH)	34382 – 33495	296	Konserviert Hypothetisches Protein SAV2991, COG5285	<i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680; ( <i>Actinobacteria</i> )	NP_824167	311	26	2e-11	COG5285: Biosynthese, Transport und Katabolismus von Sekundärmetaboliten pfam05721: PhyH, Phytanoyl-CoA Dioxygenase
25	35099 - 34407	231	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
26	35863 - 35693	57	Hypothetisches Protein	-	-	-	-	-	Spezifisch für unkultiviertes Poribakterium, unbekannt
27 (IlvE)	36768– 35869	300	Aminotransferase, COG0115	<i>Arabidopsis thaliana</i> ; ( <i>Eukaryota</i> )	NP_568496	559	56	8e-94	COG0115: Aminosäuretransport und -metabolismus (pfam01063)
28 (HisF)	36971– 37747	259	Imidazolglycerol-Phosphat Synthase, COG0107	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> ; ( <i>Deltaproteobacteria</i> )	ZP_00129602	259	64	4e-87	COG0107: Aminosäuretransport und -metabolismus, pfam00977: Histidin Biosyntheseprotein
29 (MviN)	37913– 38784	319	Konserviert Hypothetisches Membranprotein, COG0728	<i>Photorhabdus luminescens</i> ( <i>Gammaproteobacteria</i> )	NP_929352	511	35	4e-24	Hypothetischer Virulenzfaktor, nur partieller ORF

### *Nachweis eines geteilten rrn Operons*

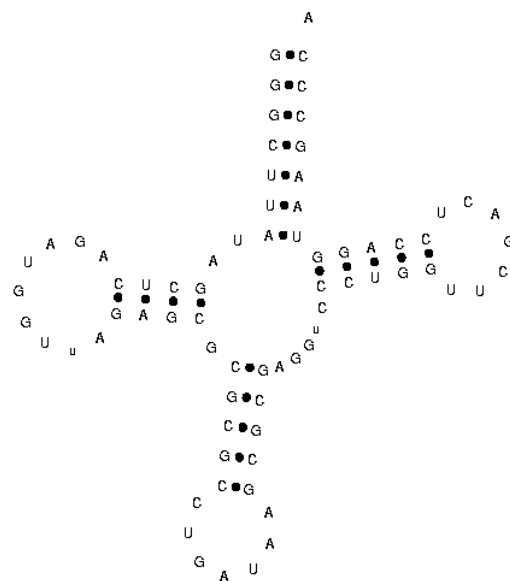
Konventionelle bakterielle *rrn* Operone kodieren neben der 16S rRNA alle weiteren rRNAs (23S rRNA- und 5S rRNA), welche für die Bildung eines funktionstüchtigen Holoribosoms benötigt werden. Zuzüglich zu rRNA Genen befinden sich in diesen Operonen ein oder mehrere tRNA Gene (Hill 1999). Das Candidatus Phylum *Poribacteria* ist durch ein 16S rRNA Gen charakterisiert, welches nicht in einem konventionellen *rrn* Operon lokalisiert ist. Das *rrn* Operon ist geteilt, da das 16S rRNA Gen nicht in Assoziation mit einem 23S rRNA- und 5S rRNA Gen vorkommt. In der Nähe der 16S rRNA wird zwar eine tRNA<sup>Ile</sup> kodiert, jedoch liegt der ORF 10 zwischen diesen beiden Genen, sodass die RNA kodierenden Gene nicht direkt miteinander assoziiert sind (Abbildung 20). Die typische Kleeblattstruktur der identifizierten tRNA mit dem Anticodon GAU ist in Abbildung 21 wiedergegeben.

Ein Vergleich zwischen 64K2 mit 16S rRNA kodierenden Loci aus Organismen, bei denen ebenfalls ein geteiltes *rrn* Operon vorliegt, lieferte keine Gemeinsamkeiten bezüglich des genomischen Kontextes. Eine synthetische Genorganisation konnte an diesen Loci nicht identifiziert werden. Die entsprechenden Loci stammen von *Rhodopirellula baltica* (früher *Pirellula* sp.1, Bacteria, *Planctomycetes*, ein 16S rRNA Gen), *Thermus thermophilus* (Bacteria, *Deinococcus-Thermus*, zwei 16S rRNA Gene an unterschiedlichen Loci), *Buchnera aphidicola*, Endosymbiont von Aphiden (Bacteria, *Gammaproteobacteria*, ein 16S rRNA Gen), *Wolbachia*, Endosymbiont von *Drosophila melanogaster* (Bacteria, *Alphaproteobacteria*, ein 16S rRNA Gen) und *Thermoplasma acidophilum* (Archaea, *Euryarchaeota*, ein 16S rRNA Gen) (Glöckner et al. 2003, Henne et al. 2004, Tamas et al. 2002, Wu et al. 2003, Ruepp et al. 2000). Diese Genomsequenzen sind zugänglich über den Internet Server <http://www.ncbi.nih.gov/genomes/>.

Die vollständige Sequenz des 16S rRNA Gens erlaubt eine Gegenüberstellung von Signaturregionen mit den Sequenzen standardgemäß verwendeter Oligonukleotide, welche für die Amplifikation von 16S rRNA Genen zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität eines Habitats oder als FISH Sonde eingesetzt werden. Die Sequenzvergleiche machen deutlich, dass innerhalb poribakterieller 16S rRNAs Punktmutationen an diesen Regionen stattgefunden haben (Tabelle 4).

**Tabelle 4** Sequenzvergleich von Signaturnukleotiden bakterieller 16S rRNAs (EUB, Lane 1991, Amann et al. 1995, Muyzer et al. 1998) und der 16S rRNA von *Planctomycetales* (PLA, Neef et al. 1998) mit den entsprechenden Regionen des 16S rRNA Gens der *Poribacteria*. Unterschiede innerhalb dieser Signaturregionen sind jeweils grau unterlegt. \*: Nummerierung nach *E. coli* 16S rRNA; mm: „mismatch“; „gaps“: Lücken.

	16S rRNA Position*	Sequenz 5' - 3'	mm
EUB27f		GAGTTTGAT-CCTGGCTCA	2
<i>Poribacteria</i>	27-45	G-GTATGATA <sup>ACC</sup> -GGCTCA	2 gaps
PLA46		GGATTAGGCATGCAA	-
<i>Poribacteria</i>	46-63	GGATTAGGCATGCAA	
EUB341		CCTACGGGAGGCAGCAG	1
EUB338I		ACTCCTACGGGAGGCAGC	1
EUB338II		ACACCTACGGGTGGCTGC	1
EUB338III		ACACCTACGGGTGGCAGC	3
<i>Poribacteria</i>	338-358	ACT <sup>CCTACGGGAGGCT</sup> GCAG	
PLA886		GGGAGTATGGTCGCAAGGC	3
<i>Poribacteria</i>	886-904	GGGAGTAC <sup>GGCCGCAAGGT</sup>	
EUB907		AAACTCAAAMGAATTGACGG	2
<i>Poribacteria</i>	907-927	AAACTCAAG <sup>GTAATTGACGG</sup>	
EUB1390		CGGGCGGTGTCTACAA	-
<i>Poribacteria</i>	1390-1406	CGGGCGGTGTCTACAA	
EUB1492		TACGGCTACCTTGTTACGACTT	-
<i>Poribacteria</i>	1492-1514	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	



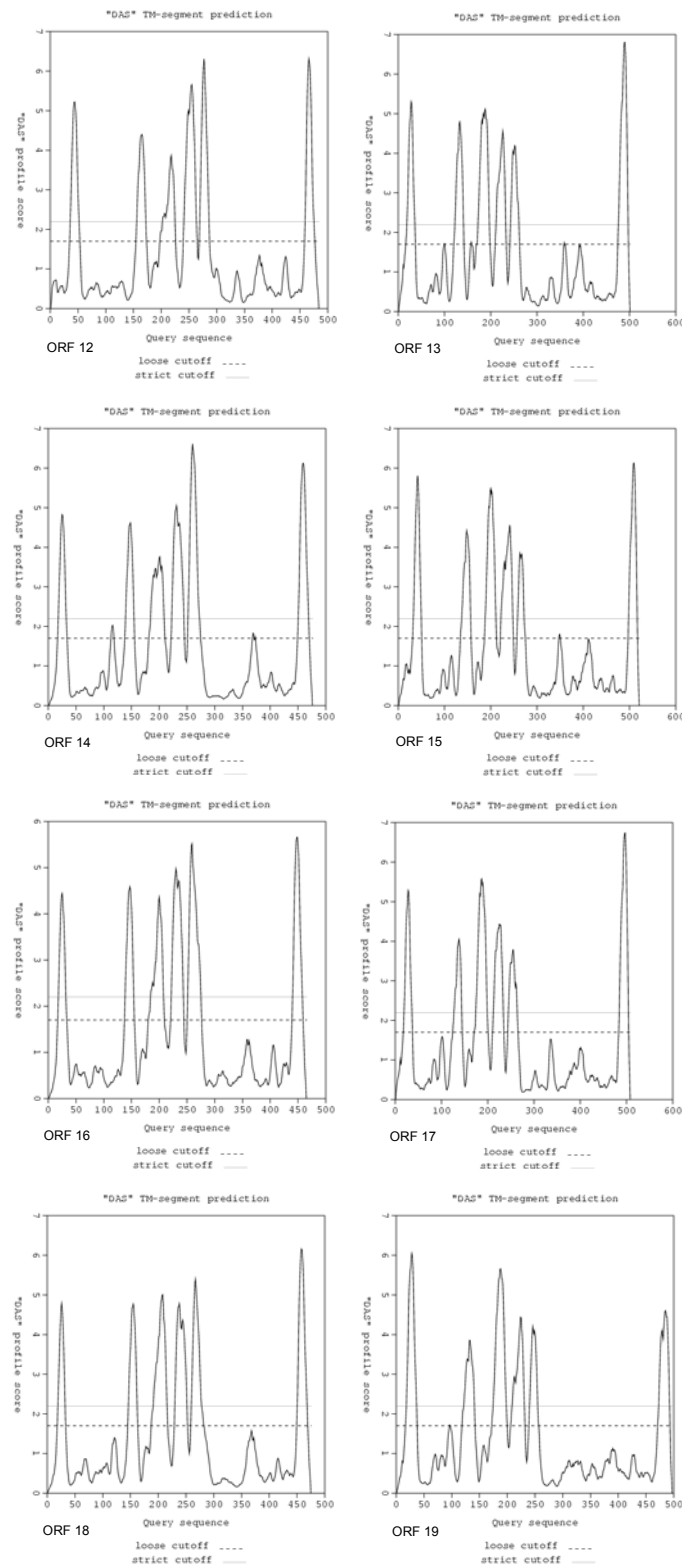
**Abbildung 21** *In silico* identifizierte tRNA<sup>Ile</sup> (Anticodon GAU).

#### *Orthologe ORFs in Rhodopirellula baltica*

Signifikante Homologien zu einer Gruppe von jeweils 30 hypothetischen Proteinen aus *Rhodopirellula baltica* konnten für die ORFs 20 und 21 identifiziert werden. In BlastP Analysen für ORF 20 variierten die entsprechenden E-Werte zwischen 0.0 und  $7e^{-84}$ , während die Identität auf Aminosäureebene zwischen 64% und 37% lag. Für ORF 21 variierten die E-Werte in BlastP Analysen zwischen  $e^{-122}$  und  $4e^{-53}$ , die Identität variierte auf Aminosäureebene zwischen 46% und 32%. Die Mehrzahl der orthologen Proteine konnte in *R. baltica* nicht funktionell annotiert werden und zeigte darüber hinaus keine Ähnlichkeiten zu katalogisierten COG Gruppen oder konservierten Domänen (Glöckner et al. 2003). Einige Orthologe von ORF 20 scheinen putative Sulfatasen zu kodieren. Orthologe von ORF 21 besitzen hypothetische Transmembrandomänen beziehungsweise hypothetische Signalpeptide. Experimentelle Daten der orthologen Proteine aus *R. baltica* liegen bisher nicht vor. Die ORFs von 25 der 30 identifizierten orthologen Sets aus *R. baltica* liegen in der gleichen Tandemstruktur vor wie die ORFs 20 und 21 des poribakteriellen genomischen DNA Fragments (Abbildung 20). Der jeweilige genomische Kontext der kodierenden Bereiche ist in keinem Fall identisch. *In silico* Analysen machen deutlich, dass die entsprechenden Proteine bisher einzigartig für *R. baltica* und Vertreter der *Poribacteria* zu sein scheinen.

### *Putative Transmembranproteine*

Der Metagenomklon 64K2 kodiert eine Gruppe von acht putativen Transmembranproteinen, von denen jedes jeweils sechs alpha-helikale Transmembrandomänen besitzt (ORFs 12-19, hypTMP). Abbildung 22 zeigt die Lokalisation der Transmembrandomänen nach „DAS transmembrane prediction“-Analyse (Cserzo et al. 1997). Eine 30prozentige Ähnlichkeit auf Aminosäureebene zu Proteinen aus *Mesorhizobium loti* (*Alphaproteobacteria*), *Xanthomonas campestris* (*Gammaproteobacteria*) und *Gloeobacter violaceus* (*Cyanobacteria*) konnte via Blast Analysen nachgewiesen werden. In diesen Organismen ist die genomische Region der kodierenden Gene bisher noch nicht ausreichend charakterisiert worden. Weder liegt eine synthetische Genorganisation vor, noch eine Gruppierung der entsprechenden ORFs wie bei dem genomischen Fragment des unkultivierten Poribakteriums. Die putativen Transmembranproteine zeigen geringe Homologien zu ABC-Typ Transporter Permeasen. Aufgrund von Sequenzalignments konnten diese Proteine in zwei paraloge Gruppen A und B unterteilt werden, welche auf 64K2 alternierend angeordnet sind (Abbildung 20). Untereinander sind die entsprechenden Proteine einer paralogen Gruppe mit bis zu 50% auf Aminosäureebene sehr ähnlich. Ausgehend von Vergleichen mit den Genomsequenzen von *Rhodopirellula baltica*, *Gemmata obscuriglobus* (*Planctomycetes*), *Verrucomicrobium spinosum* (*Verrucomicrobia*) und allen zur Zeit verfügbaren chlamydialen Genomen, welche die nächsten phylogenetisch verwandten Abstammungslinien zum Candidatus Phylum *Poribacteria* repräsentieren, scheinen in diesen Organismen keine homologe Proteine vorhanden zu sein. Die Anordnung und jeweils gleiche Orientierung dieser ORFs lässt auf eine Operonstruktur schließen. Vermutlich bilden die kodierten Proteine einen poribacteria-spezifischen, bisher nicht bekannten Transporter, Kanal oder eine Pore.



**Abbildung 22** *In silico* Analyse der ORFs 12-19 (hyp TMP) zeigt die Lokalisation der jeweils sechs detektierten Transmembrandomänen nach „DAS transmembrane prediction“-Analyse. Die Abszisse zeigt die Länge der Aminosäuresequenz, die Ordinate den „profile score“ (Cserzo et al. 1997). Überschreitet dieser einen Schwellenwert, liegt vermutlich innerhalb dieses Sequenzabschnittes eine alpha-helikale Transmembrandomäne vor.

### *Charakterisierung weiterer ORFs*

Das poribakterielle genomische Fragment kodiert darüber hinaus ein MaoD-ähnliches Protein (ORF 7). MaoD ist ein Molybdän Konvertierungsfaktor, der in seiner aktiven Form mit MaoE dimerisiert (Uniprot accession: P30478; <http://www.ebi.uniprot.org/index.shtml>). 64K2 kodiert allerdings keinen möglichen Bindungspartner für dieses Protein. Weiterhin wird eine Isoleucin tRNA Synthetase (ORF 3, IleS) und eine Transposase (ORF 2, Tn) kodiert. Die flankierenden Regionen der Transposase besitzen eine palindromische Wiederholungssequenz von jeweils 21 bp an den Positionen 705 – 726 und 2158 – 2184. Am 5' Ende liegt sie 77 bp vom Startcodon entfernt, am 3' Ende 3 bp vom Stopcodon. Diese genomische Organisation deutet auf ein IS Element hin. Im 3' Bereich des poribakteriellen genomischen Fragments sind Proteine des Primär-, und Sekundärmetabolismus kodiert (ORFs 23, 24, 27, 28 und 29). Die Annotation dieser ORFs ist ebenfalls Tabelle 3 zu entnehmen.

### **4.3.2 *In silico* Detektion einer Molybdän enthaltenen Oxidoreduktase (MOCO)**

Ein Oxidoreduktase kodierendes Gencluster konnte auf 64K2 nachgewiesen werden (ORFs 4-6, *oxrMSL*), das aus drei ORFs besteht, welche direkt hintereinander angeordnet sind. Diese Anordnung der Untereinheiten-kodierenden Gene ist bei Molybdän enthaltenen Oxidoreduktasen im allgemeinen sehr konserviert. Abbildung 24 zeigt neben einer phylogenetischen Analyse der homologen MOCO Oxidoreduktasen die Organisation der entsprechenden Gene in den jeweiligen Organismen. Der genomische Kontext der homologen Proteine ist jeweils sehr variabel. Die phylogenetische Analyse verdeutlicht einen besonderen Status der poribakteriellen Oxidoreduktase. Homologe Enzyme, die jeweils ähnliche Reaktionen katalysieren, sind in entsprechende funktionelle Gruppen zusammengefasst. Die poribakterielle MOCO Oxidoreduktase wird bei jeweils allen angewandten Algorithmen zusammen mit einer Gruppe von Sequenzen gruppiert, welche Venter et al. (2004) aus dem Metagenom der „Sargasso Sea“, einem marinen Habitat, kloniert haben. Weitere homologe Proteine dieses Clusters stammen von *Mesorhizobium loti* und *Sinorhizobium meliloti*. Experimentelle Daten zu den Oxidoreduktasen dieses Clusters liegen nicht vor.

Die Molybdän Kofaktor Bindestellen und das Aminosäuremotiv des aktiven Zentrums der großen Untereinheit (*oxrL*) wurde mit denen homologer Enzyme verglichen (Abbildung 25, nach Hänzelmann et al. (2000)). Die Sequenz der Kofaktorbindemotive scheint bei den großen Untereinheiten dieser Oxidoreduktasen konserviert zu sein. Auffällige Unterschiede in einzelnen Aminosäuren des aktiven Zentrums sind nach Aminosäuresequenzalignments deutlich zu erkennen. Im Fall der poribakteriellen Oxidoreduktase ist ein konserviertes Alanin

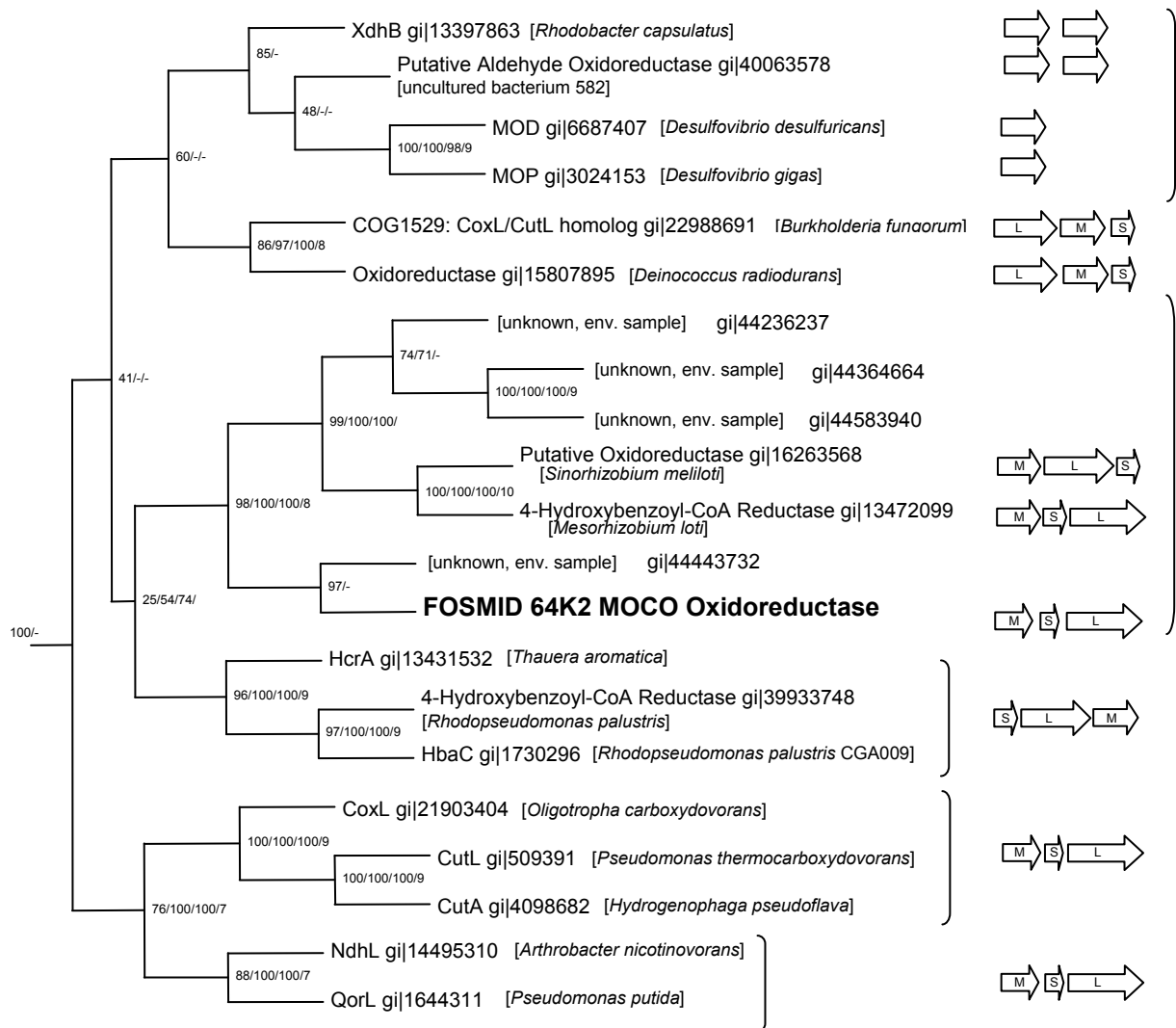
durch Prolin ersetzt worden. Dieser Aminosäureaustausch scheint einzigartig für die poribakterielle Oxidoreduktase zu sein.

