

Phylogenie, Sekundärmetabolismus und biotechnologisches Potential mariner, Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades

der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

Würzburg

vorgelegt von

Matthias Scheuermayer

aus Lichtenfels

Würzburg, Mai 2006

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission

Vorsitzender:

1. Gutachter: PD Dr. Ute Hentschel

2. Gutachter: Prof. Dr. Joachim Reidl

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 Mai 2006

(Matthias Scheuermayer)

„Niemals aufgeben! Niemals kapitulieren!“

Peter Quincy Taggard

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung, Summary	13
2. Einleitung	17
2.1 Marine Schwämme	17
2.1.1 <i>Taxonomie, Morphologie und Ernährung</i>	17
2.1.2 <i>Bioaktive Sekundärmetabolite</i>	19
2.2 Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme	21
2.2.1 <i>Lokalisation, Abundanz und Diversität</i>	21
2.2.2 <i>Bioaktive Sekundärmetabolite</i>	25
2.3 Zielsetzung dieser Arbeit	29
3. Material	31
3.1 Mikroorganismen	31
3.2 Plasmide	31
3.3 Enzyme und „Kits“	32
3.4 Chemikalien	32
3.5 Oligonukleotide	36
3.6 Computerprogramme	38
3.7 Geräte und Verbrauchsmaterial	39
3.8 Medien, Puffer und Lösungen	41
3.9 Größenstandards für Gelelektrophoresen	51
4. Methoden	53
4.1 Sammlung von Schwämmen	53
4.2 Kultivierung von Mikroorganismen	53
4.2.1 <i>Isolierung von Streptomyceten aus marinen Schwämmen</i>	53
4.2.2 <i>Medienoptimierung für Rubritalea marina</i>	54
4.3 Mikrobiologische Nachweisverfahren	54
4.3.1 <i>Überschichtungsassay</i>	54
4.3.2 <i>Agardiffusionstest</i>	54
4.3.3 <i>Analyse zellulärer Eigenschaften</i>	55
4.3.4 <i>Oxidase- und Katalase-Test</i>	55
4.3.5 <i>Spektrophotometrische Analyse</i>	55
4.4 Nukleinsäureanalytische Methoden	55
4.4.1 <i>Isolierung von DNA aus Schwammgewebe</i>	55
4.4.2 <i>Isolierung von DNA aus Schwamm-assoziierten Mikroorganismen</i>	56
4.4.3 <i>Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli</i>	56

4.4.4	<i>Isolierung von Fosmid-DNA aus Metagenom-, Pools</i>	56
4.4.5	<i>Analytische Isolierung von Fosmid-DNA einzelner Metagenomklone</i>	57
4.4.6	<i>Präparative Isolierung von Fosmid-DNA einzelner Metagenomklone</i>	57
4.4.7	<i>Herstellung chemisch-kompetenter E. coli M15[pREP4] Zellen</i>	58
4.4.8	<i>Herstellung elektrokompeter E. coli XLI-Blue Zellen</i>	58
4.4.9	<i>Hitzetransformation chemisch-kompetenter E. coli M15[pREP4] Zellen</i>	58
4.4.10	<i>Elektroporation von E. coli XLI-Blue Zellen</i>	59
4.4.11	<i>Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten</i>	59
4.4.12	<i>Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen</i>	59
4.4.13	<i>Dephosphorylierung von 5'-Enden</i>	59
4.4.14	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	60
4.4.15	<i>Klonierung von PCR-Produkten</i>	60
4.4.16	<i>Nachweis ausgewählter Klone in Genbanken mittels PCR</i>	60
4.4.17	<i>Enzymatische Hydrolyse von DNA</i>	61
4.4.18	<i>DNA-Sequenzierung</i>	61
4.4.19	<i>Sequenzannotation</i>	62
4.4.20	<i>Konstruktion degenerierter Primer</i>	62
4.4.21	<i>Phylogenetische Analyse von 16S-rRNA Gensequenzen</i>	63
4.4.22	<i>Konstruktion einer Genbank aus Streptomyces sp. Pol001</i>	63
4.5	Proteinanalytische Methoden	65
4.5.1	<i>Phylogenetische Analyse von Aminosäuresequenzen</i>	65
4.5.2	<i>Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen</i>	65
4.5.3	<i>Coomassie-Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen</i>	65
4.5.4	<i>Heterologe Expression der Halogenase auf Fosmid-Klon Apae02-42I22</i>	65
4.5.5	<i>Native Aufreinigung der Halogenase 42I22</i>	66
4.5.6	<i>Western-Blot Analyse der Halogenase 42I22</i>	67
4.6	Elektronenmikroskopische Analysen	67
4.6.1	<i>Transmissionselektronenmikroskopie von Dünnschnitten</i>	67
4.6.2	<i>Transmissionselektronenmikroskopie von ganzen Zellen</i>	68
4.6.3	<i>Rasterelektronenmikroskopie von Bakterienkolonien</i>	68
5.	Ergebnisse	69
5.1	Beschreibung der neuen Bakterienart <i>Rubritalea marina</i>	69
5.1.1	<i>Phylogenetische Zuordnung</i>	69
5.1.2	<i>Zelluläre Eigenschaften</i>	71
5.1.3	<i>Wachstumseigenschaften</i>	74
5.1.4	<i>Testung auf antimikrobielle Aktivität</i>	76
5.1.5	<i>Nachweis von Verrucomicrobien in anderen Schwämmen</i>	76
5.1.6	<i>Taxonomische Beschreibung von <i>Rubritalea marina</i> sp. nov.</i>	77
5.2	Isolierung und Screening von Streptomyceten aus marinen Schwämmen	78
5.2.1	<i>Phylogenetische Zuordnung</i>	79