Die kleine Untereinheit (oxrS) scheint ein Ferredoxin zu sein. Alle charakteristischen Cysteinreste, welche für die Ausbildung zweier hoch konservierter Redoxzentren [2Fe-2S] notwendig sind, sind vorhanden (Typ I:  $^{43}\text{Cx}_4\text{Cx}_2\text{Cx}_{11}\text{C}^{63}$ ; Typ II:  $^{102}\text{Cx}_2\text{Cx}_2\text{G}^{108}$  und  $^{137}\text{Cx}\text{C}^{139}$  (Abbildung 23). Die mittlere Untereinheit (oxrM) der poribakteriellen Oxidoreduktase repräsentiert ein Flavoprotein, welches zwei charakteristische FAD Bindemotive,  $^{30}\text{AGGT}^{34}$  und  $^{110}\text{GVGGN}^{114}$ , besitzt. Die FAD Bindemotive sowie weitere charakteristische Sequenzmotive der mittleren Untereinheit sind in den Abbildung 26 und 27 wiedergegeben. Sequenzvergleiche und Alignments der mittleren und kleinen Untereinheiten wurden in Anlehnung an Gibson et al. (1997) und Breese und Fuchs (1998) durchgeführt.

<b>[2Fe2S] Motiv</b>	
Konsensus	GC TG CGACTVLVDGR V SCL
<b>64K2 OxrS</b>	42 GCNNGNCGACSVILDGRLVNSCL 64
Konsensus	ALQCGFCTPGMIM
<b>64K2 OxrS</b>	99 ALQCGICTPGFIM 111
Konsensus	LAGNLCRCTGY
<b>64K2 OxrS</b>	132 LAGNLCRCTGY 142

**Abbildung 23** Vergleichende Gegenüberstellung des „Konsensus-Aminosäuresequenz“ der [2Fe2S]-Motive von Ferredoxinen mit der kleinen Untereinheit der MOCO Oxidoreduktase des Metagenomklons 64K2 (OxrS).





**Abbildung 24** Phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen der großen Untereinheiten von MOCO Oxidoreduktasen nach automatischem „clustalX“ Alignment. „Bootstrap“-Werte sind jeweils für Max. Likelihood-/Max. Parsimony-/Neighbor-Joining-/UPGMA-Analysen angegeben.

Enzym	gi Nummer	aktives Zentrum	Motiv I	Motiv II
CutL	509391	381 VAYRCSFR 388	265 GGGFG 269	522 QGQGHQTT 529
CoxL	21903404	378 VAYRCSFR 385	268 GGGFG 272	528 QGQGHETT 535
QorL	1644311	369 -AYR-GVG 374	252 GGGFG 256	506 SGQGHETT 513
NdhC	14495310	370 -AFR-GVG 375	254 GGGFG 258	505 QGQGHQTT 512
HcrA	13431532	356 -AMR-GHG 361	242 GGGFG 246	481 IGQGSNTM 488
HbaC	1730296	356 -AMR-GHG 361	242 GGGFG 246	480 IGQGSSTV 487
MOP	3024153	531 -AFR-GYG 536	418 GGTFG 422	653 HGQGADIG 660
MOD	6687407	533 -AFR-GYG 538	420 GGTFG 424	655 HGQGADAG 662
XdhB	13397863	340 -AFR-GFG 345	225 GGGFG 229	488 MGQGLHAK 495
unknown	44443732	257 -AYR-APG 262	147 GGGFG 151	370 IGSSRTA 376
unknown	44364664	208 -AYR-APG 213	98 GGGFG 102	320 IGSSRAS 326
unknown	44583940	364 -AYR-APG 369	254 GGGFG 258	476 IGSSRAS 482
unknown	44236237	364 -AYR-APG 369	252 GGGFG 256	476 IGSSRAS 482
put. CoxL	13472099	257 -AYR-APG 262	258 GGGFG 262	480 VGGSRAS 486
put. CoxL	16263568	428 -AYR-APS 433	318 GGGFG 322	540 VGGSRAS 546
<b>64K2 OxrL</b>		370 -EYR-APG 375	260 GGGFG 260	483 IGGGFG 487

Enzym	gi Nummer	Motiv III	Motiv IV	Motiv V
CutL	509391	561 TYGSRST 567	680 CGTRINPMIEGO 692	752 AKGVAE 757
CoxL	21903404	567 TYGSRST 573	686 CGTRINPMIEGO 698	758 AKGVAE 763
QorL	1644311	544 AYASRGA 550	666 CGTMINPMIVEGO 678	738 IKGMGE 743
NdhC	14495310	544 TIGSRAA 550	666 CGVIINPTIVEGO 678	738 VKGMGE 743
HcrA	13431532	520 SYSSRVT 526	650 VGKALNPLAVEGO 662	721 AKEASE 726
HbaC	1730296	519 AYSSRIT 525	648 CGRAINPLAVVGO 660	721 DKEASE 726
MOP	3024153	695 SGGSRQQ 701	795 LGSLCNQLATDGO 807	864 ASGVGE 869
MOD	6687407	697 AGGSRSQ 703	795 IGKICNKLVDGO 807	864 ASGVGE 869
XdhB	13397863	527 TAASSGA 533	651 AGASLNPAIDGO 663	725 SKAVGE 730
unknown	44443732	408 TGGSRTA 514	523 VGFPAPHSYVEGO 535	594 LRGVGE 599
unknown	44364664	358 TDGSRVT 364	476 AGKAIHPSYVEGO 488	547 VRGVGE 552
unknown	44583940	514 TDGSRVT 520	632 AGKAIHPSYVEGO 644	703 VRGVGE 708
unknown	44236237	514 THGSRAT 520	632 AGRAIHPSYVEGO 644	703 VRGVGE 708
put. CoxL	13472099	518 TDGSRGT 524	636 AGKAVHPTYVEGO 648	707 VRGVGE 712
put. CoxL	16263568	578 TDGSRGT 584	696 AGKAVHPTYVEGO 708	767 VRGVGE 772
<b>64K2 OxrL</b>		521 TGGSRIT 527	636 AGRAIHPSYVEGO 648	707 VRGVGE 712

**Abbildung 25** Vergleichende Gegenüberstellung charakteristischer Sequenzmotive (aktives Zentrum und Kofaktor Bindemotive) der großen Untereinheiten von MOCO Oxidoreduktasen (nach Hänzelmann et al. 2000).

Enzym	gi Nummer	FAD Bindemotiv I	FAD Bindemotiv II
CutB	509389	32 AGGH 35	111 TIGGD 115
CutM	10835788	32 AGGH 35	111 TIGGD 115
CoxM	21903405	32 AGGH 35	111 TIGGN 115
QorM	1644309	31 AGGQ 34	110 TLGGS 114
NdhM	25169118	31 AGGQ 34	110 TLGGS 114
Oxr.M	33571434	32 AGGQ 35	111 TIGGS 115
Put. CoxM	13472101	27 AGGS 30	106 TITGN 110
Put. CoxM	16263569	27 AGGS 30	106 TIVGN 110
CoxM/CutM homolog	45514224	13 AGGT 16	93 TVVGN 97
CoxM/CutM homolog	23053774	37 AGGT 40	117 TVGGN 121
XdhA	26249280	30 AGGT 33	110 TYGGN 114
CoxM/CutM homolog	46112731	30 AGGT 33	110 TIGGN 114
unknown	44236240	30 AGGT 33	107 TIVGN 111
unknown	44237368	30 AGGT 33	109 GFVGN 113
unknown	44429019	30 AGGT 33	110 SLGGN 114
unknown	44583942	30 AGGT 33	106 TMVGN 110
<b>64K2 OxrM</b>		30 AGGT 33	110 GVGGN 114

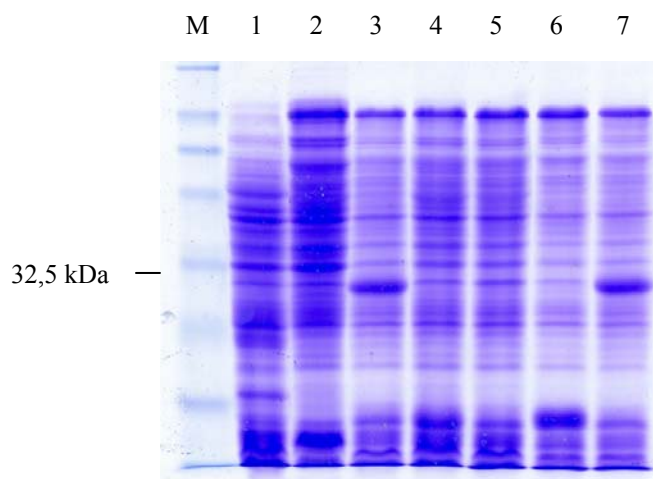
**Abbildung 26** Vergleichende Gegenüberstellung der FAD Bindemotive der mittleren Untereinheiten von MOCO Oxidoreduktasen.

Enzym	gi Nummer	I	II	III
CutB	509389	143 GER-X <sub>19</sub> -E 165	188 RKTGDWATAG 197 212	APIALTNVAPT 222
CutM	10835788	143 GRR-X <sub>19</sub> -E 165	188 RKTGDWATAG 197 212	IRIALTNVAPT 222
CoxM	21903405	143 GAR-X <sub>19</sub> -E 165	188 RKIGDYATAA 194 212	ASIGLTVANT 222
QorM	1644309	142 GVR-X <sub>19</sub> -E 164	188 ---GDYALVM 194 209	ARIALGAVEER 219
NdhM	25169118	142 GRR-X <sub>19</sub> -E 164	186 R-SGDYGLAN 194 209	VRIAVGGAVGK 219
Oxr.M	33571434	143 GER-X <sub>19</sub> -E 165	188 RKAGEFAEAS 197 209	ARIAVGALDGA 219
Put. CoxM	13472101	138 GKR-X <sub>19</sub> -E 160	184 RTEMDIAVVS 193 209	ARVALGAAAPT 219
Put. CoxM	16263569	138 GSR-X <sub>19</sub> -E 160	184 RTEMDIAVVS 193 209	ARVALGAAAPT 219
CoxM/CutM Homolog	45514224	125 GSR-X <sub>19</sub> -E 147	171 RVQMEIATVG 180 195	ANIVLAAVGPT 205
CoxM/CutM Homolog	23053774	149 GER-X <sub>19</sub> -E 171	194 RRSALAVVG 203 218	VRIVLASAAPT 228
XdhA	26249280	142 GVR-X <sub>19</sub> -E 164	189 RDAMIDSTIG 198 213	LRLAFGVAAPT 223
CoxM/CutM Homolog	46112731	142 GQR-X <sub>19</sub> -E 164	189 RRAMDIALTG 198 214	VRIGLGVAGPT 224
unknown	44236240	139 GER-X <sub>19</sub> -E 161	185 RTEMDIAVVG 194 209	ARVALGAVAPT 219
unknown	44237368	141 GTR-X <sub>19</sub> -E 163	187 RNEMDIAVAA 196 212	ARIALASVGPT 222
unknown	44429019	142 GKR-X <sub>19</sub> -E 164	188 RTEMDIAVVG 197 212	ARVALGAVAPT 222
unknown	44583942	138 GER-X <sub>19</sub> -E 160	184 RTEMDIAVVS 193 209	AKVVLGAVAPT 219
<b>64K2 OxrM</b>		142 GER-X <sub>19</sub> -E 164	188 RNEMDIAVVG 197 214	ARIALAAVAPT 224

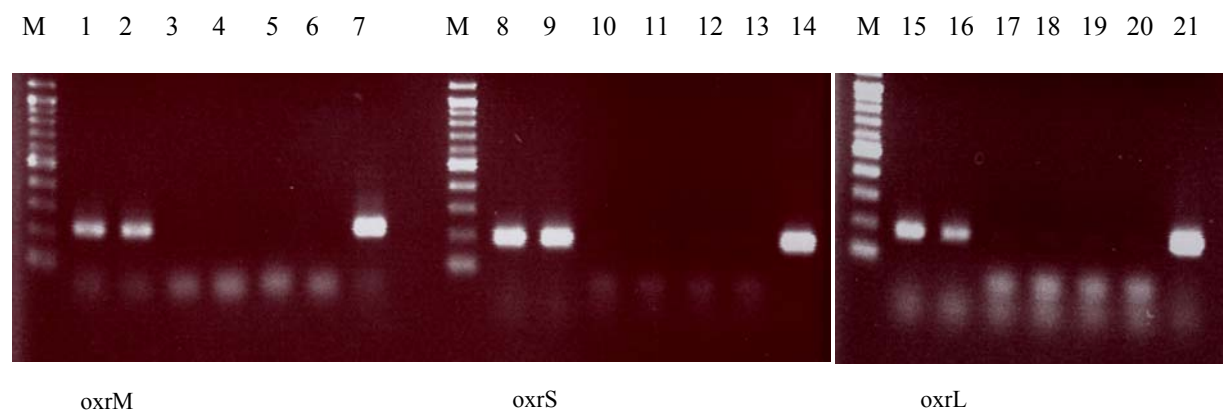
**Abbildung 27** Vergleichende Gegenüberstellung charakteristischer Aminosäuresequenzmotive (I-III) der mittleren Untereinheiten von MOCO Oxidoreduktasen.

### Heterologe Expression der poribakteriellen Oxidoreduktase

Um die poribakterielle Oxidoreduktase für biochemische Analysen verfügbar zu machen, wurde das kodierende Gencluster (*oxrMSL*) in den Expressionsvektor pQE30 „in frame“ vor einen IPTG induzierbaren Promotor kloniert. Die Expression der Oxidoreduktase wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 mittels IPTG für 4 h induziert. Nur die mittlere Untereinheit der Oxidoreduktase (*oxrM*) konnte in *E. coli* M15 exprimiert werden (Abbildung 28). Die kleine und die große Untereinheit (*oxrS* und *oxrL*) wurden nicht erfolgreich exprimiert. Northern-Blot Analysen und RT-PCRs mit jeweils spezifischen Primern für alle drei Untereinheiten deuten allerdings auf eine vollständige polycistronische Transkription des gesamten kodierenden Bereichs hin. Abbildung 29 zeigt die Resultate der RT-PCR.



**Abbildung 28** SDS-PAGE von Gesamtproteinextrakten aus Zellpellets. M: prestained protein marker; 1: DH5alpha; 2: pQE30oxrMSL ohne IPTG (Expression nicht induziert, derselbe Klon wie bei 3), 3-7: Expression mittels IPTG induziert, pQE30oxrMSL.



**Abbildung 29** RT-PCR zur Untersuchung der *oxrMSL* Transkription. M: Marker; 1, 8, 15: pQE30oxrMSL\_3; 2, 9, 16: pQE30oxrMSL\_7; 3-6, 10-13, 17-20: Negativkontrollen DH5alpha, pQE30oxrMSL -IPTG, DNA freie RNA, keine Matrize; 7, 14, 21: Positivkontrollen.

## 4.5 Polyketidsynthesen (PKS)

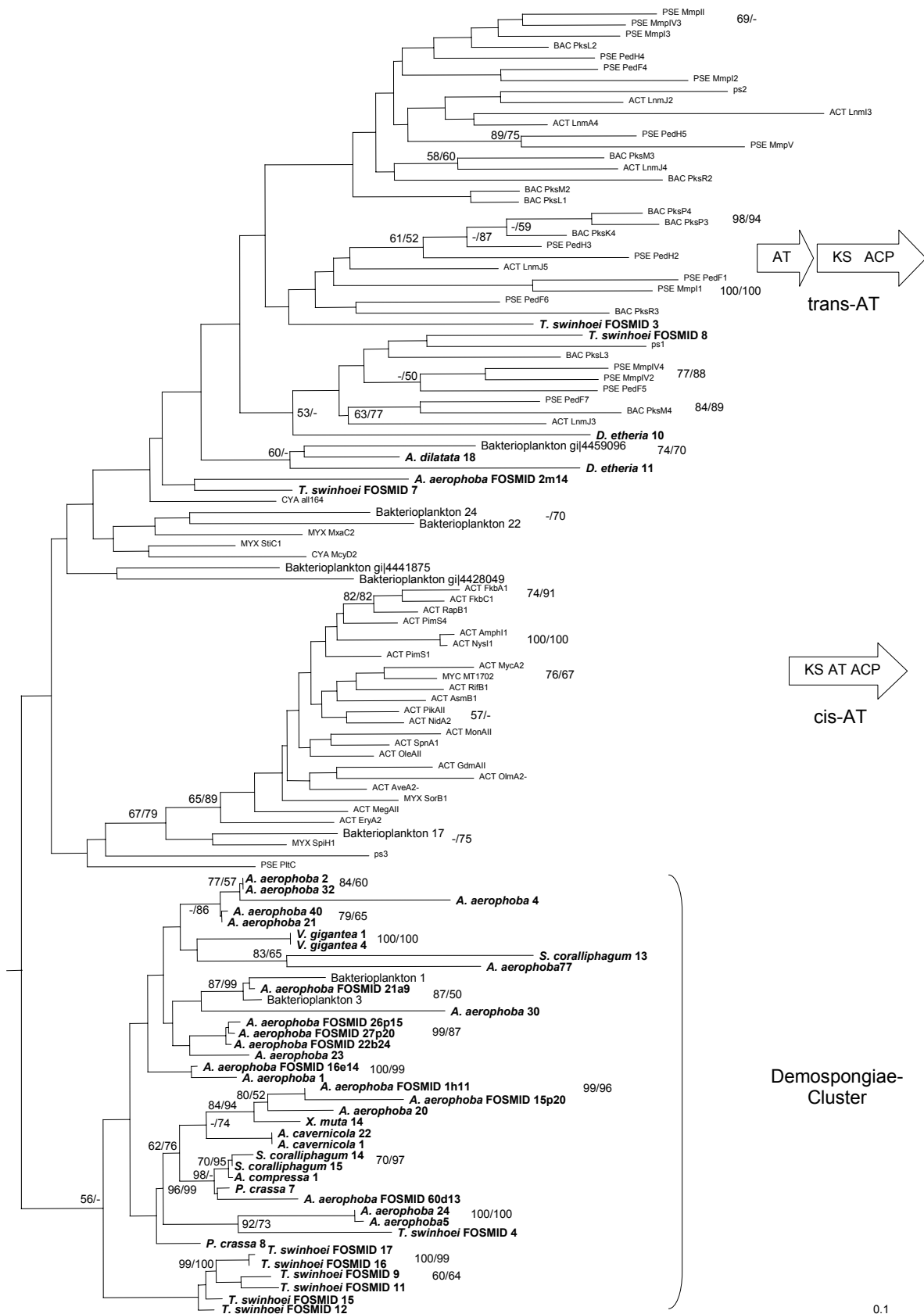
Metagenombanken aus nicht kultivierten mikrobiellen Konsortien stellen eine reichhaltige Quelle an pharmazeutisch interessanten oder biotechnologisch wertvollen Enzymen bzw. Biosynthesegenen dar (Lorenz et al. 2002). Piel et al. (2004a) konnten in einer Metagenombank aus der mikrobiellen Biomasse des marinen Schwammes *Theonella swinhoei* Typ I Polyketidsynthase kodierende Gencluster nachweisen, die klassischen Typ I PKS Systemen nicht zugeordnet werden konnten. Um die Verbreitung dieser PKS Systeme in marinen Demospongiae und im marinen Bakterioplankton zu zeigen, wurden zunächst einfache genomische DNA Präparationen der assoziierten Bakterien aus *A. aerophoba* und DNA Präparationen des marinen Bakterioplanktons via PCR getestet. Dazu wurden degenerierte Primer eingesetzt, welche spezifisch für Aminosäuresequenzmotive der Ketosynthase Domäne (KS) von PKS Systemen sind (Aminosäuremotive DPQQ und HGTG, Tabelle 12, Piel 2002). Die Amplifikation lieferte die erwarteten Reaktionsprodukte von ~750 bp aus beiden untersuchten Proben. Durch RFLP Analysen mittels der Restriktionsendonukleasen *HaeIII* und *AvaI* konnten KS Domänen identifiziert werden, welche nur in DNA Präparationen aus *A. aerophoba* nachgewiesen werden konnten. Von einzelnen Fragmenten der häufigsten Restriktionsmuster aus RFLP Analysen wurde jeweils die DNA Sequenz bestimmt. Darüber hinaus konnten via PCR in der Metagenombank APAE02 acht individuelle PKS Typ I Klone identifiziert werden: 1H11, 2M14, 15P20, 16E14, 21A9, 22B24, 26P15 und 27P20.

### 4.4.1 Phylogenetische Analyse

Die entsprechenden partiellen Ketosynthase (KS) Nukleotidsequenzen der Metagenomklone wurden ermittelt und zusammen mit den partiellen KS-Nukleotidsequenzen aus oben genannten PCR Reaktionen in die entsprechenden Aminosäuresequenzen übersetzt. Anhand von Typ I PKS Referenzsequenzen aus *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*, *Myxococcales*, *Pseudomonadales*, *Bacillus* (Piel et al. 2004a) und Sequenzen aus Metagenomanalysen der Sargasso Sea (marines Bakterioplankton, Venter et al. 2004) wurden KS-Sequenzen aus *A. aerophoba*, *T. swinhoei* und weiteren marinen Demospongiae automatisch via „clustalX“ aligniert. Dazu wurden alle Aminosäuresequenzen auf den gleichen konservierten Bereich der KS-Domäne reduziert. Hypervariable Sequenzregionen und die entsprechenden Bereiche der „Primer-Regionen“ (DPQQ und HGTG) wurden manuell entfernt. Nach dem Alignment wurde ein phylogenetischer Stammbaum der jeweiligen KS-Fragmente mittels

Distanzmatrizen, „Maximum Likelihood“- und „Parsimony“-Algorithmen erstellt. Abbildung 30 zeigt einen Konsensus Stammbaum dieser Analysen. Phylogenetische Analysen der KS Domäne erlauben eine Unterscheidung zwischen cis- und trans-Acyltransferase PKS Systemen, bei denen die Acyltransferase-Domäne (AT) entweder im selben ORF wie die restlichen Domänen (cis-AT), oder in einem separaten ORF kodiert werden (trans-AT) (Piel et al. 2004a).

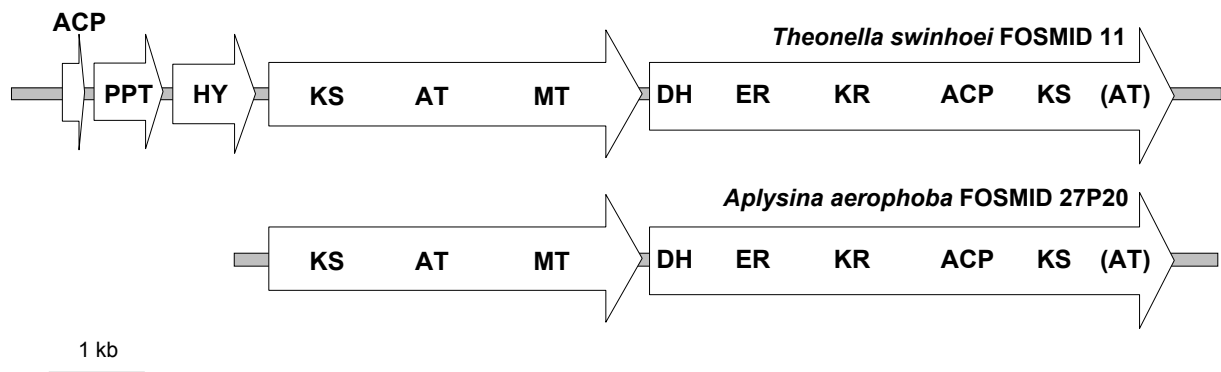
KS-Sequenzen aus den marinen Demospongiae *Aplysina aerophoba* (*Verongida*) (diese Arbeit), *Theonella swinhoei* (*Lithistida*) (J. Piel, MPI Jena (Piel et al. 2004a)), *Aplysina cavernicola*, *Verongula gigantea*, *Pseudoceratina crassa* (jeweils *Verongida*), *Xestospongia muta*, *Siphonodictyon coralliphagum*, *Amphimedon compressa* (jeweils *Haplosclerida*), *Dysidea etheria* (*Dendroceratida*) und *Agelas dilatata* (*Agelasida*) (Schülke 2005) bilden zusammen mit zwei KS-Sequenzen aus Bakterioplankton ein charakteristisches unabhängiges Sequenzcluster, welches weder klassischen cis-AT noch trans-AT PKS Systemen zugeordnet werden kann. Die Bildung dieser Gruppierung war in allen angewandten Algorithmen stabil. Der Metagenomklon 2M14 repräsentiert die einzige KS-Sequenz aus *A. aerophoba*, die wie KS-Sequenzen aus *T. swinhoei* (FOSMIDE 3, 7 und 8), sowie aus *Dysidea etheria* (10, 11) und aus *Agelas dilatata* (18) zu trans-AT PKS Systemen gruppiert werden konnte. Als „Outgroup“ diente für diese Analyse die KS Sequenz des Typ II PKS Systems Act1 ORF1 aus *Streptomyces galilaeus*.



**Abbildung 30** „Maximum Likelihood“-Analyse partieller KS Domänen. „Bootstap“-Werte sind für Distanzmatrix- und „Parsimony“-Analysen angegeben. Die Klammer kennzeichnet das neue PKS Typ I Cluster aus marinen Demospongiae. Outgroup: *aknC*, *Streptomyces galilaeus* Typ II PKS. ACT: *Actinobacteria*, BAC: *Bacillus*, PSE: *Pseudomonadales*, CYA: *Cyanobacteria*, MYX: *Myxococcales*. Weitere Erklärungen im Text. Maßstab: 10% Divergenz.

### 4.3.2 Annotation der PKS Typ I Systeme

Der kodierende Bereich des PKS Systems des Metagenomklons 27P20 aus *A. aerophoba* ist exemplarisch für die neuartigen PKS Typ I Systeme (Demospongiaecluster) vollständig sequenziert worden. Abbildung 31 zeigt die physikalische Genkarte dieses PKS Systems in Gegenüberstellung mit dem PKS System eines Metagenomklons aus der mikrobiellen Biomasse von *T. swinhoei* (FOSMID 11, J. Piel, MPI Jena).



**Abbildung 31** Physikalische Genkarte der PKS Systeme aus Ts11 und 27P20. Domänen: KS: Ketosynthase, AT: Acyltransferase; MT: Methyltransferase; DH: Dehydratase; ER: Enoylreduktase; KR: Ketoreduktase; ACP: „Acetyl Carrier“ Protein. Maßstab: 1 kb.

Im Gegensatz zu herkömmlichen PKS Typ I Systemen ist der kodierende Bereich mit ~10 kb überraschend klein. Die Systeme bestehen nur aus einem einzigen Modul, wo hingegen herkömmliche PKS Typ I Systeme aus mehreren sich wiederholenden Modulen zusammengesetzt sind (Schwarzer und Marahiel 2001). Beide Systeme zeigen einen hohen GC Anteil von 64,3% (*T. swinhoei* FOSMID 11) und 67,9% (*A. aerophoba* FOSMID 27P20) und ein konserviertes homologes Organisationsschema. Die Anordnung der ORFs und der jeweiligen Domänen ist identisch. Aufgrund der Stellung der AT-Domäne sind diese Systeme den cis-AT PKS Systemen zuzuordnen. Auf Aminosäureebene sind beide Fragmente bis zu 70% identisch.



## 4.6 Funktionelle Screens der Metagenombank APAE02

Von den detektierten PKS Typ I positiven Metagenomklonen zeigte keiner eine biologische Aktivität in funktionellen Screens. Diese Untersuchungen umfassten die Detektion proteolytischer, hämolytischer und antimikrobieller Aktivität. Außerdem wurde nach einer Überexpression von Siderophoren gescreent. Proteolytische, antimikrobiell aktive oder siderophor-überproduzierende Klone konnten darüber hinaus in der Metagenombank APAE02 in keinem Klon identifiziert werden. Hämolytische Aktivität wiesen hingegen zehn Klone auf: 18K23, 22K6, 24A15, 32E16, 38M20, 47P19, 51M22, 61L2, 63N11 und 76C20. Da der Metagenomklon 32E16 die deutlichste und stabilste Aktivität zeigte, wurden einzelne *Bam*HI- und *Sph*I-Restriktionsfragmente in die Klonierungsvektoren „pGEM T easy“ und „pKS Bluescript“ subkloniert. Insgesamt wurden neun *Bam*HI Restriktionsfragmente und sieben *Sph*I Restriktionsfragmente von einer Größe zwischen 0,5-8 kb separat kloniert und die Klone wiederum auf 2% Schafblutagar getestet. Keiner der Subklone zeigte eine hämolytische Aktivität. Eine Bestimmung sämtlicher terminaler Restriktionsfragmentsequenzen lieferte darüber hinaus keine Hinweise auf die mögliche Determinante dieses Phänotyps.

Die Bestimmung terminaler Fosmid-„Insert“-Sequenzen der hämolytischen Metagenomklone wies in 63N11 auf die Klonierung eines hypothetischen Hämolysins hin. Die ansequenzierten 430 b dieses Klons zeigten in Datenbankvergleichen eine 43prozentige Ähnlichkeit zu einem nicht charakterisierten hypothetischen Hämolysin aus *Deinococcus* sp. (43% Identität, E-Wert  $2e^{-22}$ , gi10957427 (NCBI Datenbank)). Eine weitere genotypische und phänotypische Charakterisierung der hämolytischen Metagenomklone wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.



## 5. Diskussion

### 5.1 Mikrobielle Diversität

Mikroorganismen besitzen *per se* einen enormen Anteil an der Aufrechterhaltung sämtlicher Ökosysteme und Stoffkreisläufe der Natur. Sie repräsentieren insgesamt ca.  $4-6 \times 10^{30}$  Zellen und bilden damit die größte „lebende Fraktion“ dieses Planeten (Keller and Zengler 2004). Ungefähr 99% dieser Mikroorganismen konnten bisher nicht kultiviert und daher physiologisch charakterisiert werden, was somit zu einem undeutlichen Verständnis der Stoffkreisläufe in den jeweiligen Habitaten oder den gesamten Ökosystemen führt (Amann et al. 1995). Daher sind neue methodische Ansätze zwingend notwendig, um neue Einblicke in die Biologie dieser Organismen zu bekommen und um das wahrscheinlich immense biotechnologische Potenzial dieses bisher noch unerschlossenen Genpools unter kontrollierten Laborbedingungen nutzbar zu machen.

Derzeit sind 52 bakterielle Phyla bekannt von denen die Hälfte, die sog. Candidatus Phyla, mittels molekularbiologischer Techniken wie der 16S rRNA Analyse kultivierungsunabhängig identifiziert worden ist. 16S rRNA Analysen haben daher wesentlich dazu beigetragen unbekannte Abstammungslinien zu identifizieren und somit zu detaillierten Einblicken in die Struktur mikrobieller Konsortien geführt. Der Term „Candidatus Phylum“ wird benutzt, um Organismen taxonomisch einzuordnen, welche auf 16S rRNA Sequenzebene weniger als 75% Ähnlichkeiten zu bisher charakterisierten Phyla aufweisen und von denen keine kultivierten Vertreter vorliegen. Neu beschriebene prokaryontische Phyla und Candidatus Phyla werden von *Gemmatimonadetes*, OP-, TM-, SC-, BRC1 und WS-Phyla und der „Termite-Group I“ repräsentiert (Dojka et al. 1998, 2000, Hugenholtz et al. 1998b, 2001, Madrid et al. 2001, Zhang et al. 2003, Mummey and Stahl 2003). Durch die hier vorgestellte Arbeit wird das Spektrum der Candidatus Phyla durch die Beschreibung der *Poribacteria* erweitert. Im Überblick wird deutlich, dass die mikrobielle Diversität selbst auf der Ebene der Phyla noch nicht vollständig erschlossen ist.

Durch innovative Kultivierungstechniken ist es durchaus gelungen neuartige Mikroorganismen zu kultivieren. Zengler et al. (2002) beschreiben in ihrer Arbeit die erfolgreiche Kultivierung von unbekanntem *Proteobacteria*, Bakterien des Phylums *Cytophaga-Flavobacteria-Bacteroides* und von *Planktomycetes*. Rappe et al. (2002) gelang

die Kultivierung des im marinen Bakterioplankton abundant vorkommenden *Pelagibacter sp.* (früher SAR11 Gruppe, *Deltaproteobacteria*). Während neue Kultivierungsmethoden jedoch technisch sehr aufwendig und zeitintensiv sind, sind Standardmethoden meist nicht spezifisch genug, um einen Mikroorganismus gezielt zu isolieren. Für jede neu zu kultivierende mikrobielle Art muss ein spezifisches Set von Kultivierungsparametern ermittelt und eingestellt werden, um beispielsweise langsam wachsende Organismen von schnell wachsenden zu unterscheiden. Außerdem konnten bisher – mit Ausnahme der *Gemmatimonadetes* – noch keine Organismen der neu beschriebenen Candidatus Phyla kultiviert werden. Den direkten Zugang zu der Mehrzahl nicht kultivierter Prokaryonten liefert daher nur die *ex situ* Isolierung, Klonierung und Charakterisierung genomischer DNA. Damit werden detaillierte Einblicke in die Biologie der entsprechenden Mikroorganismen ermöglicht, ohne von deren Kultivierung abhängig zu sein.

## 5.2 Das neue Candidatus Phylum *Poribacteria*

### 5.2.1 Phylogenetische Position

Das Candidatus Phylum *Poribacteria* wurde erstmalig innerhalb des mikrobiellen Konsortiums des Mittelmeerschwammes *A. aerophoba* nachgewiesen und klassifiziert. Darüber hinaus konnten *Poribacteria* in weiteren marinen Poriferen nachgewiesen werden. Da das morphologische Charakteristikum dieser Organismen, ein nukleus-ähnliches Kompartiment, bisher ausschließlich von *Planctomycetes* bekannt war (Lindsay et al. 1997), wurden zunächst für 16S rRNA Genanalysen planctomyceten-spezifische Oligonukleotide verwendet. Die detektierten 16S rRNA Gensequenzen bilden in phylogenetischen Untersuchungen eine unabhängige stabile Abstammungslinie mit weniger als 75% Sequenzhomologie zu bisher beschriebenen Phyla, weshalb definitionsgemäß der Nachweis eines neuen Candidatus Phylums postuliert wurde. Der Name *Poribacteria* wurde wegen ihrer spezifischen Assoziation mit marinen Poriferen gewählt. *Planctomycetes* gehen in phylogenetischen Analysen als nahesten Verwandte der *Poribacteria* hervor. Beide repräsentierten evolutionsgeschichtlich ursprüngliche Abstammungslinien wie durch die tiefe Verzweigung von rRNA Sequenzen in phylogenetischen Analysen deutlich wird. Momentan wird das Candidatus Phylum *Poribacteria* von 12 fast vollständigen und 29 partiellen 16S rRNA Gensequenzen gebildet. Weitere 41 poribakterielle partielle 16S rRNA Gensequenzen wurden von Engels (2005) in diversen Demospongiae nachgewiesen und

phylogenetisch charakterisiert. Hinzu kommt die vollständige Sequenz des 16S rRNA Gens des genomischen Fragments eines unkultivierten *Poribacterium* (64K2). Innerhalb des in dieser Arbeit nachgewiesenen Sequenzclusters besitzen die 16S rRNA Gene eine Ähnlichkeit von ca. 93%. Die Sequenz des vollständigen poribakteriellen 16S rRNA Gens zeigt, dass die Signaturnukleotide der Positionen 46-63 und 1390-1406 komplementär zu der Sequenz der verwendeten Oligonukleotide pla46f und 1390r sind, was den spezifischen Nachweis poribakterieller 16S rRNA Gene ermöglichte. Die standardgemäß benutzte Signaturregion 27-45, die mittels des „universellen“ Oligonukleotids 27f erfasst wird (Lane 1991), weist bei dem nicht kultivierten Poribakterium eine Punktmutation und drei Deletionen bzw. Insertionen einzelner Nukleotide auf, weshalb das Candidatus Phylum *Poribacteria* in Studien zur Analyse der gesamten mikrobiellen Diversität mariner Demospongiae unter Verwendung dieses universellen Primers nicht identifiziert werden konnte (Hentschel et al. 2002). Eine deutliche Diskrepanz zu universellen Signaturnukleotiden wird ebenfalls an der im allgemeinen hoch konservierten Position 338-357 sichtbar. Durch diese Daten wird deutlich, dass die mikrobielle Diversität eines Habitats nur dann vollständig beschrieben werden kann, wenn die verwendeten Oligonukleotide zur Amplifikation der 16S rRNA Gene das Spektrum der vorliegenden Diversität ausreichend abdecken.

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit poribacteria-spezifischen Sonden, welche gegen unterschiedliche variable Bereiche der poribakteriellen 16S rRNA gerichtet sind, belegen aufgrund ihrer Kolokalisation in denselben Zellen eindeutig die Authentizität dieser Bakterien. Aufgrund des nukleus-ähnlichen Kompartiments erscheinen die FISH Signale ringförmig. Diese Beobachtung stimmt mit FISH Signalen von *Planctomycetes* überein, welche aufgrund des Pirellusoms ebenfalls ringförmig erscheinen (Neef et al. 1998). *Poribacteria* waren in FISH Analysen unter Verwendung des Oligonukleotides pla46 nicht nachweisbar, obwohl die Sequenz des Oligonukleotids komplementär zur 16S rRNA ist. Unter Umständen deutet dies auf eine veränderte Sekundärstruktur des 16S rRNA Moleküls hin. Daher könnte dieser Sequenzabschnitt bei *Poribacteria* unzugänglich für FISH Sonden sein. Behrens et al. (2003) zeigten, dass die Zugänglichkeit bestimmter Helices der 16S rRNA bei verschiedenen bakteriellen Phyla deutlich voneinander abweicht.

In den in dieser Arbeit erstellten 16S rRNA Genbanken wurden zusätzlich zu poribakteriellen 16S rRNA Genfragmenten solche aus *Deltaproteobacteria* und *Chloroflexi* detektiert. Diese konnten phylogenetisch den entsprechenden monophyletischen spezifischen 16S rRNA Sequenzclustern der Mikroflora aus *A. aerophoba* zugeordnet werden (Hentschel et al. 2002). Sequenzvergleiche dieser 16S rRNA Gene zeigten drei Punktmutationen innerhalb der

Nukleotidregion 46-63. Daher erfolgte die Amplifikation dieser 16S rRNA Genfragmente aufgrund unstringenter Reaktionsbedingungen.

In DGGE Analysen, die zur Abschätzung der archivierten mikrobiellen Diversität der Metagenombank APAE02 durchgeführt wurden, konnte der poribacteria-positive Pool nur aufgrund einer schwachen Amplifikation des poribakteriellen 16S rRNA Gens nachgewiesen werden. Sequenzvergleiche des 16S rRNA Gens mit den Oligonukleotiden 341fGC und 907r (Muyzer et al. 1998), welche für die Amplifikation der 16S rRNA Genfragmente aus Genbankpools verwendet wurden, wiesen an der Position 341-358 eine Punktmutation und an der Position 907-927 zwei Punktmutationen auf. Aufgrund der dadurch verursachten Fehlpaarungen konnte das poribakterielle 16S rRNA Genfragment weniger gut amplifiziert werden. Dennoch war durch die Anwendung der DGGE die Detektion dieses Genfragments innerhalb des „Pools“ möglich. Mittels dieses Screens konnten außerdem alle abundant mit marinen Demospongiae assoziierten bakteriellen Abstammungslinien in der Metagenombank APAE02 nachgewiesen werden. Dass *Alpha-* und *Deltaproteobacteria*, *Nitrospira*, *Bacteroidetes* und *Actinobacteria* nicht nachgewiesen werden konnten, ist ggf. auf eine ineffiziente Zelllyse bei der Klonierung der Metagenombank oder auf die hohe Komplexität des Ausgangsmaterials zurückzuführen. Aus statistischen Gründen könnten 16S rRNA kodierende Loci dieser Organismen nicht in APAE02 kloniert worden sein. Demnach ist via DGGE das archivierte Diversitätsspektrum von 16S rRNA Genen in Metagenombanken trotz des Hintergrundes von genomischer DNA *E. coli*s effizient nachweisbar. DGGE erlaubt eine hoch auflösende Trennung von *E. coli* 16S rRNA Genen und klonierten 16S rRNA Genen anderer Taxa. Eine höhere Auflösung zwischen unterschiedlichen 16S rRNA Genfragmenten könnte die Verwendung spezifischer 16S rRNA Gen Primer für bestimmte bakterielle Abstammungslinien, sowie eine Variation des Harnstoffgradienten liefern. Im Überblick heben die mehr als 25prozentige 16S rRNA Sequenzunterschiede zu bekannten Phyla, Variationen an konservierten bakteriellen Signaturregionen und die uniformen Signale mehrere kolokalisierender FISH Sonden die unabhängige phylogenetische Position der *Poribacteria* innerhalb der Domäne Bacteria hervor.

### 5.2.2 Struktur des poribakteriellen *rrn* Operons

Das 16S rRNA Gen der *Poribacteria* liegt nicht in einem konventionellen *rrn* Operon, sondern getrennt von den übrigen rRNA kodierenden Genen im Genom vor. Ein konventionelles bakterielles *rrn* Operon kodiert neben der 16S rRNA alle weiteren rRNAs (5S und 23S), welche für ein funktionstüchtiges Holoribosom benötigt werden (Hill 1999).

Nach Vergleichen zu 16S rRNA kodierenden genomischen Loci aus Organismen, bei denen das 16S rRNA Gen ebenfalls nicht in einem *rrn* Operon vorliegt, konnten keine Gemeinsamkeiten bezüglich des genomischen Kontextes festgestellt werden. In allen bisher annotierten Genomen sind diese 16S rRNA Gene zufällig verteilt. Darüber hinaus scheinen geteilte *rrn* Operone nicht monophyletisch zu sein und kommen nur in geringer Kopienzahl pro Genom vor. Die Mechanismen zur Etablierung dieses Genotyps müssen demnach jeweils unabhängig voneinander stattgefunden haben. Mehrere unterschiedliche Szenarien sind denkbar: (1) *rrn* Operone erscheinen innerhalb eines Genoms als repetitive Sequenzen und könnten daher aufgrund homologer Rekombination deletiert worden sein. Wahrscheinlich sind mittels solcher Ereignisse die Genome obligat intrazellulärer Endosymbionten reduziert worden (Hill 1999). (2) Eine homologe Rekombination an *rrn* Operonen kann außerdem Translokationen bzw. Reorganisationen eines Genoms verursachen (Lopez-Garcia et al. 1995). (3) rRNA kodierende Gene könnten im Verlauf der Evolution entsprechender Organismen nicht dupliziert worden sein, weshalb nur eine einzige Kopie pro Genom vorliegt. Das Vorhandensein von nur ein bis zwei Kopien dieser Gene lässt auf einen relativ langsamen Metabolismus schließen (Wolfe and Haygood 1993). (4) Die Teilung des *rrn* Operons könnte aufgrund rekombinanter Ereignisse an kleineren repetitiven Sequenzen stattgefunden haben. (5) Es ist außerdem denkbar, dass evolutionsgeschichtlich „alte“ rRNA Gene nicht in einem Operon organisiert waren. Demnach wäre die Zusammenlegung rRNA kodierender Gene erst bei „modernen“ Abstammungslinien erfolgt. *Poribacteria* und *Planctomycetes* stellen aufgrund von 16S rRNA Sequenzalignments und phylogenetischen Analysen evolutionsgeschichtlich tief abzweigende Organismen dar, welche beide ein geteiltes *rrn* Operon besitzen. Vielleicht handelt es sich bei dieser Operonsstruktur um ein evolutionsgeschichtlich ursprüngliches Merkmal. Wie die Expression von rRNA Genen geteilter *rrn* Operons reguliert wird, ist bisher nicht untersucht worden.

### 5.2.3 Annotation poribakterieller „open reading frames“ (ORFs)

Die Sequenzanalyse des poribakteriellen genomischen Fragments führte zur Detektion von 29 ORFs, von denen 13 funktionell annotiert werden konnten. 13 ORFs kodieren konserviert hypothetische Proteine, welche lediglich geringe Homologien zu bereits beschriebenen Genen anderer Organismen zeigen, und sechs ORFs kodieren hypothetische Proteine, welche spezifisch für *Poribacteria* zu sein scheinen. Diese sechs ORFs besitzen keine signifikanten Homologien zu bereits beschriebenen Genen anderer Organismen; zur Funktion dieser Proteine liegen ebenfalls keine Daten vor. Einer generellen Beobachtung zufolge archivieren

Metagenombanken bis zu 50% (konservierte) hypothetische Proteine. Selbst in Genomen kultivierter Arten liegt der Anteil bisher nicht eindeutig funktionell annotierbarer ORFs bei ca. 40% (Nelson 2003). Diese Zusammenhänge verdeutlichen den Bedarf der biochemischen Charakterisierung dieser vielen z.T. noch unbekanntem Gene, um die Physiologie der jeweiligen Organismen in Zukunft präziser vorhersagen zu können. Erst dann kann der Ansatz der Metagenomik seinen Zielen gerecht werden und eine Verknüpfung von phylogenetischer und funktioneller Diversität liefern.