5.2.2	<i>Wachstumseigenschaften und Zellmorphologie</i>	79
5.2.3	<i>Antimikrobielle Aktivitäten und Wirkstoffe</i>	85
5.3	Nachweis eines Glycopeptidbiosyntheseclusters in <i>Streptomyces</i> sp. Pol001	88
5.3.1	<i>Nachweis einer FADH₂-abhängigen Halogenase</i>	88
5.3.2	<i>Sequenzierung und Annotation des Glycopeptidbiosyntheseclusters</i>	89
5.3.3	<i>Analyse der NRPS-Adenylierungsdomänen</i>	91
5.3.4	<i>Antimikrobielle Aktivität von Streptomyces sp. Pol001</i>	92
5.4	Nachweis mikrobieller FADH ₂ -abhängiger Halogenasen in marinen Schwämmen	93
5.4.1	<i>Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in Reinkulturen</i>	93
5.4.2	<i>Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in marinen Schwämmen</i>	94
5.4.3	<i>Phylogenetische Analyse von Teilsequenzen</i>	94
5.4.4	<i>Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in der Metagenombank Apae02</i>	96
5.4.5	<i>Nachweis konservierter Domänen</i>	96
5.4.6	<i>Phylogenetische Analyse von Vollsequenzen</i>	98
5.4.7	<i>Sequenzierung und Annotation von Fosmid 3K12</i>	101
5.4.8	<i>Charakterisierung ausgewählter ORFs</i>	105
5.4.9	<i>Sequenzierung und Annotation weiterer Fosmide</i>	107
5.4.10	<i>Heterologe Expression der Halogenase 42I22</i>	111
6.	Diskussion	113
6.1	Neue Verrucomicrobien aus Schwämmen	113
6.1.1	<i>Schwämme als Quelle für Verrucomicrobien</i>	113
6.1.2	<i>Vergleich mit anderen kultivierten Verrucomicrobien</i>	116
6.1.3	<i>Die Isolierung von Prodigiosin aus Rubritalea marina</i>	121
6.1.4	<i>Ausblick</i>	121
6.2	Neue Streptomyceten aus marinen Schwämmen	123
6.2.1	<i>Schwämme als Quelle für neue Streptomyceten</i>	123
6.2.2	<i>Optimierung der Anzuchtbedingungen</i>	125
6.2.3	<i>Wirkstoffe</i>	126
6.2.4	<i>Ausblick</i>	127
6.3	Analyse des <i>Streptomyces</i> sp. Pol001 Glycopeptidbiosyntheseclusters	129
6.3.1	<i>Heptapeptidrückgrat</i>	131
6.3.2	<i>Quervernetzungen</i>	134
6.3.3	<i>Glycosylierungsmuster</i>	134
6.3.4	<i>Weitere Modifizierungen</i>	135
6.3.5	<i>Resistenzgene</i>	136
6.3.6	<i>Strukturvorschlag</i>	137
6.3.7	<i>Ausblick</i>	137

6.4 Mikrobielle FADH ₂ -abhängige Halogenasen aus marinen Schwämmen	138
6.4.1 <i>Biotechnologisches Potential</i>	139
6.4.2 <i>Verwendung des Primerpaars HALOforD-HALOrevE</i>	140
6.4.3 <i>Halogenasen als Anker für Biosynthesecuster</i>	140
6.4.4 <i>Mögliche Ursprungsorganismen</i>	142
6.4.5 <i>Mögliche Funktionen</i>	142
6.4.6 <i>Mögliche Beteiligung an der Bildung von Schwamm-Metaboliten</i>	144
6.4.7 <i>Ausblick</i>	145
7. Literatur	147
8. Anhang	165
8.1 Abkürzungen	165
8.2 Sequenzierprimer	167
8.3 Veröffentlichungen	175
8.4 Tagungsbeiträge	175
8.5 Teilnahme an Exkursionen	176
8.6 Lebenslauf	177
8.7 Danksagung	179