#### *Orthologe ORFs in R. baltica*

Die ORFs 20 und 21 des genomischen Fragmentes 64K2 scheinen eine Sulfatase bzw. ein zu sezernierendes Protein zu kodieren. Orthologe Gene zu diesen ORFs konnten in *R. baltica* nachgewiesen werden. *R. baltica* kodiert 110 Sulfatasen. Die entsprechenden Gene sind z.T. in der gleichen Tandemstruktur mit einem zweiten Gen wie auf dem poribakteriellen genomischen Fragment gruppiert (Glöckner et al. 2003). Bei 31% dieser Gene wurde bei der Annotation ein Signalpeptid beschrieben, was auf eine extrazytosolische Lokalisation dieser Proteine hindeutet. Aufgrund der hohen Anzahl scheinen die Sulfatasen für *R. baltica* physiologisch sehr wichtig zu sein. Bakterielle Sulfatasen werden primär im Schwefelmetabolismus benutzt. Ihre Expression ist präzise reguliert und abhängig vom umgebenen Schwefelvorkommen. Da marine Systeme jedoch nicht schwefel-limitiert sind, könnten diese Sulfatasen in der Degradierung schwefelhaltiger Glycopolymere involviert sein (Glöckner et al. 2003). Solche Polymere sind ein wesentlicher Bestandteil mariner Detriuspartikel („marine snow“), mit denen *Planctomycetes* assoziiert sind. Diese Partikel müssten auch während der Filtrationsaktivität von marinen Demospongiae aufgenommen werden. Es wäre denkbar, dass *Poribacteria* mittels der kodierten Sulfatasen in der Lage sind Polymere dieser Detriuspartikel zu degradieren, um sie als Kohlenstoffquelle zu nutzen.

#### *Poribacteria-spezifische Transmembranproteine*

Das poribakterielle genomische Fragment kodiert acht hypothetische Transmembranproteine mit jeweils sechs alpha-helikalen Transmembrandomänen (ORFs 12-19, hyp TMP). Während Sequenzhomologien zu vergleichbaren Proteinen mit weniger als 30% auf Aminosäureebene relativ gering erscheinen, sind die paralogen Gruppen dieser hypothetischen Proteine untereinander mit bis zu 50% sehr ähnlich. Orthologe Proteine werden nicht von *R. baltica* kodiert, obwohl aufgrund phylogenetischer und unter Umständen physiologischer Ähnlichkeiten eine solche Struktur vermutet werden könnte. Aufgrund fehlender Homologien



zu anderen Organismen könnten diese ORFs poribakteria-spezifische Strukturen darstellen. Die Gruppierung dieser Gene lässt auf eine Organisation innerhalb eines Operons schließen. Möglicherweise stellen die hypothetischen Transmembranproteine Strukturen dar, welche unbekannte Transportprozesse an der Zytoplasmamembran katalysieren könnten. Sie könnten daher einen unbekanntem, heteromeren Transporter, Kanal oder eine Pore bilden.

### *MOCO-Oxidoreduktase*

Die poribakterielle Oxidoreduktase stellt ausgehend von Sequenzalignments einen neuen Typus Molybdän enthaltender Oxidoreduktasen dar. Durch diese Alignments konnten Oxidoreduktasen gleichen Typs und ähnlichen katalytischen Funktionen jeweils in funktionellen Gruppen angeordnet werden. Diese Gemeinsamkeit wird darüber hinaus am jeweiligen Aminosäuremotiv der aktiven Zentren der Enzyme sichtbar. Die poribakterielle Oxidoreduktase wurde während der Sequenzalignments stets mit bisher nicht annotierten Oxidoreduktasen gruppiert, welche Venter et al. (2004) im Rahmen des „environmental shotgun genome sequencing“ Projektes kloniert haben. Alle Oxidoreduktasen dieser Sequenzgruppe einschließlich derer aus terrestrischen *Rhizobia* sind bisher lediglich *in silico* beschrieben worden. Biochemische Daten dieser Enzyme liegen bisher nicht vor (Capela et al. 2001, Galibert et al. 2001, Kaneko et al. 2000).

Die poribakterielle Oxidoreduktase könnte eine neuartige chemische Reaktion katalysieren. Innerhalb des aktiven Zentrums ist die im allgemeinen konservierte Aminosäure Alanin durch Prolin ersetzt worden, was durch eine Punktmutation im kodierenden Codon (Ala: GCN; Pro: CCN) erfolgt sein könnte. Dadurch ändert sich der chemische Charakter dieses Sequenzmotivs, da Prolin weniger hydrophob als Alanin ist und außerdem Sekundärstrukturen in Proteinen durch ein Abzweigen der Aminosäurekette verändern kann. Andererseits sind beide Aminosäuren nicht aromatisch, nicht aliphatisch, nicht geladen und unpolar, was gegen eine chemische Veränderung des Sequenzmotivs spricht.

Die homologen Enzyme katalysieren jeweils Schlüsselreaktionen in Stoffwechselwegen, die wichtig für Energieerhaltungsprozesse der entsprechenden Organismen sind. Kohlenstoffmonoxid Hydrogenasen sind Schlüsselenzyme in der aeroben chemolithoautotrophen Oxidation von CO (CoxL: *Oligotropha carboxydovorans* (Hugendieck und Meyer 1992); CutL: *Pseudomonas thermocarboxydovorans*; CutA: *Hydrogenophaga pseudoflava* (Meyer and Schlegel 1983)). Nach der Oxidation wird CO<sub>2</sub> als Kohlenstoffquelle fixiert. 4-Hydroxybenzoyl-CoA Reduktasen degradieren 4-Hydroxybenzoate anaerob (HcrA: *Thauera aromatica* (Brackmann und Fuchs 1993); HbaC:

*Rhodopseudomonas palustris* (Gibson et al. 1997). Benzoat ist ein Schlüsselintermediat während der anaeroben Degradation einer großen Vielfalt natürlich vorkommender aromatischer Substanzen. Weitere Reduktionen führen zu Acetyl-CoA, einem wichtigen Intermediat des Zellstoffwechsels. Die anderen homologen Oxidoreduktasen sind in der Degradierung von Alkaloiden involviert (XhdB: *Rhodobacter capsulatus* (Leimkühler et al. 1998); MOD, MOP: *Desulfovibrio* sp. (Rebelo et al. 2000); NdhL: *Arthrobacter nicotinovorans* (Grether-Beck et al. 1994); QorL: *Pseudomonas putida* (Bläse et al. 1996)). Die jeweiligen Substrate stellen die Hauptquellen für Kohlenstoff, Stickstoff und Energie dar. Vertreter der typischen Alkaloide aus *Verongida* sp. könnten ein Substrat für die poribakterielle Oxidoreduktase sein (Abbildung 8). Die Alkaloide sind an vielen Stellen hydroxyliert. Die Degradation könnte Kohlenstoff und Energie liefern. Sie kommen in relativ hohen Konzentrationen in *Verongida* sp. vor, bilden bis zu 12% der Trockenmasse eines Individuums und scheinen kontinuierlich produziert zu werden. Somit wären sie eine nicht limitierte Kohlenstoff- und Energiequelle. Innerhalb des dicht besetzten Mesohyls der *Verongida* sp. ( $10^8$  Bakterien pro g) könnten *Poribacteria* mittels dieses Enzyms in der Lage sein eine unkonventionelle, reichhaltige Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen. Die offensichtliche Abundanz von *Poribacteria* innerhalb des Mesohyls von *Verongida* sp. legt eine physiologische Adaptation an dieses Habitat nahe. Ob die poribakterielle Oxidoreduktase eine vergleichbare Schlüsselreaktion wie die homologen Oxidoreduktasen katalysiert, kann nur durch biochemische Analysen gezeigt werden. Es wäre möglich, dass solche Daten letztendlich für die selektive Kultivierung eines *Poribakteriums* herangezogen werden könnten.

#### *Heterologe Expression der poribakteriellen MOCO-Oxidoreduktase*

Die poribakterielle Oxidoreduktase sollte in dieser Arbeit heterolog in *E. coli* exprimiert werden. Nach Klonierung der entsprechenden drei kodierenden ORFs (oxrMSL) in den Expressionsvektor pQE30 konnte in *E. coli* M15 Zellen jedoch nur die Expression der ersten, mittleren Untereinheit erreicht werden. mRNA Analysen deuten allerdings eine vollständige polycistronische Transkription der ORFs an. Daher scheinen die intrinsischen Ribosombindestellen dieses Transkriptes in *E. coli* nicht funktionell zu sein. Eine funktionstüchtige Oxidoreduktase dieses Typs würde aus zwei Heterotrimeren bestehen, deren Untereinheiten jeweils koexprimiert werden. Daher erscheint es notwendig, die drei Untereinheiten einzeln zu exprimieren oder auf einen alternativen Expressionsstamm

zurückzugreifen. Genetische Systeme für die Expression homologer Oxidoreduktasen sind für *Thauera aromatica* etabliert (persönliche Mitteilung, B. Philipp, Universität Konstanz).

### 5.3 *Poribacteria* versus *Planctomycetes*

Da bei der Beschreibung der *Poribacteria* davon ausgegangen wurde, dass es sich bei diesen Mikroorganismen aufgrund morphologischer Ähnlichkeiten um *Planctomycetes* handeln könnte, werden im folgenden beide Phyla gegenübergestellt. *Planctomycetes* sind fakultativ aerobe, gram-negative, chemoheterotrophe Organismen (Fuerst 1995). Das Genom von *Rhodopirellula baltica* ist das einzige vollständig sequenzierte Genom eines Mikroorganismus dieses Phylums und umfasst 7,1 Mb (Glöckner et al. 2003). *Planctomycetes* kommen überwiegend in aquatischen, aber auch in terrestrischen Habitaten vor. Im Meer sind *Planctomycetes* häufig mit organischen Detriuspartikeln, dem „marine snow“ assoziiert. Sie nehmen eine wesentliche Rolle in Kohlenstoff- und Stickstoffkreisläufen ein. In der Ordnung *Planctomycetales* unterscheidet man die Gattungen *Planctomyces*, *Pirellula*, *Rhodopirellula*, *Blastopirellula*, *Gemmata* und *Isosphaera*. Im Gegensatz zu anderen Bakterien besitzen *Planctomycetes* eine proteinogene Zellwand und bilden kein Peptidoglykan. Dieser Phänotyp ist ebenfalls von *Chlamydia* und von Archaea bekannt. Innerhalb der Zellwand der *Planctomycetes* befinden sich kraterförmige Strukturen. Darüber hinaus besitzen einige Vertreter zelluläre Prostheta (Fuerst 1995). Ein weiteres morphologisches Charakteristikum stellt ein subzelluläres nukleus-ähnliches Kompartiment, das Pirellusom, dar, welches DNA einschließt und bei allen kultivierten *Planctomycetales* beschrieben worden ist (Lindsay et al. 1997). Darüber hinaus besitzen sie ein geteiltes *rrn* Operon (Glöckner et al. 2003, Liesack and Stackebrandt 1989).

Durch FISH und 16S rRNA Sequenzanalysen konnten *Planctomycetales* zwar in *Aplysina* sp. gezeigt und kultiviert werden, allerdings scheinen die Isolate nicht Teil der spezifischen Mikroflora dieser Demospongiae zu sein (Pimentel et al. 2003). Versuche zur Filtrationseffizienz von *A. aerophoba* zeigen, dass *Pirellula marina* effizient aus dem Meerwasser filtriert wird (Wehrl 2001). FISH Analysen an Gewebepreparationen von *A. aerophoba* unter Verwendung planktomyceten-spezifischer Sonden liefern allerdings nur sehr vereinzelte Signale.

Im Gegensatz dazu konnten *Poribacteria* bisher nur spezifisch in Assoziation mit marinen Demospongiae nachgewiesen werden. Sie repräsentieren eine stabile, abundante Fraktion des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba*. *Poribacteria* waren weder im marinen

Bakterioplankton, noch innerhalb mikrobieller Konsortien mariner Sedimente nachweisbar (Beja et al. 2000a, Venter et al. 2004). Definitionsgemäß bilden *Poribacteria* mit weniger als 75% Ähnlichkeit in 16S rRNA Sequenzen phylogenetisch ein unabhängiges separates Candidatus Phylum, obwohl sie planktomyceten-typische Charakteristika wie 13 von 15 Signaturnukleotidregionen innerhalb der 16S rRNA, ein geteiltes *rrn* Operon, orthologe ORFs und morphologisch ähnliche Strukturen besitzen. Bezüglich des GC-Gehaltes unterscheiden sich *Poribacteria* und *Planctomycetes*, was die Unterschiedlichkeit dieser Abstammungslinien unterstreicht. *R. baltica* besitzt einen GC-Gehalt von 55,4%. Der 16S rRNA kodierende Locus weist bei *R. baltica* einen GC Gehalt von 54,7% auf (Glöckner et al. 2003). Das genomische Fragment des unkultivierten *Poribakteriums* besitzt einen GC-Gehalt von 50,1%. Genotypische Unterschiede werden anhand der hypothetischen Transmembranproteine (ORFs 12-19, hypTMP) des poribakteriellen DNA Fragmentes deutlich, die wie die MOCO-Oxidoreduktase (ORFs 4-6, oxrMSL) und die poribacteria-spezifischen ORFs 1, 8, 10, 22, 25 und 26 nicht von *R. baltica* kodiert werden.

Geteilte *rrn* Operone schienen bisher nicht monophyletisch innerhalb bakterieller Organismengruppen vorzukommen. Die Detektion eines geteilten *rrn* Operons in *Planctomycetales* und *Poribacteria* lässt aufgrund des phylogenetischen Verwandtschaftsverhältnisses und den beschriebenen Gemeinsamkeiten darauf schließen, dass ein gemeinsamer Vorfahre existiert haben könnte, aus dem diese Phyla hervorgegangen sind, oder dass orthologe Gene via horizontalen Gentransfers unter diesen Organismen ausgetauscht wurden. *Poribacteria* könnten daher einen planktomyceten-ähnlichen chemoheterotrophen, fakultativ aeroben Metabolismus besitzen.

Die Aufspaltung zwischen *Planctomycetes* und *Poribacteria* in zwei unterschiedliche Abstammungslinien könnte evolutionsbiologischen Aspekten zufolge durch die Trennung dieser Organismen nach Assoziation der *Poribacteria* mit einigen marinen Demospongiae etabliert worden sein. Demnach müsste ein gemeinsamer Vorfahre dieser beiden Abstammungslinien frei im Meer gelebt haben. Durch die Assoziation hätten sich *Poribacteria* an eine neue ökologische Nische angepasst, welche von *Planctomycetes* nicht besetzt werden konnte. Generell kann die Anpassung an ökologische Nischen aufgrund eines unterbrochenen Genflusses die Bildung neuer Abstammungslinien verursachen. Diese Abstammungslinienbildung wird durch Mechanismen des genetischen Drifts oder aufgrund des Aufkommens neuer Selektionsdrücke gefördert. Dadurch können sich zwei Abstammungslinien während ihrer Isolation divergent entwickeln. Bisher ist diese Argumentation für die Bildung neuer Arten geführt worden. *Poribacteria* und *Planctomycetes*

repräsentieren jedoch laut 16S rRNA Analysen zwei unterschiedliche Phyla, unterscheiden sich also auf einer viel höheren Organisationsebene. Eine divergente Entwicklung zweier Abstammungslinien kann verstärkt werden, wenn zusätzlich mutualistische und koevolutive Effekte die Diversifikation fördern. Eine schnelle Diversifikation ist besonders wahrscheinlich, wenn eine Art als Symbiont in einem Wirt lebt. Mutualistische und koevolutive Prozesse könnten nach der Assoziation der *Poribacteria* mit einigen Demospongiae entwickelt worden sein. Zeitlich könnte diese Assoziation bereits 580 Millionen Jahre mit dem Aufkommen der Poriferen zurückliegen. Da der Prozess der Diversifikation eine Funktion der Zeit ist, würde dieses Szenario eine Erklärung für die hohe Divergenz zwischen *Poribacteria* und *Planctomycetes* liefern. Darüber hinaus unterliegen Prokaryonten nur relativ niedrigen Generationszeiten, sodass Unterschiede relativ schnell akkumuliert werden können. Woese (1987) beschreibt *Planctomycetes* als eine sich schnell entwickelnde Abstammungslinie, was eine Diversifikation wiederum verstärken würde. Zusammengefasst werden die evolutionsbiologischen Aspekte der Artbildung von Cockburn (1995).

Innerhalb der poribakteriellen Abstammungslinie ist die phylogenetische Diversität relativ gering. Dies könnte darauf hindeuten, dass sich der Selektionsdruck, dem *Poribacteria* nach ihrer Assoziation mit Demospongiae ausgesetzt waren, nur wenig geändert hat. Fossile Funde von Poriferen aus dem Präkambrium zeigen auffallende Ähnlichkeiten zu rezenten Poriferen bezüglich morphologischer und zellulärer Organisation, was ein Indiz für die Stabilität der Poriferen darstellt (Li et al. 1998).

Bisher kann die Evolution von *Planctomycetes* und *Poribacteria* nicht vollständig rekonstruiert werden, da zugrunde liegende Daten über die Biologie der *Poribacteria* sehr limitiert sind. Nachdem jedoch die mikrobielle Diversität im Bereich der *Planctomycetes* und *Poribacteria* immer umfangreicher durch neue Isolate und kultivierungsunabhängig durch 16S rRNA Analysen beschrieben wird, wird die Auflösung innerhalb dieser bakteriellen Domänen stets größer und bildet die Verwandtschaftsbeziehungen deutlicher ab. Durch diese Untersuchungen wird zunehmend ein sehr divergentes und evolutionär tief verzweigtes Spektrum dieser bakteriellen Domänen sichtbar („PV-assay“, Derakshani et al. 2001, Zengler et al. 2002, Chouari et al. 2003, Brummer et al. 2004). Es bleibt abzuwarten, wie viele Abstammungslinien diesem Bereich des phylogenetischen Stammbaums in Zukunft noch zugeordnet werden können.

## 5.4 Die Assoziation von *Poribacteria* mit Demospongiae

Bisher konnten *Poribacteria* in den drei Demospongiae Ordnungen *Verongida*, *Haplosclerida* und *Lithistida* nachgewiesen werden. Die Ordnungen *Poecilosclerida*, *Agelasida*, *Halichondria* und *Hadromerida* scheinen nicht mit *Poribacteria* assoziiert zu sein. Indizien für eine spezifische Assoziation zwischen *Poribacteria* mit den entsprechenden Demospongiae liefert der Befund, dass *Poribacteria* in Individuen von *Aplysina* sp. (*Verongida*) nachgewiesen werden konnten, die geographisch weit voneinander entfernt in unterschiedlichen Meeren vorkommen (*A. aerophoba*: Mittelmeer, andere *Verongida* sp.: Karibik). In diesen Spezies bilden sie eine abundante Fraktion assoziierter Bakterien. Obwohl *Poribacteria* im Bakterioplankton nicht nachgewiesen werden konnten, wäre es dennoch denkbar, dass sie in sehr geringen Konzentrationen frei im Meer vorkommen und durch die enorme Filtrationsaktivität der Demospongiae kontinuierlich angereichert werden. Nach dieser Anreicherung könnten sie innerhalb des Mesohyls persistieren oder metabolisch aktiv sein. Dazu müssen sie Voraussetzungen erfüllen, welche ihnen die Besiedlung dieses Habitats ermöglichen. Alle aufgenommenen Mikroorganismen unterliegen der Phagozytoseaktivität der Archaeozyten. *Poribacteria* könnten innerhalb des Mesohyls überdauern, da sie nicht oder weniger effizient phagozytiert werden wie andere marine Mikroorganismen. Darüber hinaus müssen sie das vorliegende Nährstoffangebot nutzen können und die Wachstumsbedingungen dieses Milieus tolerieren. Dass entsprechende Mechanismen existieren ist offensichtlich, da *Poribacteria* stabil mit einigen Demospongiae assoziierten sind.

Momentan ist es noch unklar, ob bei der Assoziation zwischen *Poribacteria* und den entsprechenden Demospongiae eine neutrale oder kommensale Interaktion oder eine mutualistische Symbiose vorliegt. Per Definition beschreibt der Term „Symbiose“ eine Interaktion zweier Organismen innerhalb einer Lebensgemeinschaft oder Assoziation. So lang beide Interaktionspartner einen relativen Nutzen aus der Interaktion ziehen, besteht eine „mutualistische“ Symbiose. Mutualistische Symbiosen können sowohl endosymbiontisch (intrazelluläre Symbionten) als auch ektosymbiontisch (extrazelluläre Symbionten) sein und obliegen oft einem Austausch von Metaboliten. Wird ein Interaktionspartner geschädigt, besteht „Parasitismus“. Hat keiner der Interaktionspartner weder Schaden noch Nutzen, spricht man von „Neutralismus“. „Kommensalismus“ liegt dann vor, wenn nur ein Interaktionspartner einen Nutzen hat, der andere dadurch jedoch nicht geschädigt wird (Schlegel 1992).

Ein Charakteristikum mutualistischer Interaktionen kann die Weitergabe des Interaktionspartners an die nachfolgende Generation sein. Demospongiae können sich sowohl asexuell, als auch sexuell vermehren. Einzelne Spezies sind bezüglich ihrer Fortpflanzungsmodi sehr unterschiedlich, weil sie entweder auf einen beschränkt sind oder beide besitzen. Innerhalb einzelner Populationen vermehren sind darüber hinaus nicht alle Individuen durch den gleichen Modus. Bei der klonalen asexuellen Fortpflanzung durch Abtrennung von Gewebesegmenten könnten assoziierte Bakterien wie *Poribacteria* an das neu entstehende Individuum horizontal weitergegeben werden. Eine Assoziation von sexuellen Verbreitungsstadien mit *Poribacteria* wäre ein eindeutiges Indiz für eine vertikale Weitergabe des Interaktionspartners und für ein symbiontisches Interaktionssystem, wie es u.a. bereits bei Insekten und *Wolbachia* sp., *Blochmannia* sp. (Endosymbiose) und *Pseudomonas* sp. (Ektosymbiose) beschrieben worden ist (Zientz et al. 2004, Piel et al 2004d).

Ein zweites Charakteristikum symbiontischer Interaktionssysteme kann die Koevolution der beteiligten Interaktionspartner darstellen, wie es bei Symbiosen zwischen Insekten und *Streptomyces* und bei Flechten beschrieben wurde (Currie et al. 2003). Während phylogenetische Analysen anhand molekularbiologischer Marker eine genaue Differenzierung von Prokaryonten erlauben, ist es bisher jedoch noch unklar in wie fern sich die entsprechenden Demospongiae Ordnungen phylogenetisch voneinander unterscheiden. Phylogenetischer Verwandtschaftsbeziehungen der Demospongiae anhand molekularer Marker zeigen oft nur eine niedrige Auflösung und erlauben keine eindeutigen Aussagen darüber, welche Ordnungen jeweils aus einem gemeinsamen Vorfahren entstanden sein könnten (Schmidt et al. *in press*). Die klassische Taxonomie ist in einigen Fällen nicht deckungsgleich mit molekularen phylogenetischen Analysen, weshalb einige Ordnungen nicht monophyletisch zu sein scheinen. Eine höhere phylogenetische Auflösung unter den Demospongiae Ordnungen und eine weitergehende Untersuchung der poribakteriellen Diversität könnten unter Umständen parallele, koevolutive Entwicklungsprozesse zwischen den Assoziationspartnern sichtbar machen.

Zusammenfassend wird deutlich, dass zwischen Demospongiae und deren assoziierter Mikroflora keine Symbiose im klassischen Sinn vorliegt. Demospongiae erscheinen vielmehr als eine marine ökologische Nische, welche nur von einem bestimmten mikrobiellen Konsortium besiedelt werden kann. Sie repräsentieren „Inseln“ mit einer phylogenetisch diversen, aber spezifischen mikrobiellen Flora, von der *Poribacteria* einen Teil bilden.

## 5.5 Metagenomanalysen

Die direkte Klonierung großer genomischer DNA Fragmente liefert die Genomäquivalente der entsprechenden Mikroorganismen eines Habitats unabhängig von der Kultivierung dieser Spezies. Sofern mikrobielle Biomasse nicht limitiert ist, kann genomische DNA kloniert und direkt analysiert werden, um physiologische Charakteristika der entsprechenden Organismen *in silico* beschreibbar zu machen, was z.B. zur Identifikation bisher unbekannter Stoffwechselwege wie der „reversen Methanogenese“ geführt hat (Hallam et al. 2004). Darüber hinaus können einzelne Biosynthesegene bzw. Biosyntheseoperons isoliert werden ohne weiterhin natürliche Ressourcen für die Isolierung der entsprechenden Substanzen zerstören zu müssen (Piel et al. 2004b).

Die in dieser Arbeit erstellte Metagenombank APAE02 liefert einen ersten Zugang zu den Genomäquivalenten bzw. den Genpool des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba*. Die Präsenz bisher nicht kultivierter bakterieller Abstammungslinien wie dem Candidatus Phylum *Poribacteria*, von bekannten naturstoff-produzierenden bakteriellen Abstammungslinien wie *Cyanobacteria* und *Actinobacteria* und die hohe Dichte an charakteristischen Naturstoffen verspricht Einblicke in bisher nicht beschriebene Stoffwechselwege.

### 5.5.1 Abdeckung von Metagenombanken

Die Abdeckung einer Genbank beschreibt, wie viele Klone einer bestimmten Insertgröße von einem bestimmten Genom vorhanden sein müssen, um jede beliebige Sequenz des Genoms mit einer bestimmten Wahrscheinlichkeit archiviert zu haben. Die Abdeckung von Genbanken kann nach folgender Formel bestimmt werden:

$$N = \ln(1-W) / \ln(1-f)$$

N: Anzahl an Klonen; W: gewollte Wahrscheinlichkeit jede Sequenz des Genoms kloniert zu haben; f: Quotient aus Insertgröße und Genomgröße.

Aufgrund der hohen mikrobiellen Diversität des Ausgangsmaterials ist die Metagenombank APAE02 nicht abdeckend, und liefert eher einen „Schnappschuss“ des entsprechenden Genpools. Der Metagenomklon 64K2 repräsentiert das einzige poribakterielle genomische Fragment, welches einen 16S rRNA Gen Locus kodiert und in dieser Arbeit identifiziert werden konnte. Angrenzende Fragmente konnten nicht detektiert werden. Wegen der gleichen



Häufigkeit von *Poribacteria* und *Chloroflexi* hätten durch den eingesetzten DGGE-Screen erwartungsgemäß jeweils ähnlich viele 16S rRNA kodierende Klone dieser Phyla detektiert werden müssen. Wie jedoch aus vergleichenden Analysen zwischen *Poribacteria* und *Planctomycetes* hervorgeht, könnten *Poribacteria* nur eine Kopie des 16S rRNA Gens zu besitzen. Daher ist der Nachweis mehrerer poribakterieller 16S rRNA kodierenden Klone in der Metagenombank APAE02 aus statistischen Gründen relativ unwahrscheinlich. Eine Detektion weiterer poribakterieller DNA Fragmente könnte eine Analyse terminaler Insertsequenzen aus der Metagenombank APAE02 liefern. Durch Gegenüberstellung der GC-Gehalte und Tetranukleotidfrequenzen können DNA Fragmente unterschiedlicher Organismen untereinander zugeordnet werden (Treusch et al. 2004, Teeling et al. 2004) Damit würden weitere Einblicke in die Genomstruktur der *Poribacteria* ermöglicht. Das in der vorliegenden Arbeit charakterisierte genomische Fragment eines unkultivierten *Poribakteriums* stellt den ersten Ansatzpunkt für das Assemblieren weiterer genomischer Fragmente dar.

Handelsman (2004) beschreibt, dass für die Erstellung einer einfach abdeckenden Metagenombank aus marinen Bakterioplankton (200 Arten pro ml) 1 Gb individueller DNA Fragmente kloniert werden müsste. Eine vergleichbare Metagenombank ausgehend vom mikrobiellen Konsortium aus Böden ( $1 \times 10^4$  Arten pro g) bedarf der Klonierung von 50 Gb für eine einfache Abdeckung der jeweiligen Genome. Ausgehend von ca. 40 kb eines genomischen Fragmentes pro Metagenomklon muss eine solche Genbank ca.  $1,3 \times 10^6$  Klone umfassen. Der Anteil unterschiedlicher prokaryontischer Arten innerhalb der assoziierten Bakterien aus Demospongiae sollte Schätzungen zufolge in der Größenordnung von  $10^3$  liegen. Demnach sollte eine einfache Abdeckung der unterschiedlichen Genome innerhalb einer Metagenombank bei einem Umfang von 5-10 Gb (ca.  $2,6 \times 10^5$  Klone) ermöglicht werden. Metagenombanken dieser Ausmaße konnten bisher noch nicht konstruiert werden. Die in dieser Arbeit erstellte Metagenombank lieferte annähernd  $3 \times 10^4$  Klone und umfasst 1,1 Gb, was ca. 200 Genomäquivalenten entspricht. Somit ist es einerseits notwendig die Kapazität von Metagenombanken zu erhöhen, indem z.B. BAC-Vektoren für die Klonierung von bis zu max. 300 kb pro Klon benutzt werden, sofern es überhaupt möglich ist hoch molekulare DNA dieser Größe *ex situ* aus einer Umweltprobe isolieren zu können. Andererseits erscheint es notwendig die hohe Diversität im Ausgangsmaterial zu verringern. Dazu könnten Anreicherungskulturen verwendet werden oder Zellen aus einem Konsortium physikalisch mittels Dichtegradientenzentrifugation oder „cell sorting“ mittels FACS Apparaturen getrennt und angereichert werden. Schleper et al. (1998) konstruierten Fosmid-

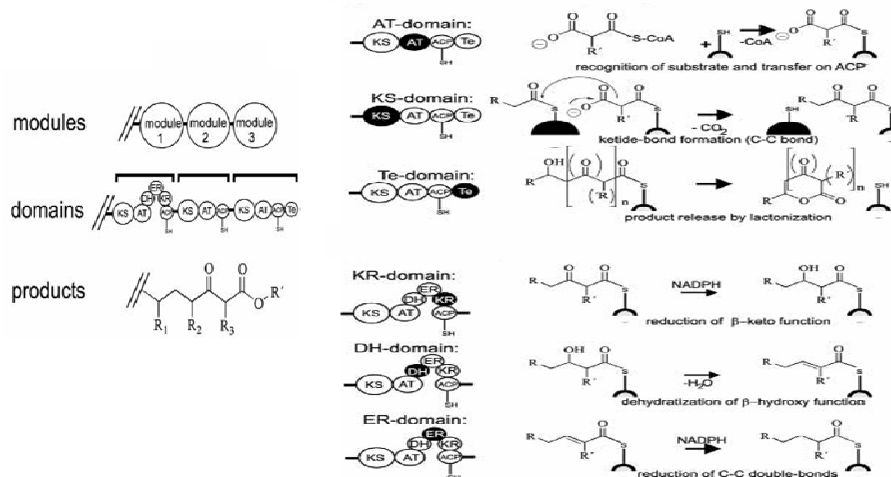
Genbanken aus einer mittels Dichtegradientenzentrifugation angereicherten Zellfraktion von *C. symbiosum* aus dem marinen Schwamm *Axinella mexicana*. In der Studie konnten aus ca. 12300 Klonen mit einer durchschnittlichen Insertgröße von ca. 40 kb fünfzehn *C. symbiosum* 16S rRNA kodierende Klone identifiziert werden. Tyson et al. (2004) zeigten, dass ausgehend von einer geringen Biodiversität des Ausgangsmaterials Metagenombanken eine hohe Abdeckung genomischer Bereiche erreichen können. Diese Arbeitsgruppe klonierte eine Metagenombank aus einem natürlichen Biofilm in „low-copy“ Vektoren. 16S rRNA Gensequenzanalysen und FISH zufolge wird dieser Biofilm aus sechs prokaryontischen Arten gebildet. So konnten zwei Genome (*Leptospirillum* sp. und *Ferroplasma* sp.) annähernd vollständig geschlossen und drei weitere partiell assembliert werden. Die Annotation dieser Genome erlaubte detaillierte *in silico* Einblicke in die zelluläre Organisation und physiologischen Eigenschaften dieser Organismen und kann prinzipiell auf jeden unkultivierten Mikroorganismus übertragen werden.

Da die erstellte Metagenombank APAE02 nicht ausschließlich der Detektion poribakterieller genomischer DNA Fragmente diente, sondern darüber hinaus funktionell charakterisiert werden sollte, ist eine Anreicherung bestimmter prokaryontischer Zellfraktionen nicht vorgenommen worden. Vielmehr ist durch diese Arbeit die Methodik der *ex situ* Isolation hoch molekularer DNA aus Umweltproben und deren Klonierung in Fosmid-Vektoren auf das Modellsystem *A. aerophoba* erfolgreich übertragen worden.

## 5.6 Polyketidsynthesen (PKS)

Polyketide sind eine intensiv untersuchte Stoffgruppe innerhalb der Sekundärmetabolite. Unter der großen Anzahl bisher beschriebener Polyketide finden sich viele mit pharmakologisch wertvollem Potenzial, wie z.B. Antibiotika und Immunsuppressoren, aber auch Substanzen mit antitumorale, fungizider oder antiparasitärer Aktivität. Ein detaillierter Übersichtsartikel über Polyketide und deren Synthesen ist von Schwarzer und Marahiel 2001 publiziert worden.

Die Biosynthese von Polyketiden wird von Polyketidsynthesen (PKS) katalysiert. Dem linearen Aufbau der Polyketide entsprechend bestehen PKS aus mehreren sich wiederholenden, kolinear aufgebauten, multifunktionalen Modulen (Typ I). Jedes Modul katalysiert die schrittweise Kondensation kleiner Carbonsäuren. Dabei sind verschiedene Domänen eines Moduls verantwortlich für die einzelnen Reaktionsschritte. Eine Synthese beginnt mit der Aufnahme eines aktivierten Acyl-CoA Monomers über die Acyltransferase Domäne (AT). Acyl-CoA wird an ein Acyl-Trägerprotein (ACP) und anschließend an eine Ketosynthase Domäne (KS) weitergegeben. Die KS Domäne katalysiert die Decarboxylierung und Kondensation der Carbonsäuren. In TypI-PKSs können die neu gebildeten  $\beta$ -Karbonylgruppen abschließend reduziert werden (Ketoreduktase Domäne (KR), Dehydratase Domäne (DH) oder Enoylreduktase Domäne (ER)), was zu einer großen strukturellen Diversität von Polyketiden führt. Nachdem Elongation und Reduktion abgeschlossen sind, wird die Ketidkette auf eine Thioesterase Domäne (TE) übertragen, welche für die Freisetzung des Polyketides verantwortlich ist. Abbildung 32 zeigt schematisch die PKS Typ I Organisation. Typ I PKS Systeme sind überwiegend bakteriellen Ursprungs, während Typ II Systeme überwiegend bei Pilzen vorkommen. Typ II PKS besitzen nur ein einziges Modul für die Synthese des oft aromatischen Polyketids. Der generelle Reaktionsmechanismus ist dem der Typ I Systeme ähnlich. Typ III Systeme werden hier nicht näher erläutert.



**Abbildung 32** Schematische Darstellung des modularen Aufbaus der Polyketidsynthasen (PKS) und der jeweils katalysierten Reaktionen der einzelnen Domänen. Erläuterung im Text (aus Schwarzer and Marahiel 2001).

Aufgrund hoch konservierter Aminosäuremotive können Ketosynthase-Domänen mittels degenerierten Primern via PCR in komplexen Metagenombanken präzise identifiziert werden (Piel 2002, Piel et al. 2004a, Courtois et al. 2003). Phylogenetische Analysen der KS Domäne erlauben eine Unterscheidung zwischen cis- und trans-AT PKS Typ I Systemen (Piel et al. 2004a) bei denen die AT-Domäne entweder im selben ORF wie die restlichen Domänen (cis-AT), oder in einem separaten ORF kodiert werden (trans-AT).

Die Mehrzahl der PKS Systeme aus marinen Demospongiae kann nicht den klassischen cis- oder trans-AT PKS Typ I Systemen von *Bacillus sp.*, *Pseudomonadales sp.*, *Actinobacteria sp.*, *Myxococcales sp.* oder *Cyanobacteria sp.* zugeordnet werden. Vielmehr bilden diese Systeme eine unabhängige PKS Gruppe, welche aufgrund der Lokalisation der AT-Domäne verwandt mit cis-AT Systemen zu sein scheint. Die Struktur der kodierten ORFs deutet auf einen bakteriellen Ursprung hin. Neben den PKS Systemen aus marinen Demospongiae können außerdem einzelne PKS Systeme aus dem Bakterioplankton dieser Gruppe zugeordnet werden, was auf eine ubiquitäre Verbreitung dieser Systeme im Meer hindeutet. Auffällig ist, dass die PKS Systeme nur von einem einzigen Modul gebildet werden, dessen kodierender Bereich nur relativ klein ist. Solche Systeme sind bisher nicht beschrieben worden. Die jeweiligen kodierenden Bereiche klassischer multimodularer Typ I PKS Systeme erstrecken sich über 20-100 kb. Die PKS Systeme des „Demospongiae-clusters“ ähneln daher eher solchen aus Pilzen und eukaryontischen Fettsäuresynthasen als bakteriellen Systemen. Voraussichtlich synthetisieren diese PKS Systeme unbekannte Fettsäuren (persönliche Mitteilung J. Piel, MPI Jena). Die Funktion dieser hypothetischen Fettsäuren bleibt

unbekannt. Eine heterologe funktionelle Expression dieser PKS Systeme könnte in *E. coli* etabliert werden, was zu einer Strukturanalyse der entsprechenden Produkte und Einblicke in deren Funktion führen könnte.

## 5.7 Funktionsbasierte Aktivitätsscreens

Die Detektion von 10 hämolytischen Klonen aus einem Repertoire von ca.  $3 \times 10^4$  zeigt, dass einzelne Genprodukte aus phylogenetisch diversen Mikroorganismen nach Klonierung in *E. coli* mittels funktioneller Screens prinzipiell erfasst werden können. Dies wurde auch in früheren Studien gezeigt (Gillespie et al. 2002, Lorenz et al. 2002, Rondon et al. 2000). Die genetische Determinate dieses Phänotyps konnte in dieser Arbeit nicht charakterisiert werden. Prinzipiell kann ein hämolytischer Phänotyp durch sezernierte Phospholipasen, Porine oder niedermolekulare Substanzen verursacht werden (Rowe and Welch 1994, Gillespie et al. 2002). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass die identifizierten Klone Regulatoren kodieren, welche die Expression des kryptischen Hämolytins von *E. coli* aktivieren.

Allgemein ist die Expression spezifischer metagenomischer Gene ausgehend von deren intrinsischen Promotoren sehr ineffizient in *E. coli*. Dennoch sind neue biotechnologisch wertvolle Enzyme aus Metagenombanken identifiziert worden. Sehr elegante Screens wurden z.B. in Deletionsmutanten von *E. coli* durchgeführt, deren Phänotyp durch Transformation metagenomischer Genprodukte komplementiert werden konnte (Knietsch et al. 2003). Courtois et al. (2003) konnten antimikrobiell aktive Klone und neue Naturstoffe aus Metagenombanken isolieren und charakterisieren.

Eine native Analyse heterolog in *E. coli* exprimierter Enzyme kann aufgrund der phylogenetischen Entfernung zwischen Expressionsstämmen und „biologischer Quelle“ schwer sein, da z.B. wichtige Kofaktoren nicht vorliegen könnten. Eine Verbesserung der Effizienz der funktionsbasierten Screens liefert daher ggf. der Einsatz von „shuttle“- und Expressionsvektoren, um klonierte Metagenomfragmente in unterschiedlichen Expressionsstämmen, wie z.B. *Streptomyces*, *Pseudomonas* oder gram-positiven Organismen wie *Bacillus*, testen zu können. Darüber hinaus ist mittlerweile ein neu konstruierter *E. coli* Stamm erhältlich, der durch zusätzliche tRNA kodierende Gene in der Lage ist selten verwendete Codons zur funktionellen Translation der entsprechenden mRNAs zu erkennen (BL-21 codon plus). Eine weitere Effizienzsteigerung könnte durch Bereitstellung alternativer sigma-Faktoren gewährleistet werden.

## 5.8 Ausblick

Innerhalb des mikrobiellen Konsortiums von *A. aerophoba* konnte durch kultivierungsunabhängige Ansätze das neue, bisher unbekanntes Candidatus Phylum *Poribacteria* identifiziert werden. Durch die *ex situ* Klonierung genomischer DNA konnte der poribakterielle 16S rRNA Genlokus beschrieben werden und liefert somit einen ersten Ansatzpunkt für weitere genomische Untersuchungen an *Poribacteria*. Ausgehend vom GC-Gehalt und durch die Analyse von Tetranukleotidsequenzen dieses Genomfragments könnten zukünftig weitere poribakterielle Genomfragmente durch Sequenzierung identifiziert und anschließend annotiert werden. Um eine höhere Abdeckung des poribakteriellen Genoms in Metagenombanken zu erhalten, könnten Zellpräparationen des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* physikalisch durch Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt werden. Dadurch würde die mikrobielle Diversität im Ausgangsmaterial gegebenenfalls verringert. Präparationen hoch molekularer DNA könnten in Abhängigkeit des GC-Gehalts vor der Klonierung fraktioniert werden, um nur solche DNA Fragmente zu klonieren, die einen poribakteriellen GC-Gehalt von ca. 50% besitzen. So könnte die vollständige Zusammensetzung eines poribakteriellen Genoms gelingen. Durch diese *in silico* Beschreibung könnten Stoffwechselwege und funktionelle Charakteristika entdeckt werden, die die Biologie der *Poribacteria* detaillierter wiedergeben. Aufgrund der phylogenetisch entfernten Position zu anderen bakteriellen Phyla und des Auftretens ungewöhnlicher subzellulärer Strukturen wie dem nukleus-ähnlichen Kompartiment könnten *Poribacteria* einen ungewöhnlichen Genpool besitzen. Vergleiche zum Genpool von *Planctomycetes* könnten die Divergenz zwischen diesen Abstammungslinien und deren Evolution deutlicher hervorheben.

Ob ausgehend von genomischer Information ein Mikroorganismus selektiv kultiviert werden kann, ist bisher noch nicht gezeigt worden. Letztendlich würde die Kultivierung eines Poribakteriums sicherlich enorm zur Beschreibung dieses Phylums beitragen. Daher erscheint es angebracht neue innovative Kultivierungsmethoden, welche z.T. bereits für Hochdurchsatzkultivierungsversuche eingesetzt werden können, für die Isolierung der *Poribacteria* heranzuziehen.

## 6. Literatur

**Althoff, K., Schütt, C., Steffen, R., Batel, R., and Müller, W. E. G.** 1998. Evidence for a symbiosis between bacteria of the genus *Rhodobacter* and the marine sponge *Halichondria panicea*: Harbor also for putatively toxic bacteria? *Mar Biol* 130:529-536.

**Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3404.

**Amann, R., Ludwig, W., and Schleifer, K. H.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59: 143-169.

**Behrens, S., Rühland, C., Inácio, J., Huber, H., Fonseca, Á., Spencer-Martins, I., Fuchs, B. M., and Amann, R.** 2003. In situ accessibility of small-subunit rRNA of members of the domains bacteria, archaea, and eucarya to Cy3-labeled oligonucleotide probes. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1748-1758.

**Beja, O., Suzuki, M. T., Koonin, E. V., Aravind, L., Hadd, A., Nguyen, L. P., Villacorta, R., Amjadi, M., Garrigues, C., Jovanovich, S. B., Feldman, R. A., DeLong, E. F.** 2000a. Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol* 2(5): 516-29.

Beja, O., Aravind, L., Koonin, E. V., Suzuki, M. T., Hadd, A., Nguyen, L.P., Jovanovich, S. B., Gates, C.M., Feldman, R. A., Spudich, J. L., Spudich, E. N., and DeLong, E. F. **2000b. Bacterial rhodopsin: evidence for a new type of phototrophy in the sea. *Science* 289: 1902-1906.**

**Beja, O.** 2004. To BAC or not to BAC: marine ecogenomics. *Curr Opin in Biotechnol* 15:187-190.

Bergquist, P. R. **1978. Sponges. University of California Press, Berkeley.**

- Bläse, M., Bruntner, C., Tshisuaka, B., Fetzner, S., and Lingens, F.** 1996. Cloning, expression, and sequence analysis of the three genes encoding quinoline 2-oxidoreductase, a molybdenum-containing hydroxylase from *Pseudomonas putida* 86. *J Biol Chem* 271(38): 23068-23079.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T., and Prinsep, M. R.** 2004. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 21: 1-49.
- Böhm, M., Schroder, H. C., Muller, I. M., Muller, W. E., and Gamulin, V.** 2000. The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is conserved in metazoans: cloning and activation of p38 of the SAPK2 subfamily from the sponge *Suberites domuncula*. *Biol Cell* 92:95-104.
- Brackmann, R., and Fuchs, G.** 1993. Enzymes of anaerobic metabolism of phenolic compounds. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from a denitrifying *Pseudomonas* species. *Eur J Biochem* 213(1): 563-571.
- Brady, S. F. and Clardy, J.** 2000. Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J Am Chem Soc* 122: 12903-12904.
- Breese K., and Fuchs G.** 1998. 4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase (dehydroxylating) from the denitrifying bacterium *Thauera aromatica*--prosthetic groups, electron donor, and genes of a member of the molybdenum-flavin-iron-sulfur proteins. *Eur J Biochem* 251(3):916-923.
- Brummer, I. H., Felske, A. D., and Wagner-Dobler, I.** 2004. Diversity and seasonal changes of uncultured *Planctomycetales* in river biofilms. *Appl Environ Microbiol* 70(9):5094-5101.
- Brusca, R. C., and Brusca, G. J.** 1990. Phylum Porifera: The sponges, p. 181-210. In A. D. Sinauer (ed.), *Invertebrates*. Sinauer Press, MA, U.S.A.



Capela, D., Barloy-Hubler, F., Gouzy, J., Bothe, G., Ampe, F., Batut, J., Boistard, P., Becker, A., Boutry, M., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Kahn, D., Kiss, E., Lelaure, V., Masuy, D., Pohl, T., Portetelle, D., Puehler, A., Purnelle, B., Ramsperger, U., Renard, C., Thebault, P., Vandenbol, M., Weidner, S., and Galibert, F. 2001. Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98(17): 9877-9882.

Carney, J. R. and Rinehart, K. L. 1995. Biosynthesis of brominated tyrosine metabolites by *Aplysina fistularis*. *J Nat Prod* 58: 971-985.

Chouari, R., Le Paslier, D., Daegelen, P., Ginestet, P., Weissenbach, J., and Sghir, A. 2003. Molecular evidence for novel planctomycete diversity in a municipal wastewater treatment plant. *Appl Environ Microbiol* 69(12): 7354-7363.

Cockburn, A. 1995. Der ökologische Kontext der Speziation. *In: Evolutionsökologie.* S. 231-254. Gustav Fischer Verlag. ISBN 3-437-30775-4.

Cole, J. R., Chai, B., Marsh, T. L., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam, S. A., Chandra, S., McGarrell, D. M., Schmidt, T. M., Garrity, G. M., and Tiedje, J. M. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res* 31(1):442-443.

Courtois, S., Capellano, C. M., Ball, M., Francou, F.-X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S. J., Hopke, J., Osburn, M. S., August, P. R., Nalin, R., Guérineau, M., Jeannin, P., Simonet, P., and Pernodet, J.-L. 2003. Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* 69(1): 49-55.

Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G., and Elofsson, A. 1997. Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot Eng* 10(6): 673-676.

Currie, C. R., Wong, B., Stuart, A. E., Schultz, T. R., Rehner, S. A., Mueller, U. G., Sung, G.-H., Spatafora, J. W., and Straus, N. A. 2003. **Ancient tripartite coevolution in the attine ant-microbe symbiosis.** *Science* 299: 386-388.

Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, K. H., and Wagner, M. 1999. **The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set.** *Syst Appl Microbiol* 22:434-444.

Derakshani, M., Lukow, T., and Liesack, W. 2001. **Novel bacterial lineages at the (sub)division level as detected by signature nucleotide-targeted recovery of 16S rRNA genes from bulk soil and rice roots of flooded rice microcosms.** *Appl Environ Microbiol* 67(2):623-631.

Dojka, M. A., Harris, J. K., and Pace, N. R. 2000. **Expanding the known diversity and environmental distribution of an uncultured phylogenetic division of bacteria.** *Appl Environ Microbiol* 66(4):1617-1621.

Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K., and Pace, N. R. 1998. **Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation.** *Appl Environ Microbiol* 64(10):3869-3877.

Dunbar, J., Takala, S., Barns, S. M., Davis, J. A., and Kuske, C. R. 1999. **Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning.** *Appl Environ Microbiol* 65(4):1662-1669.

Ebel, R., Brenzinger, M., Kunze, A., Gross, H. J., and Proksch, P. 1997. Wound activation of protoxins in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *J Chem Ecol* 23: 1451-62.

Engels, C. 2005. Molekulare Studien zur Verbreitung des Candidatus Phylums *Poribacteria* in marinen Schwämmen. Diplomarbeit, Universität Würzburg.

Faulkner, D. J. 2002. Marine natural products. *Nat Prod Rep* 19: 1-48.

**Friedrich, A.B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P., and Hentschel, U.** 1999. Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar Biol* 134: 461-470.

**Friedrich, A. B., Hacker, J., Fischer, I., Proksch, P., and Hentschel, U.** 2001. Temporal variations of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol* 38: 105-113.

**Fuerst, J. A.** 1995. The *planctomycetes*: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiol* 141: 1493-1506.

**Fuerst, J. A., Webb, R. I., Garson, M. J., Hardy, L., and Reiswig H. M.** 1998. Membrane-bounded nucleoids in microbial symbionts of marine sponges. *FEMS Microbiol Let* 166:29-34.

**Fuerst, J. A., Webb, R. I., Garson, M. J., Hardy, L., and Reiswig, H. M.** 1999. Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem Queensland Museum* 44: 193-203.

**Galibert, F., Finan, T. M., Long, S. R., Puhler, A., Abola, P., Ampe, F., Barloy-Hubler, F., Barnett, M. J., Becker, A., Boistard, P., Bothe, G., Boutry, M., Bowser, L., Buhrmester, J., Cadieu, E., Capela, D., Chain, P., Cowie, A., Davis, R. W., Dreano, S., Federspiel, N. A., Fisher, R. F., Gloux, S., Godrie, T., Goffeau, A., Golding, B., Gouzy, J., Gurjal, M., Hernandez-Lucas, I., Hong, A., Huizar, L., Hyman, R. W., Jones, T., Kahn, D., Kahn, M. L., Kalman, S., Keating, D. H., Kiss, E., Komp, C., Lelaure, V., Masuy, D., Palm, C., Peck, M. C., Pohl, T. M., Portetelle, D., Purnelle, B., Ramsperger, U., Surzycki, R., Thebault, P., Vandenbol, M., Vorholter, F. J., Weidner, S., Wells, D. H., Wong, K., Yeh, K. C., and Batut, J.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293 (5530): 668-672.

**Gibson, J., Dispensa, M., and Harwood, C. S.** 1997. 4-hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodospseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases. *J Bacteriol* 179(3): 634-42.

**Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M., Handelman, J.** 2002. Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* 68(9): 4301-4306.

**Glöckner, F. O., Fuchs, B. M., and Amann, R.** 1999. Bacterioplankton compositions of lakes and oceans: a first comparison based on fluorescence *in situ* hybridization. *Appl Environ Microbiol* 65: 3721-3726.

**Glöckner, F.O., Kube, M., Bauer, M., Teeling, H., Lombardot, T., Ludwig, W., Gade, D., Beck, A., Borzym, K., Heitmann, K., Rabus, R., Schlesner, H., Amann, R., and Reinhardt, R.** 2003. Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 100(14): 8298-8303.

**Grether-Beck, S., Igloi, G. L., Pust, S., Schilz, E., Decker, K., and Brandsch, R.** 1994. Structural analysis and molybdenum-dependent expression of the pAO1-encoded nicotine dehydrogenase genes of *Arthrobacter nicotinovorans*. *Mol Microbiol* 13(5): 929-936.

**Hallam, S. J., Putnam, N., Preston, C. M., Detter, J. C., Rokhsar, D., Richardson, P. M., and DeLong, E. F.** 2004. Reverse Methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* 305: 1457-1462.

**Handelsman, J.** 2004. Soils – the Metagenomics Approach. p. 109-119. In A. T. Bull (ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*.

**Hänzelmann, P., Dobbek, H., Gremer, L., Huber, R., and Meyer, O.** 2000. The effect of intercellular molybdenum in *Hydrogenophaga pseudoflava* on the crystallographic structure of the seleno-molybdo-iron-sulfur flavoenzyme carbon monoxide dehydrogenase. *J Mol Biol* 301: 1221-1235.

**Haygood, M. G., Schmidt, E. W., Davidson, S. K., Faulkner, D. J.** 1999. Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. *J Mol Microbiol Biotechnol* 1: 33-43.

- Head, I. M., Saunders, J. R., and Pickup, R. W.** 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultured microorganisms. *Microb Ecol* 35: 1-21.
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G., and Daniel, R.** 2000. Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 65:3901-3907.
- Henne, A., Bruggemann, H., Raasch, C., Wiezer, A., Hartsch, T., Liesegang, H., Johann, A., Lienard, T., Gohl, O., Martinez-Arias, R., Jacobi, C., Starkuviene, V., Schlenczeck, S., Dencker, S., Huber, R., Klenk, H. P., Kramer, W., Merkl, R., Gottschalk, G., and Fritz, H. J.** 2004. The genome sequence of the extreme thermophile *Thermus thermophilus*. *Nat Biotechnol* 22(5): 547-53.
- Hentschel, U., Steinert, M., and Hacker, J.** 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends in Microbiol* 8(5): 226-231.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., and Moore, B. S.** 2002. Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* 68: 4431-4440.
- Hentschel, U., Fieseler, L., Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., and Horn, M.** 2003. Microbial diversity of marine sponges. p. 59-88. In W.E.G. Müller (ed.), *Molecular marine biology of sponges*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Hidebrand, M., Waggoner, L. E., Lim, G. E., Sharp, K. H., Ridley, C. P., and Haygood, M. G.** 2004. Approaches to identify, clone, and express symbiont bioactive metabolite genes. *Nat Prod Rep* 21: 122-142.
- Hill, C. W.** 1999. Large genomic sequence repetitions in bacteria: lessons from rRNA operons and *Rhs* elements. *Res Microbiol* 150: 665-674.
- Hill, R. T.** 2004. Microbes from marine sponges: a treasure trove of biodiversity for natural products discovery. p. 177-190. In A. T. Bull (ed.), *Microbial Diversity and Bioprospecting*.

**Hooper, J. N. A., and van Soest, R. W. M.** 2002. *Systema Porifera*. A guide to the classification of sponges. Volume 1. Kluwer Academic, Plenum Publishers.

**Horn, M., Collingro, A., Schmitz-Esser, S., Beier, C. L., Purkhold, U., Fartmann, B., Brandt, P., Nyakatura, G. J., Droege, M., Frishman, D., Rattei, T., Mewes, H.-W., and Wagner, M.** 2004. Illuminating the evolutionary history of chlamydiae. *Science* 304: 728-730.

**Hugendieck, I., and Meyer, O.** 1992. The structural genes encoding CO dehydrogenase subunits (cox L, M and S) in *Pseudomonas carboxydovorans* OM5 reside on plasmid pHCG3 and are, with the exception of *Streptomyces thermoautotrophicus*, conserved in carboxydrotrophic bacteria. *Arch Microbiol* 157(3): 301-304.

**Hugenholtz, P., Goebel, B. M., and Pace, N. R.** 1998a. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 180: 4765-4774.

**Hugenholtz, P., Pitulle, C., Hershberger, K. L., and Pace, N. R.** 1998b. Novel division level bacterial diversity in a Yellowstone hot spring. *J Bacteriol* 180(2):366-376.

**Hugenholtz, P., Tyson, G. W., Webb, R. I., Wagner, A. M., and L. L. Blackall.** 2001. Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain Bacteria with no known pure-culture representatives. *Appl Environ Microbiol* 67(1):411-419.

**Hugenholtz, P., Tyson, G. W., and Blackall, L. L.** 2002. Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol* 179:29-42.

**Hugenholtz, P.** 2002. Exploring prokaryotic diversity in the genomic era. *Genome Biol* 3(2):REVIEWS0003.

**Imhoff, J. F., and Stöhr, R.** 2003. Sponge-associated bacteria: General overview and special aspects of bacteria associated with *Halichondria panicea*. p35-56. In W.E.G. Müller (ed.), *Molecular Marine Biology of Sponges*. Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.

**Jensen, P. R. and Fenical, W.** 1996. *J Ind Microb Biotechnol* 17: 346-351.

**Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M., and Tabata, S.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* 7 (6): 331-338.

**Keller, M., and Zengler, K.** 2004. Tapping into microbial diversity. *Nature Review Microbiol* 2: 141-150.

**Knietsch, A., Waschowitz, T., Bowien, S., Henne, A., and Daniel, R.** 2003. Construction and screening of metagenomic libraries derived from enrichment cultures: generation of a gene bank for genes conferring alcohol oxidoreductase activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 69(3): 1408-1416.

**Knoche, K., and Kephart, D.** 1999. Cloning blunt-end *Pfu* DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM<sup>®</sup> T vector systems. *Promega Notes* 71:10-14.

**Kreuter, M. H., Leake, R. E., Rinaldi, F., Müller-Klieser, W., Maidhof, A., Müller, W. E. G., and Schröder, H. C.** 1990. Inhibition of intrinsic protein tyrosin kinase activity of EGF-receptor kinase complex from human breast cancer cells by the marine sponge metabolite (+)-aeropylsinin-1. *Comp Biochem Physiol B* 97: 151-158.

**Kurtz, S., and Schleiermacher, C.** 1999. Fast Computation of Maximal Repeats in Complete Genomes. *Bioinformatics* 15(5): 426-427.

**Lane, D. J.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom.

Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K. H., and Wagner, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography-a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. *Appl Environ Microbiol* 65: 1289-1297.

Leimkühler, S., Kern, M., Solomon, P. S., McEwan, A. G., Schwarz, G., Mendel, R. R. and Klipp, W. 1998. Xanthine dehydrogenase from the phototrophic purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* is more similar to its eukaryotic counterparts than to prokaryotic molybdenum enzymes. *Mol Microbiol* 27(4): 853-869.

Li, C. W., Chen, J. Y., and Hua, T. E. 1998. Precambrian sponges with cellular structures. *Science* 279:879-882.

Liesack, W., and Stackebrandt, E. 1989. Evidence for unlinked rrn operons in the planctomycete *Pirellula marina*. *J Bacteriol* 171(9): 5025-5030.

Liesack W., and Stackebrandt, E. 1992. Occurrence of novel groups of the domain *Bacteria* as revealed by analysis of genetic material isolated from an Australian terrestrial environment. *J Bacteriol* 174:5072-8.

Liles, M. R., Manske, B. F., Bintrim, S. B., Handelsman, J., and Goodman, R. M. 2003. A census of rRNA genes and linked genomic sequences within a soil metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* 69(5):2684-91.

Lindsay, M. R., Webb, R. I., and J. A. Fuerst. 1997. **Pirellosomes: a new type of membrane-bounded cell compartment in planctomycete bacteria of the genus *Pirellula*.** *Microbiol* 143:739-748.

Lopez, J. V., McCarthy, P. J., Janda, K. E., Willoughby, R., and Pomponi, S. A. 1999. Molecular techniques reveal wide phylogenetic diversity of heterotrophic microbes associated with *Discodermia* spp. (Porifera: Demospongiae). *Mem Queensland Museum* 44:329-341.

Loy, A., Horn, M., and Wagner, M. 2003. probeBase - an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 31:514-516.



**López-García, P., St Jean, A., Amils, R., and Charlebois, R. L.** 1995. Genomic stability in the archaea *Haloferax volcanii* and *Haloferax mediterranei*. *J Bacteriol* 177:1405-1408.

**López-García, P., Brochier, C., Moreira, D., and Rodríguez-Valera, F.** 2004. Comparative analysis of a genome fragment of an uncultivated mesopelagic crenarchaeote reveals multiple horizontal gene transfers. *Environ Microbiol* 6(1): 19-34.

**Lorenz, P., Liebeton, K., Niehaus, F., and Eck, J.** 2002. Screening for novel enzymes for biocatalytic processes: accessing the metagenome as a resource of novel functional sequence space. *Curr Opin in Biotechnol* 13: 572-577.

**MacNeil, I. A., Tiong, C .L., Minor, C., August, P. R., Grossman, T. H., and Loiacono, K. A.** 2001. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3: 301-308.

**Madrid, V. M., Aller, J. Y., Aller, R. C. and Chistoserdov, A. Y.** 2001. High prokaryote diversity and analysis of community structure in mobile mud deposits off French Guiana: identification of two new bacterial candidate divisions. *FEMS Microbiol Ecol* 37:197-209.

**Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J.** 1989. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.

**Meyer, O., and Schlegel, H. G.** 1983. Biology of aerobic carbon monoxide-oxidizing bacteria. *Annu Rev Microbiol* 37:277-310.

Mummey, D. L., and P. D. Stahl. **2003. Candidate division BD : phylogeny, distribution and abundance in soil ecosystems. *Syst Appl Microbiol* 26 (2):228-235.**

**Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., and Wawer, C.** 1998. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol Microb Ecol* 3.4.4: 1-27.

- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H., and Schleifer, K. H.** 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomycetes with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiol* 144:3257-3266.
- Nelson, K. E.** 2003. The future of microbial genomics. *Environ Microbiol* 5(12): 1223-1225.
- Nelson, K. E.** 2004. Genomics. p. 250-259. In A. T. Bull (ed.) Microbial diversity and Bioprospecting.
- Olsen, G. J., Lane, S. J., Giovannoni, S. J., and Pace, N. R.** 1986. Microbial Ecology and Evolution: A ribosomal RNA Approach. *Ann Rev Microbiol* 40: 337-365.
- Pace, N. R.** 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276: 734-740.
- Page, R. D. M.** 1996. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* 12: 357-358.
- Piel, J.** 2002. A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultivated bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99:14002-14007.
- Piel, J., Hui, D., Fusetani, N., and Matsunaga, S.** 2004a. Targeting modular polyketide synthases with iteratively acting acyltransferases from metagenomes of uncultured bacterial consortia. *Environ Microbiol* 6(9): 921-927.
- Piel, J., Hui, D., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N., and Matsunaga, S.** 2004b. Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(46): 16222-16227.
- Piel, J.** 2004c. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* 21:519-538.
- Piel, J., Höfer, I., and Hui, D.** 2004d. Evidence for a symbiosis island involved in horizontal acquisition of pederin biosynthetic capabilities by the bacterial symbiont of *Paederus fuscipes* beetles. *J Bacteriol* 186(5): 1280-1286.

- Pile, A. J.** 1997. Finding Reiswig`s missing carbon: quantification of sponge feeding using dual-beam flow cytometry. *Proc 8<sup>th</sup> Int Coral Reef Symp* 2:1403-1410.
- Pimentel-Elardo, S., Wehrl, M., Friedrich, A. B., Jensen, P. R., and Hentschel, U.** 2003. Isolation of *Planctomyces* from *Aplysina* sponges. *Aquat Microb Ecol* 33: 239-245.
- Preston, C. M., Wu, K. Y., Molinski, T. F., and DeLong, E. F. **1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov.. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93:6241-624.**
- Proksch, P., Edrada, R. A., and Ebel, R.** 2002. Drugs from the seas: current status and microbiological implications. *Appl Microbiol Biotechnol* 59: 125-134.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Klenk, H. P., Kletzin, A., Treusch, A. H., Meurer, G., Eck, J., Sensen, C. W., Schleper, C.** 2002. First insight into the genome of an uncultivated crenarchaeote from soil. *Environ Microbiol* 4(10):603-11.
- Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S. C., Treusch, A. H., Eck, J., Schleper, C.** 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol Microbiol* 50(2):563-75.
- Rappé, M. S., Connon, S. A., Vergin, K. L., and Giovannoni, S. J.** 2002. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. *Nature* 418:630-633.
- Reiswig, H.** 1974. Water transport, respiration and energetics of three tropical marine sponges. *J Exp Mar Biol Ecol* 14:231-249.
- Rebelo, J., Macieira, S., Dias, J. M., Huber, R., Ascenso, C. S., Rusnak, F., Moura, J. J. G., Moura, I., and Romão, M. J.** 2000. Gene sequence and crystal structure of the aldehyd oxidoreductase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774. *J Mol Biol* 297: 135-146.
- Retief, J. D.** 2000. Phylogenetic analysis using PHYLIP. *Methods Mol Biol* 132: 243-58.

Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D., and Handelsman, J. 2004. Metagenomics: Genomic analysis of microbial communities. *Annu Rev Genet* 38: 525-552.

Rondon, M. R., August, P. R., Bettermann, A. D., Brady, S. F., Grossman, T. H., Liles, M. R., Loiacono, K. A., Lynch, B. A., MacNeil, I. A., Minor, C., Tiong, C. L., Gilman, M., Osburne, M. S., Clardy, J., Handelsman, J., and Goodman, R. M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66: 2541-2547.

Rottmann, M., Schroeder, H. C., Gramzow, M., Renneisen, K., Kurelec, B., Dorn, A., Friese, U., and Mueller, W. E. 1987. Specific phosphorylation of proteins in pore complex-laminae from the sponge *Geodia cydonium* by the homologous aggregation factor and phorbol ester. Role of protein kinase C in the phosphorylation of DNA topoisomerase II. *EMBO J* 6: 3939-3944.

Rowe, G. E. and Welch, R. A. 1994. Assays of hemolytic toxins. *Methods Enzymol* 235: 657-667.

Ruepp, A., Graml, W., Santos-Martinez, M.L., Koretke, K.K., Volker, C., Mewes, H.W., Frishman, D., Stocker, S., Lupas, A.N., and Baumeister, W. 2000. The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407 (6803), 508-513.

Rützler, K. 1985. Associations between Caribbean sponges and photosynthetic organisms. *In: Rützler, K. (ed) New perspectives in sponge biology. Smithsonian Institution Press, Washington, DC, pp 455-466.*

Salomon, C. E., Magarvey, N. A., and Sherman, D. H. 2003. Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an even brighter future for marine natural product drug discovery. *Nat Prod Rep* 21: 105-121.

Sambrook, J., and Russell, D. W. 2001. **Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 3rd ed.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

**Schlegel, H. G.** 1992. Mikroorganismen als symbiontische Partner. *In: Allgemeine Mikrobiologie*. S. 571-581. 7. überarbeitete Auflage. Thieme Verlag. ISBN 3-13-444607-3.

**Schleper, C., Swanson, R. V., Mathur, E. J., and DeLong, E. F.** (1997). Characterization of a DNA-Polymerase from the uncultivated psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J Bacteriol* 179: 7803-7811.

Schleper, C., DeLong, E. F., Preston, C. M., Feldman, R. A., Wu, K. Y., and Swanson, R. V. **1998. Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *J Bacteriol* 180: 5003-5009.**

**Schloss, P. D., and Handelsman, J.** 2003. Biotechnological prospects from metagenomics. *Curr Opin Biotechnol* 14(3):303-10.

**Schmeisser, C., Stockigt, C., Raasch, C., Wingender, J., Timmis, K. N., Wenderoth, D. F., Flemming, H. C., Liesegang, H., Schmitz, R. A., Jaeger, K. E., and Streit, W. R.** 2003. Metagenome survey of biofilms in drinking-water networks. *Appl Environ Microbiol* 69(12): 7298-309.

Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M., Metzger, J. W., Schleifer, K. H., and Wagner, M. **2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *Syst Appl Microbiol* 23:93-106.**

**Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., and Haygood, M. G.** 2000. Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel  $\delta$ -proteobacterium, "Candidatus Entotheonella palauensis". *Mar Biol* 136: 969-977.

**Schmidt, S., Hentschel, U., Zea, S., Dandekar, T., and Wolf, M.** ITS-2 and 18S rRNA gene phylogeny of Aplysiniidae (Verongida, Demospongia). *J Mol Evol in press*.

- Schülke, J. P.** 2005. Die Entwicklung von Strategien zur Evaluierung mariner schwamm-assoziiertes mikrobieller Konsortien für die Wirkstoffgewinnung. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Schwarzer, D., and Marahiel, M. A.** 2001. Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* 88:93-101.
- Sharma, G. M., and Burkholder, P. R.** 1967. Studies on antimicrobial substances of sponges. Isolation, purification and properties of a new bromine-containing antimicrobial substance. *J Antibiot Tokyo Ser A* 20: 200-203.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikawa, H.** (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* 407:81-86.
- Studholme, D. J., Fuerst, J. A., and Bateman, A.** 2004. Novel protein domains and motifs in the marine planctomycete *Rhodopirellula baltica*. *FEMS Microb Let* 236: 333-340.
- Suzuki, M. T., Beja, O., Taylor, L. T., and DeLong, E. F.** (2001). Phylogenetic analysis of ribosomal RNA operons from uncultivated coastal marine bacterioplankton. *Environ Microbiol* 3(5): 323-331.
- Tamas, I., Klasson, L., Canback, B., Naslund, A. K., Eriksson, A. S., Wernegreen, J. J., Sandstrom, J. P., Moran, N. A., and Andersson, S. G.** 2002. 50 million years of genomic stasis in endosymbiotic bacteria. *Science* 296 (5577): 2376-2379.
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllöf, I., Kjelleberg, S., and Steinberg, P. D.** 2004. Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol* 6:121-130.
- Teeling, H., Meyerdierks, A., Bauer, M., Amann, R., and Glöckner, F. O.** 2004. Application of tetranucleotide frequencies for the assignment of genomic fragments. *Environ Microbiol* 6(9):938-947.

- Teeyapant, R., Kreis, P., Wray, V., Witte, L., and Proksch, P.** 1993. Brominated secondary compounds from the marine sponge *Verongida aerophoba* and the sponge feeding gastropod *Tyrodina perversa*. *Z Naturforsch* 48c: 640-644.
- Thoms, C., Horn, M., Wagner, M., Hentschel, U., and Proksch, P.** 2003. Monitoring microbial diversity and natural product profiles of the sponge *Aplysina cavernicola* following transplantation. *Mar Biol* 142: 685-692.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G.** 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nuc Acids Res* 25: 4876-4882.
- Thompson, J. E., Barrow, K. D., and Faulkner, J. D.** 1983. Localization of two brominated metabolites, arothionin and homoarothionin, in spherulous cells of the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongida thiona*). *Acta Zoo* (Stockh) 44: 199-210.
- Treusch, A. H., Kletzin, A., Raddatz, G., Ochsenreiter, T., Quaiser, A., Meurer, G., Schuster, S. C., and Schleper C.** 2004. Characterization of large-insert DNA libraries from soil for environmental genomic studies of Archaea. *Environ Microbiol* 6(9): 970-980.
- Turon, X., Galera, J., and Uriz, M. J.** 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J Exp Zool* 278:22-36.
- Turon, X., Becerro, M. A., and Uriz, M. J.** 2000. Distribution of brominated compounds within the sponge *Aplysina aerophoba*: coupling of X-ray microanalysis with cryofixation techniques. *Cell Tissue Res* 301: 311-322.
- Tymiak, A. A. and Rinehart, K. L.** 1981. Biosynthesis of dibromotyrosine-derived antimicrobial compounds from the marine sponge *Aplysina fistularis* (= *Verongida aurea*). *J Am Chem Soc* 103: 6763-6765.

**Tyson, G. W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E. E., Ram, R. J., Richardson, P. M., Solovyev, V. V., Rubin, E. M., Rokhsar, D. S., Banfield, J. F.** 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428(6978): 37-43.

**Unson, M. D., Holland, N. D., and Faulkner, D. J.** 1994. A brominated secondary metabolite synthesized by the cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystallin metabolite in the sponge tissue. *Mar Biol* 119: 1-11.

**Vacelet, J.** 1975. Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J Microsc Biol Cell* 23: 271-288.

**Vacelet, J., and Donadey, C.** 1977. **Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria.** *J Exp Mar Ecol* 30:301-314.

**Vergin, K. L., Urbach, E., Stein, J. L., DeLong, E. F., Lanoil, B. D., and Giovannoni, S. J.** 1998. Screening of a fosmid library of marine environmental genomic DNA fragments reveals four clones related to members of the order *Planctomycetales*. *Appl Environ Microbiol* 64(8):3075-3078.

**Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., Wu, D., Paulsen, I., Nelson, K. E., Nelson, W., Fouts, D. E., Levy, S., Knap, A. H., Lomas, M. W., Nealson, K., White, O., Peterson, J., Hoffman, J., Parsons, R., Baden-Tillson, H., Pfannkoch, C., Rogers, Y. H., and Smith, H. O.** 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304(5667): 66-74.

**Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H., and Schleifer, K. H.** 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl Environ Microbiol* 59: 1520-1525.

**Webster, N. S., and Hill, R. T.** 2001. The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhaphloeides odorabile* is dominated by an *alphaproteobacterium*. *Mar Biol* 138:843-851.



- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L., and Hill, R. T.** 2001a. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhodaloecia odorabile*. *Appl Environ Microbiol* 67:434-444.
- Webster, N. S., Webb, R. I., Ridd, M. J., Hill, R. T., and Negri, A. P.** 2001b. The effects of copper on the microbial community of a coral reef sponge. *Environ Microbiol* 3(1): 19-31.
- Wehrl, M.** 2001. Untersuchungen zur Interaktion des marinen Schwammes *Aplysina aerophoba* mit assoziierten Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Weiss, B., Ebel, R., Elbrächter, M., Kirchner, M., and Proksch, P.** 1996. Defense metabolites from the marine sponge *Verongida aerophoba*. *Biochem Syst Ecol* 24: 1-12.
- Wilkinson, C. R.** 1978a. Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar Biol* 49: 161-167.
- Wilkinson, C. R.** 1978b. Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar Biol* 49: 169-176.
- Wilkinson, C. R.** 1978c. Microbial associations in sponges. III. Ultrastructure of the in situ associations in coral reef sponges. *Mar Biol* 49: 177-185.
- Wilkinson, C. R., Garrone, G., and Vacelet, J.** 1984. Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron radioautography and *in situ* evidence. *Proc R Soc Lond B* 220:519-528.
- Wilkinson, C. R.** 1992. Symbiotic interactions between marine sponges and algae. In: Reisser, W. (ed) *Algae and symbioses*. Biopress, Bristol, pp 112-151.
- Willenz, P., and Hartmann, W. D.** 1989. Micromorphology and ultrastructure of caribbean sclerosponges. I. *Ceratoporella nicholsoni* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae, Porifera). *Mar Biol* 103:387-402.
- Woese, C. R.** 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-71.

**Woese, C. R., Kandler, O., and Wheelis, M. L.** 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87: 4576-4579.

**Wolfe, C. J., and Haygood, M. G.** 1993. Bioluminescent symbionts of the Caribbean flashlight fish (*Kryptophanaron alfredi*) have a single rRNA operon. *Mol Mar Biol Biotechnol* 2(4): 189-197.

**Wu, M., Sun, L., Vamathevan, J., Riegler, M., DeBoy, R.T., Brownlie, J., McGraw, E., Mohamoud, Y., Lee, C., Berry, K., Khouri, H. M., Paulsen, I.T., Nelson, K. E., Martin, W., Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Durkin, A. S., Nelson, W. C., Beanan, M. J., Brinkac, L. M., Daugherty, S. C., Dodson, R. J., Gwinn, M., Kolonay, J. F., Madupu, R., Craven, M. B., Utterback, T. R., Weidman, J., Nierman, W. C., Van Aken, S., Tettelin, H., O'Neill, S., and Eisen, J. A.** 2003. Direct Submission to the NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/framik.cgi?db=Genome&gi=383>). The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Dr, Rockville, MD 20850, USA.

**Zengler, K., Toledo, G., Rappe, M., Elkins, J., Mathur, E. J., Short, J. M., and Keller, M.** 2002. Cultivating the uncultured. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(24):15681-6.

Zhang, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Hugenholtz, P., Kim, H., Kamagata, Y., and Nakamura, K. 2003. *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(4):1155-1163.

**Zientz, E., Dandekar, T., and Gross, R.** 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(4): 745-770.

## 7. Anhang

### 7.1 Materialien

**Tabelle 5** Geräte und Materialien. Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

Gerät, Material	Hersteller	Typbezeichnung
Autoklaven	Fedegari	FOM/B50
	Fedegari	9191E
	Varioklav	500
Brutschränke	Hereaus Instruments	kelvitron t
	Memmert	TV40b
Destillieranlage	GFL	Bi-Dest 2304
Elektroporationsgerät	Equibio	easyject prima
Einmalküvetten	Plastibrand	Halbmikro 1,5ml
Einmalspritzen (1ml)	Pharmaplast	-
Faltenfilter	Schleicher & Schuell	-
Feinpipetten	Gilson	pipetman
	Eppendorf	Reference
Feinwaage	Chyo	JL-180
Geldokumentation	Bio-Rad	Gel Doc 2000
Gelelektrophoresekammern	BioRad	-
Gelelektrophoresekammer, PFGE	BioRad	CHEF-DR II
Gelelektrophoresekammer, SDS-PAGE	Owl separation systems	P8DS
Gelelektrophoresekammer, DGGE	BioRad	DCode™
Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr	Öko super
Gefrierschrank (-80°C)	Hereaus Instruments	Sepatech
Heizblock	Liebisch	-
Heizplatte mit Magnetrührer	Labinco	L32
Kühlschrank (4°C)	Privileg	Superöko
Mikrotiterplatten (384wells)	Nunc	-
Mikroskope	Zeiss	Axiolab
Mikrowelle	Privileg	8020
Netzgeräte (Elektrophorese)	Bio-Rad	Power Pac 300
Nylonmembran	Schleicher & Schuell	Nytran Super Charge

Gerät, Material	Hersteller	Typbezeichnung
Objektträger	Marienfeld	mit acht beschrifteten Feldern
Parafilm		
PCR Maschine	Biometra	T3-Thermocycler
Petrischalen (rund, 56,7cm <sup>2</sup> )	Greiner	-
Agarschale (quadratisch, 500cm <sup>2</sup> )	Nalgen Nunc International	Nunclon™
pH-Meter	WTW	pH 525
Photometer	Pharmacia Biosystems	Ultraspec III
Quarzküvetten	Hellma	Suprasil
Reaktionsgefäße (1,5; 2ml)	Sarstedt	-
Reaktionsgefäße (0,5ml)	ABgene	Thermo Tubes
Reaktionsgefäße (0,2ml)	ABgene	Thermo Strip
Reaktionsgefäße (15ml)	Falcon	-
Reaktionsgefäße (50ml)	Greiner	-
Replikastempel	Nalgen Nunc International	384 pin replicator
Röntgenfilm 13 x 18cm	Photochemische Werke GmbH	x-ray RETINA 100 NIF
Schüttler	Infors AG	HT
Sensidiscs	Becton Dickinson	unbeschickt
Sequenzierer	ABI Prism	310 Genetic Analyzer
Sequenzierer	LI-COR	DNA Sequencer 4200
Sterilbank	Nunc	Microflow biological safety cabinet
Sterilfilter	Millipore Nunc	Millex-GS 0,22µm Bottletop Filter
Tischzentrifuge	Hereaus Instruments	Biofuge frasco
Vivaspin Zentrifugenröhrchen	Vivascience	2
Vortexer	Scientific Industries	Vortex Genie 2
Zentrifuge	Beckman	J2-HC

**Tabelle 6** Substanzen, die während dieser Arbeit eingesetzt wurden. Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

Substanz	Hersteller
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (SDS-PAGE)	Roth
40% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (DGGE)	BioRad
Agar, granulated	Difco
Agarose, ultrapure	Gibco
Ammoniumperoxidisulfat	Merck
Ampicillin	AppliChem
Borsäure	AppliChem
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Bromphenolblau	Merck
Citifluor	Citifluor Ltd.
Chloramphenicol	Sigma
Chloroform	Roth
Coomassie-Blau G250	AppliChem
DAPI	AppliChem
DEPC	AppliChem
N,N-Dimethylformamid	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol (absolut 100%)	Merck
Ethanol (vergällt, 96%)	Roth
Ethidiumbromidlösung	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ )	Serva
Formaldehyd	Roth
Formamid	Roth
para-Formaldehyd	Serva
86% Glycerin	Roth
Glutaraldehyd	Sigma
Hefeextrakt	Gibco
HiDi Formamid	Applied Biosystems
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	Sigma
1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumbromid	Fluka
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem
Methanol	Roth
MOPS	Roth
Natriumacetat-Trihydrat	AppliChem
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	Fluka
Natriumhydroxidplättchen	AppliChem

Substanz	Hersteller
Osmium Tetroxid	Sigma
Pepton aus Casein	Roth
Phenol	AppliChem
PMSF	AppliChem
Propylenoxid	Sigma
Salzsäure	AppliChem
Tris-Base	Sigma
Uranylacetat	Sigma

**Tabelle 7** Bezugsquellen verwendeter Enzyme, Größenstandards und Kits.

Enzym, Kit	Hersteller
ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Sequencing Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
Calf intestinal phosphatase (CIP) zzgl. Reaktionspuffer	NEB
DNase I	Sigma
ECL™ Direct Nucleic Acid Labelling and Detection System	Amersham Biosciences
EpiFOS™ Fosmid Library Pro-duction Kit (incl. elektrokompetente <i>E. coli</i> EPI100, DNA EndRepair-Enzyme, λ - Phagenextrakte)	Epicentre
Fast DNA Spin Kit (for soil)	Q-Biogene
Größenstandart DNA PFGE	NEB
Größenstandart DNA	MBI Fermentas, NEB
Größenstandart Protein	NEB
Größenstandart RNA	Invitrogen
Lysozym	Sigma
Omniscript™ Reverse Transcriptase	QIAGEN
pGEM T easy vector system	Promega
Proteinase K	Sigma
QIAquick RNA easy kit	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification/ Gel Extraction Kit	QIAGEN
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Restriktionsendonukleasen zzgl. Reaktionspuffer	New England Biolabs (NEB)
Rnase A aus Rinderpankreas	Roche
SequiTherm EXEL™ // Long-Read™ DNA Sequencing Kits-LC	Epicentre
T4-DNA-Ligase zzgl. Reaktionspuffer	NEB
Taq DNA Polymerase zzgl. Reaktionspuffer	QIAGEN, Sigma

Tabelle 8 Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Vektor	Primer für Sequenzierung	[bp]	Selektionsmarker	Referenz
pGEM T easy	SP6, T7, M13f/r	3018	Amp <sup>R</sup>	<a href="http://www.Promega.com/vectors/">http://www.Promega.com/vectors/</a>
pKS Bluescript	T3, T7	2961	Amp <sup>R</sup>	MBI Fermentas, Accession Nr.: X52327
pEpiFos5	pEF5f/r, T3	7515	Chl <sup>R</sup>	<a href="http://www.Epicentre.com">http://www.Epicentre.com</a>
pCC1	pEF5f/r, T3	8100	Chl <sup>R</sup>	<a href="http://www.Epicentre.com">http://www.Epicentre.com</a>
pQE30	pQE30f/r	3461	Amp <sup>R</sup>	<a href="http://www.qiagen.com">http://www.qiagen.com</a>

Tabelle 9 Mikroorganismen für die Erstellung von Genbanken und für die Durchführung antimikrobieller Tests.

Organismus	Anwendung	Charakteristika
<i>E. coli</i> XL-1 blue	Standard-klonierungen	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIZ ΔM15 Tn10</i> (TetR)]
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	Proteinexpression	<i>Nal<sup>S</sup>, Str<sup>S</sup>, Rif<sup>S</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup></i>
<i>E. coli</i> Epi100	Metagenombank APAE02	Genotyp: F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ rspL nupG</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Wildtyp, nosokomiale Infektionen, auch veterinärmedizinisch relevant
<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A	funktionelle Tests zur Detektion von antimikrobiell	Klinisches humanpathogenes Isolat, nosokomiale Infektionen, Sepsis, Biofilme, multiresistent: Cip <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Oxa <sup>R</sup> , Pen <sup>R</sup> , W <sup>R</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> MR (A134)	aktiven Klonen der Metagenombank APAE02	Klinisches humanpathogenes Isolat, nosokomiale Infektionen, Sepsis, Biofilme, multiresistent: Cip <sup>R</sup> , Cli <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> , Oxa <sup>R</sup> , Pen <sup>R</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Wildtyp, Lungeninfektionen bei Cystischer Fibrose, Infektion von Brandwunden, Harnwegsinfektionen

**Tabelle 10** Computersoftware, Internetanwendungen und Datenbanken.

Programm	Anwendung	Referenz
Primer3	Design von Primern für PCR	<a href="http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Nukleotid- und Aminosäure Sequenz- und Datenbankvergleiche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST</a>
Vector NTI 6.0	ORF-Identifikation, Strukturierung genomischer Sequenzfragmente	Informax
ORF-finder	ORF-Identifikation	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html</a>
DAS transmembrane prediction server	Identifikation von Transmembrandomänen in Proteinen	<a href="http://www.sbc.se/~miklos/DAS/">http://www.sbc.se/~miklos/DAS/</a>
tRNAscan-SE search server	Identifikation von tRNA kodierenden Genen in Nukleotidsequenzen	<a href="http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/">http://www.genetics.wustl.edu/eddy/tRNAscan-SE/</a>
REPuter	Identifikation von Sequenzwiederholungen in DNA	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/</a>
ARB	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf 16S rRNA Nukleotidsequenzen	<a href="http://www.arb-home.de">http://www.arb-home.de</a>
clustalX	Automatisches Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzalignment	<a href="http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/clustalx.html">http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/clustalx.html</a>
Phylip	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	<a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a>
treeview	Visualisierung phylogenetischer Stammbäume nach Phylip Anwendungen	<a href="http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html">http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html</a>
MultiAnalyst 1.1	Dokumentation von Agarose- und Polyacrylamidgelen	BioRad
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	<a href="http://www.ncbi.nih.gov/">http://www.ncbi.nih.gov/</a>
Chimera check	Amplifikation chimärer 16S rRNA Gene	<a href="http://www.cme.msu.edu/html/">http://www.cme.msu.edu/html/</a>
Genome Net	Genomdatenbank	<a href="http://www.genome.ad.jp/">http://www.genome.ad.jp/</a>
Programme für bioinformatische Analysen	Verschiedene Anwendungen und Internet-links	<a href="http://www.bioinformatics.weizmann.ac.il/">http://www.bioinformatics.weizmann.ac.il/</a> <a href="http://www.bip.weizmann.ac.il/bio-tools/dna-tools.html#motif">http://www.bip.weizmann.ac.il/bio-tools/dna-tools.html#motif</a>
Interpro	Proteindatenbank	<a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro">http://www.ebi.ac.uk/interpro</a>



**Tabelle 11** Aufstellung aller in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR und FISH. T: „Annealing“ Temperatur des Primers während der PCR oder Hybridisierungstemperatur der FISH Sonde je nach angewandter Methode in °C durch ein „;“ voneinander getrennt. Fragmente: Größe der amplifizierten DNA Fragmente in bp nach PCR mittels des verwendeten Primers. FA: Anteil an Formamid in % während FISH. „Target“: Zielmolekül. \*: Position nach *E. coli* rRNA Nukleotidnummerierung. Alle hier aufgelisteten Oligonukleotide wurden von der Firma SIGMA bezogen (<http://orders.sigma-ark.eu.com/>). Fortsetzung der Tabelle auf der nächsten Seite.

Name	Sequenz 5' - 3'	Methode	T [°C]	Fragmente [bp] (PCR)	FA [%] (FISH)	Target	rRNA Position*	Referenz	Spezifität
27f	GAGTTTGATCCTGGCTCA	PCR	52; --	1400	--	16S rRNA	27-45	Lane (1991)	Universeller Primer, bakterielle 16S rRNA
PLA46f	GGATTAGGCATGCAA	PCR, FISH	56; 46	1300 840	30%	16S rRNA	46-63	Neef et al. (1998)	<i>Planktomyces</i>
(GC)341f	(CGCCCGCCGCGCGGGCGGGCGGGCGGGG GGCACGGGGGG) CCTACGGGAGGCAGCAG	PCR	53; --	560	--	16S rRNA	341-358	Muyzer et al. (1998)	universeller Primer, „GC-clamp“ für DGGE,
POR389f	ACGATGCGACGCCCGGTG	PCR, FISH	68; 46	800	20%	16S rRNA	389-407	diese Arbeit	<i>Poribacteria</i>
POR600	CCGAACCCCTTTCACGTCT	FISH	-- ; 46	--	10%	16S rRNA	600-618	diese Arbeit	<i>Poribacteria</i>
PLA886r	GCCTTGGCACCATACTCCC	PCR, FISH	56; 46	840	35%	16S rRNA	886-904	Neef et al. (1998)	<i>Planktomyces</i>
907r	CCGTCAATTCMTTGTAGTTT	PCR	53; --	560	--	16S rRNA	907-927	Muyzer et al. (1998)	Universeller Primer, bakterielle 16S rRNA, DGGE
POR1130r	GGCTCGTACCAGCGGTC	PCR, FISH	68; 46	800	35%	16S rRNA	1130-1148	diese Arbeit	<i>Poribacteria</i> , 16S rRNA Signaturregion
1390r	CGGGCGGTGTCTACAA	PCR	56; --	1300	--	16S rRNA	1390-1406	Lane (1991)	Universeller Primer, bakterielle 16S rRNA
1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	PCR	52; --	1400	--	16S rRNA	1492-1514	Lane (1991)	Universeller Primer, bakterielle 16S rRNA
EUB338I	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	FISH	-- ; 46	--	--	16S rRNA	338-904	Amann et al. (1995)	<i>Bacteria</i>
EUB338II	GCAGCCACCCGTAGGTGT	FISH	-- ; 46	--	--	16S rRNA	338-904	Daims et al. (1999)	<i>Bacteria</i>
EUB338III	GCTGCCACCCGTAGGTGT	FISH	-- ; 46	--	--	16S rRNA	338-904	Daims et al. (1999)	<i>Bacteria</i>
ALF968	GGTAAGGTTCTGCGGTT	FISH	-- ; 46	--	35%	16S rRNA	968-985	Neef (1997)	<i>Alphaproteobacteria</i>
BET42	GCCTTCCCACTTCGTTT	FISH	-- ; 46	--	35%	23S rRNA	1027-1043	Amann et al. (1995)	<i>Betaproteobacteria</i>
GAM42	GCCTTCCACATCGTTT	FISH	-- ; 46	--	35%	23S rRNA	1027-1043	Amann et al. (1995)	<i>Gammaproteobacteria</i>
SRB385	CGGCGTCGCTGCGTCAGG	FISH	-- ; 46	--	35%	16S rRNA	385-402	Amann et al. (1995)	<i>Deltaproteobacteria</i>
HGC69	TATAGTTACCACCGCGT	FISH	-- ; 46	--	25%	23S rRNA	1901-1918	Amann et al. (1995)	Gram-positive, GC reich
GNS934	ACCACACGCTCCGCTGCTTGT	FISH	-- ; 46	--	30%	16S rRNA	934-955	diese Arbeit	<i>Chloroflexi</i>
64K2_44	TGCAGGTGAATCTGCTTACG	PCR	58; --	180	--	64K2	--	diese Arbeit	5' Terminus 64K2
64K2_220	TTCTCCGTTTCTCCTGCTGT	PCR	58; --	180	--	64K2	--	diese Arbeit	5' Terminus 64K2

Name	Sequenz 5'-3'	Methode	T [°C]	Fragmente [bp] (PCR)	FA [%] (FISH)	Target	rRNA Position	Referenz	Spezifität
64K2_329	CCCAAACCACAACCTTCGTCT	PCR	58; --	270	--	64K2	--	diese Arbeit	3' Terminus 64K2
oxrMSLr- <i>XmaI</i>	TCCCCCGGGGGGAATGCAAGATTTTTCGT ATGTTTCCGCG	PCR	68; --	3900	--	oxrM	--	diese Arbeit	Klonierung des oxr- Genclusters in den Expressionsvektor pQE30
oxrMSLr- <i>HindIII</i>	CCCAAGCTTGGGTTAGATTTTGCCCATGGC	PCR	68; --	3900	--	oxrL	--	diese Arbeit	Klonierung des oxr- Genclusters in den Expressionsvektor pQE30
oxrMf	CGTTGGCTTGATGATTGATG	PCR	59; --	200	--	oxrM	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, mittlere Untereinheit
oxrMr	GGGTGAGGCGTTACACAAAT	PCR	59; --	200	--	oxrM	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, mittlere Untereinheit
oxrSf	AGAAAATCGCACGTCCAAAC	PCR	59; --	200	--	oxrS	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, kleine Untereinheit
oxrSr	AGGACGAGGCATGAATTGAC	PCR	59; --	200	--	oxrS	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, kleine Untereinheit
oxrLf	TAGAGGTGCGTCAAGCAATG	PCR	59; --	200	--	oxrL	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, große Untereinheit
oxrLr	ACGGTGCCCTGTAACGAAATC	PCR	59; --	200	--	oxrL	--	diese Arbeit	Oxidoreduktase, große Untereinheit
KSDPQQf	MGNARGCENNWNMSMNATGGAYCCNCARCAN MG	PCR	53; --	750	--	KS Domäne	--	Piel et al. (2002)	PKS Typ I, KS Domäne
KSHGTGr	GGRTCNCNARNSWNGTNCNGTNC CRTG	PCR	53; --	750	--	KS Domäne	--	Piel et al. (2002)	PKS Typ I, KS Domäne
T3	AATTAACCCTCACTAAAGGG	PCR	50; --	--	--	pEpiFos5	--	Epicentre	Sequenzierung
pEF5f	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	PCR	60; --	--	--	pEpiFos5	--	Epicentre	Sequenzierung
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	PCR	45; --	--	--	pGEM T easy pKS bluescript	--	Promega	Sequenzierung
T7	GTAATACGACTCACTATAGGG	PCR	45; --	--	--	pGEM T easy pKS bluescript	--	Promega	Sequenzierung
M13f	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	PCR	50; --	--	--	pGEM T easy pKS bluescript	--	Promega	Sequenzierung
M13r	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	PCR	50; --	--	--	pGEM T easy pKS bluescript	--	Promega	Sequenzierung

## 7.2 Lösungen, Puffer und Medien

Außer bei Verwendung organischer Lösungsmittel wurden alle Lösungen und Puffer steril filtriert (0,2µm Porengröße) oder autoklaviert (15min, 121°C). Für Puffer wurde bidestilliertes Wasser, für Medien destilliertes Wasser verwendet.

<b>CAS-Agar:</b>	1.) 48,4 mg CAS in 50 ml H <sub>2</sub> O; 8 ml 1 mM FeCl <sub>3</sub> x 6H <sub>2</sub> O; 10 mM HCl; 58,32 mg HDTMA in 40 ml H <sub>2</sub> O (autoklavieren)
	2.) 650 ml H <sub>2</sub> O; 12 g Agar; 24,2 g PIPES; 9,6 g 50% (w/v) NaOH-Lösung (autoklavieren)
	3.) 1,6 ml 1M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert)
	4.) 6,4 ml 50% (w/v) Glukose (sterilfiltriert)
	5.) 80 µl 1M CaCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert)
	6.) 6,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,4 g NaCl; 0,8 g NH <sub>4</sub> Cl in 50 ml H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
<b>CIP-Puffer:</b>	0,2 M Tris-HCl pH 8,0; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM ZnCl <sub>2</sub>
<b>Coomassie-Blau-G250 Lösung:</b>	0,25% Coomassie-Blau-G250; 44% Methanol; 10% Essigsäure
<b>CMFASW:</b>	400 mM NaCl; 27,6 mM Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 2,3 mM NaHCO <sub>3</sub> ; 8,9 mM KCl; 0,8 mM KBr; 0,4 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ; 0,15 mM SrCl <sub>2</sub> ; 0,07 mM NaF
<b>DGGE-PAGE:</b>	
<b>Denaturierungslösung (0%)</b>	10% Acrylamid; TAE (1x); 0,1% APS; 0,06% TEMED
<b>Denaturierungslösung (100%)</b>	10% Acrylamid; TAE (1x); 40% Formamid; 42% Harnstoff; 0,1% APS; 0,06% TEMED

---

<b>DNA-Ladepuffer:</b>	50% TE; 49,2% Glycerin; 0,04% Xylencyanol; 0,04% Bromphenolblau
<b>Denaturierungslösung: (Blots)</b>	1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH
<b>Depurinierungslösung: (Blots)</b>	250 mM HCl
<b>ECL-Lösung 1:</b>	44,8 mg/ml Luminol in DMSO
<b>ECL-Lösung 2:</b>	14,84 mg/ml p-Cumarsäure in DMSO
<b>Hybridisierungspuffer (FISH):</b>	1 M NaCl; 20 mM Tris/HCl pH 8,0; 0-35% Formamid; 0,02% SDS
<b>IPTG-Lösung (0,1M):</b>	120 mg IPTG in 10 ml H <sub>2</sub> O bidest, gelagert bei 4°C
<b>LB-Medium:</b>	1% Caseinhydrolysat/Pepton; 0,5% Hefeextrakt; 0,5% NaCl; ggf. 1,5% Agar; ggf. Antibiotikum zur Selektion positiver Klone (12,5-100 µg/ml); ggf. 80 µg/ml X-Gal; ggf. 0,5-1 mM IPTG
<b>Ligationspuffer (10x):</b>	660 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM DTT; 10 mM ATP
<b>Lysepuffer, Plasmidpräparationen:</b>	0,1 N NaOH; 0,5% SDS
<b>Lysozym-Lösung:</b>	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O
<b>Lysozypuffer (PFGE):</b>	100 mM EDTA; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 0,2% Na-Desoxycholat; 1% Laurylsarcosin; 2 mg/ml Lysozym

---

<b>Milchpulveragar (M9):</b>	1.) 740 ml H <sub>2</sub> O; 1,5% Agar; 1% Milchpulver (autoklaviert) 2.) 1,6 ml 1M MgSO <sub>4</sub> (sterilfiltriert) 3.) 6,4 ml 50% (w/v) Glukose (sterilfiltriert) 4.) 80 µl 1M CaCl <sub>2</sub> (sterilfiltriert) 5.) 6,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 2,4 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,4 g NaCl; 0,8 g NH <sub>4</sub> Cl in 50 ml H <sub>2</sub> O (sterilfiltriert)
<b>Neutralisierungslösung: (Blots)</b>	1,5M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,5
<b>PBS:</b>	140 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
<b>Proteinase K Puffer (PFGE):</b>	0,5 M EDTA; 1 % Laurylsarcosin; 2 mg/ml Proteinase K
<b>Schafblutagar:</b>	1.) Erythrozyten abzentrifugieren und in einem Vol. 0,9% Saline zwei bis drei mal waschen und aufnehmen. 2.) 2% Erythrozyten Suspension in LB-Agar verwenden.
<b>SDS-PAGE Laufpuffer (10x):</b>	15% SDS; 1,9 M Glycin; 250 mM Tris-HCl pH 8,6
<b>SDS-PAGE Sammelgel (10%):</b>	10% Acrylamid; 0,3% Bisacrylamid; 375 mM Tris-HCl pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,06% TEMED
<b>SDS-PAGE Trenngel (6%):</b>	6% Acrylamid; 0,16% Bisacrylamid; 200 mM Tris-HCl pH 6,8; 0,1% SDS; 0,08% APS; 0,06% TEMED
<b>SDS-Probenpuffer (2x):</b>	50 mM Tris-HCl pH6,8; 2% SDS; 0,04% Bromphenolblau; 20% Glycerin; 84 mM beta-Mercaptoethanol

---

<b>SOC-Medium:</b>	0,5% Hefeextrakt; 2% Casein; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 10 mM MgSO <sub>4</sub> ; 20mM Glucose (MgSO <sub>4</sub> und Glucose wurden sterilfiltriert hinzugegeben)
<b>Softagar:</b>	LB-Medium; 0,2% Agar
<b>SSC (20x):</b>	0,3 M Na <sub>3</sub> -Citrat; 3 M NaCl; pH 7,0
<b>TAE (50x):</b>	2 M Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 1 M Essigsäure
<b>TBE (10x):</b>	0,89 M Tris-HCl pH 8,3; 0,89 M Borsäure; 20 mM EDTA
<b>TE:</b>	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA
<b>TNE:</b>	10 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM NaCl; 10 mM EDTA
<b>TNEX:</b>	TNE, 1% Triton 100
<b>Waschpuffer (FISH):</b>	20 mM Tris/HCl pH8,0; 5 mM EDTA; 0,9-0,08 mol/l NaCl, 0,01% SDS
<b>Waschpuffer (ECL):</b>	6 M Harnstoff; 0,4% SDS; 0,5 x SSC
<b>X-Gal-Lösung:</b>	50 mg X-Gal in 1 ml N,N'-Dimethylformamid, gelagert bei -20°C

### 7.3 Größenstandards für Gelelektrophoresen

Um die Größe von aufgetrennten DNA Fragmenten in Agarosegelen bestimmen zu können, wurden folgende DNA Größenstandards eingesetzt:

„100 bp DNA Ladder“ (NEB): 1517 bp, 1200 bp, 1000 bp, 900 bp, 800 bp, 700 bp, 600 bp, 500 bp, 400 bp, 300 bp, 200 bp, 100 bp (Abbildung 33).

„GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas): 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3,5 kb, 3 kb, 2,5 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 750 bp, 500 bp, 250 bp (Abbildung 33).

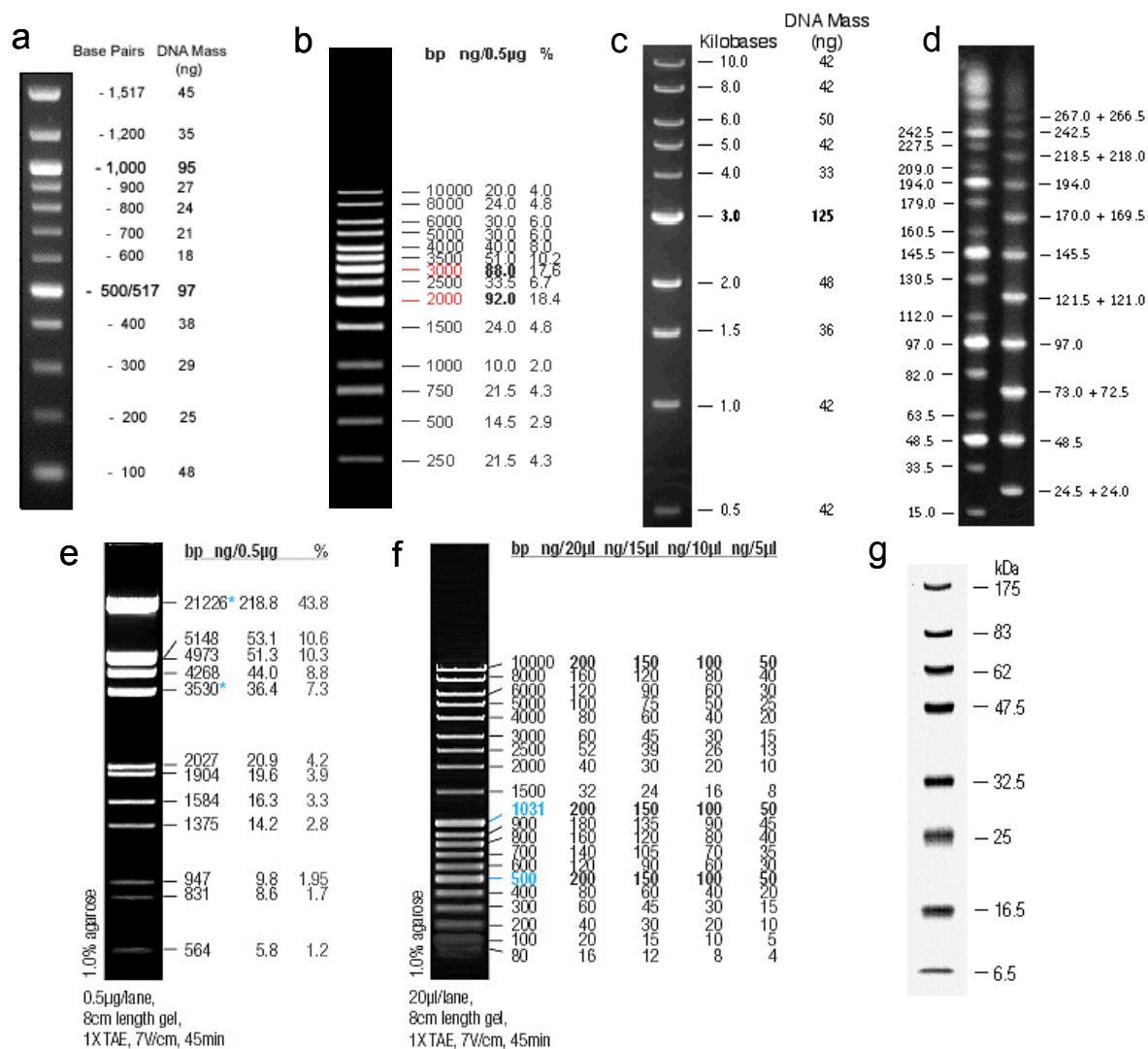
„1 kb DNA Ladder“ (NEB): 10 kb, 8 kb, 6 kb, 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1,5 kb, 1 kb, 0,5 kb (Abbildung 33).

„MidRange PFG Marker I“ (NEB): 291 kb, 276 kb, 257,5 kb, 242,5 kb, 227,5 kb, 209 kb, 194 kb, 179 kb, 160,5 kb, 145,5 kb, 130,5 kb, 112 kb, 97 kb, 82 kb, 63,5 kb, 48,5 kb, 33,5 kb, 15 kb (Abbildung 33).

„Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker“ (MBI Fermentas) 21,2 kb, 5,1 kb, 4,9 kb, 4,2 kb, 3,5 kb, 2,0 kb, 1,9 kb, 1,5 kb, 1,3 kb, 947 bp, 831 bp, 564 bp (Abbildung 33).

„MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use“ (MBI Fermentas): 10 kb / 200 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 8 kb / 160 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 6 kb / 120 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 5 kb / 100 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 4 kb / 80 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 3 kb / 60 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 2,5 kb / 50 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 2 kb / 40 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 1,5 kb / 32 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 1031 bp / 200 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 900 bp / 180 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 800 bp / 160 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 700 bp / 140 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 600 bp / 120 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 500 bp / 200 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 400 bp / 80 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 300 bp / 60 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 200 bp / 40 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 100 bp / 20 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$ , 80 bp / 16 ng 20  $\mu\text{l}^{-1}$  (Abbildung 33).

Um die Größe von aufgetrennten Proteinen in SDS-PAGE bestimmen zu können, wurde der „Prestained Protein Marker“ (NEB) verwendet: 175 kDa, 83 kDa, 62 kDa, 47,5 kDa, 32,5 kDa, 25 kDa, 16,5 kDa, 6,5 kDa (Abbildung 33).



**Abbildung 33** In dieser Arbeit verwendete Größenskalen für Gelelektrophoresen: a: „100 bp DNA Ladder“ (NEB), b: „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas), c: „1 kb DNA Ladder“ (New England Biolabs), d: „MidRange PFG Marker I“ (NEB), e: „Lambda DNA/EcoRI + HindIII Marker“ (MBI Fermentas), f: „MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use“ (MBI Fermentas), g: „prestained protein marker“ (New England Biolabs).



## 7.4 Abkürzungsverzeichnis

A	Adsorption
aa	„Amino acid“
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
b/bp	Base(n), -paar(e)
Blast	„Basic Local Alignment Search Tool“
°C	Grad Celsius
CIP	„Calf Intestine Phosphatase“
CMFASW	„Calcium Magnesium free artificial Seawater“
COG	„Cluster of orthologous Group“
Da	Dalton
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dd/dH <sub>2</sub> O	bidestilliertes/destilliertes Wasser
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m s <sup>-1</sup> )
h	Stunde („Hour“)
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
l	Liter
m	Meter
M	molar
min	Minute
mol	Mol
MOCO	„Molybden containing“

---

mRNA	„messenger“ RNA
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered Saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PFGE	Puls Feld Gelelektrophorese
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktionsfragment Längen Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCT	Reverse Transkriptase PCR
SDS	„Sodium dodecylsulfat“
s	Sekunde
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	„transfer“ RNA
U	„Unit“ oder Umdrehung
V	Volt
Vol	Volumen

## 8. Publikationen

**Fieseler, L.**, Quaiser, A., Schleper, C., and Hentschel, U. (2005). Analyses of the first genome fragment from the marine sponge-associated novel candidate phylum *Poribacteria* recovered by environmental genomics. *Environ Microbiol* (submitted).

**Fieseler, L.**, Horn, M., Wagner, M., and Hentschel, U. (2004). Discovery of the novel candidate phylum *Poribacteria* in marine sponges. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3724-32.

Hentschel, U., **Fieseler, L.**, Wehrl, M., Gernert, C., Steinert, M., Hacker, J., and Horn, M. (2003). Microbial diversity of marine sponges. *In: Marine molecular biotechnology*, W.E.G. Müller (Ed.) Sponges (Porifera). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. S. 59-81.

Hentschel, U., **Fieseler, L.**, Wehrl, M., Steinert, M., and Hacker, J. (2002). Sponges as ancient niches for marine bacteria. *In: Nova Acta Leopoldina*. B. Parthier (Hrsg.) Nr. 333, Band 88, 101-106.

Scheuermayer, M., Pimentel-Elardo, S., **Fieseler, L.**, Grozdanov, L., and Hentschel, U. Microorganisms of sponges: phylogenetic diversity and biotechnological potential. *In: Frontiers in marine biotechnology*, P. Proksch (Ed.). Horizon Scientific Press, UK (submitted).

Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., **Fieseler, L.**, Gernert, C., and Hacker, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol Ecol* 35:305-312.

Böhm, M., Hentschel, U., Friedrich, A.B., **Fieseler, L.**, Steffen, R., Gamulin, V., Müller, I.M., and Müller, W.E.G. (2001). Molecular response of the sponge *Suberites domuncula* to bacterial infection. *Mar Biol* 139:1037-1045.

## 9. Tagungsbeiträge und Workshops

**Metagenomic library construction reveals new insights into the novel candidate division *Poribacteria*.** Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M., Quaiser, A., Schleper, C., and Hentschel, U. VAAM Jahrestagung 28.-31. März 2004 in Braunschweig. Vortrag.

**Metagenomic library construction reveals first insights into the genome structure and putative metabolic functions of the novel candidate division *Poribacteria* of marine sponges.** Fieseler, L., Quaiser, A., Horn, M., Wagner, M., Schleper, C., and Hentschel, U. EMBO conference on molecular microbiology: exploring prokaryotic diversity 22.-26. April 2004 in Heidelberg. Poster.

**Phylogenetic and genomic analyses of an evolutionary deeply rooting bacterial lineage associated with *Aplysina* sponges.** Fieseler, L., Quaiser, A., Horn, M., Wagner, M., Schleper, C., and Hentschel, U. International workshop Metagenomics 2003 from microbial diversity to function 12.-13. Juni 2003 in Darmstadt. Poster.

**Characterization of planctomycete-like bacteria in *Aplysina* sponges.** Fieseler, L., Friedrich, A.B., Horn, M., Wagner, M., Hacker, J., and Hentschel, U. VAAM Jahrestagung 24.-27. März 2002 in Göttingen. Poster.

**Pathogenomics: From genes to function** (Transkriptom Analysen, Microarrays) Workshop des European Graduate College, Würzburg im Juli 2002.

**Proteomics of microbial pathogens** (2D-PAGE; Delta 2D software, Decodon; 2DIGE technique, Amersham bioscience) Workshop des European Graduate College, Würzburg im Juli 2004.

## 10. Curriculum Vitae

### Lars Fieseler

geboren am 31.10.1974 in Warburg

#### Promotion

Mai 2001 bis Jan. 2005	Dissertation: „Entdeckung des neuen Candidatus Phylum <i>Poribacteria</i> “
April 2003	Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Frankreich
Mai 2002 bis Aug. 2002	Technische Universität Darmstadt, AG Christa Schleper
ab Juli 2002	Mitglied im Internationalen Graduiertenkolleg „Generegulation in and by microbial pathogens“ und International Graduate School, Universität Würzburg
April 2002	Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Frankreich

#### Studium und Ausbildung

Nov. 1995 bis Dez. 2000	Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Biologie Diplom Schwerpunkte: Mikrobiologie, Genetik
Mai 1999 bis Okt. 1999	Biotechnologisches Praktikum, Abteilung Präklinische Pharmaforschung, Fa. F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Juli 1997	Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Biologie Vordiplom
Aug. 1985 bis Juni 1994	Hüffertgymnasium in Warburg, Abitur

Würzburg, im Januar 2005