1. Zusammenfassung

Marine Schwämme (*Porifera*) stellen eine reichhaltige Quelle für bioaktive Substanzen dar. Oft kommen diese jedoch nur in sehr geringen Mengen im Ausgangsmaterial vor, sodass eine nachhaltige Nutzung für z. B. medizinische Anwendungen nur selten möglich ist. Viele Schwämme sind darüber hinaus mit einer enormen Biomasse hochgradig Schwamm-spezifischer Mikroorganismen assoziiert, die extrazellulär in der Mesohylmatrix vorliegen. In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden ausgewählte Schwamm-assoziierte Mikroorganismen taxonomisch charakterisiert und auf die Produktion von bioaktiven Sekundärmetaboliten sowie ihr weiteres biotechnologisches Potential hin überprüft.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit gelang die Isolierung und taxonomische Charakterisierung eines neuen, obligat marinen Bakteriums des Phylums *Verrucomicrobia*. Das Isolat Pol012 repräsentiert aufgrund der niedrigen 16S-rRNA Sequenzhomologie von <83% zu kultivierten *Verrucomicrobia* den ersten Vertreter einer neuen Gattung dieses Phylums. Die Wachstumsbedingungen sowie zelluläre und biochemische Merkmale des Stammes wurden charakterisiert. Es zeigte sich, dass das Isolat Pol012 wahrscheinlich zur Bildung von Prodigiosinen befähigt ist. Prodigiosine sind als cytotoxische Sekundärmetabolite bereits aus anderen Bakterienarten bekannt. Pol012 wurde unter dem Namen „*Rubritalea marina*“ als neues Bakterium beschrieben.

Durch Anreicherung auf gezielten Agarmedien wurde eine Isolierung von Streptomyceten aus verschiedenen marinen Schwämmen erzielt. Die Bakterien wurden auf die Produktion antimikrobiell wirksamer Substanzen hin untersucht. Es konnten vor allem Wirksamkeiten gegen Gram-positive Bakterien, wie *S. aureus*, nachgewiesen werden. Die antimikrobiellen Aktivitäten des Stammes Aer003 wurden auf die gesättigten Fettsäuren Palmitinsäure und Docosansäure zurückgeführt (T. Gulder AG Bringmann, Universität Würzburg). Die Auswertung des Sekundärmetabolitspektrums des Stammes Pol001 steht noch aus. Isolat Pol001 ist durch eine niedrige Sequenzhomologie des 16S-rRNA Gens von 97,6% zu bereits beschriebenen Vertretern der Gattung *Streptomyces* charakterisiert und stellt daher vermutlich eine neue Streptomycetenart dar. Die Erstellung und Durchmusterung einer Genbank aus Pol001 auf Sekundärmetabolitoperons führte zur Beschreibung eines neuen Glycopeptidbiosyntheseclusters. Seine Sequenzierung und *in silico* Analyse weist auf ein strukturell neues Glycopeptid hin, welches Ähnlichkeiten zum Vancomycin besitzt.

Weiterhin wurde der Enzymtyp der FADH₂-abhängigen Halogenasen in mikrobiellen Konsortien verschiedener mariner Schwämme nachgewiesen. FADH₂-abhängige Halogenasen spielen bei der Biosynthese halogener Sekundärmetaboliten aus Bakterien eine große Rolle. Unter Nutzung von degenerierten PCR Primern wurden 34 Halogenasegenfragmente in verschiedenen Schwämmen identifiziert. Ein phylogenetischer Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit homologen Bereichen bereits bekannter Enzyme ergab, dass die Mehrzahl der aus Schwämmen gewonnenen Gene ein Schwamm-spezifisches Halogenasecluster bildeten, dessen Funktion jedoch noch unbekannt ist. Bei der Durchmusterung einer aus dem mikrobiellen Konsortium des Mittelmeerschwammes *Aplysina aerophoba* erstellten Metagenombank konnten vier Fosmide identifiziert werden, die unterschiedliche Halogenasegene trugen. Das Insert eines der betreffenden Fosmide wurde komplett sequenziert. Zusätzlich wurden jeweils 7 kb um die Halogenasegene der drei anderen Fosmide analysiert. In den abgeleiteten kompletten Aminosäuresequenzen der vier Enzyme konnten die für FADH₂-abhängige Halogenasen typischen Sequenzmotive GxGxxG und WxWxI nachgewiesen werden. Eine phylogenetische Analyse ergab eine eigene Abstammungslinie für drei der Proteine. Die heterologe Expression einer der vier Halogenasen in *E. coli* war möglich.

Die beschriebenen Halogenasen und die sie umgebenden genomischen Bereiche geben erste Einblicke in das halogenierende Potential mikrobieller Konsortien mariner Schwämme. Weiterführende Analysen können hier zu einer biotechnologisch wertvollen Anwendung führen. Weiterhin ist es möglich, dass verschiedene bakterielle Stämme, die während der vorliegenden Arbeit kultiviert werden konnten, in naher Zukunft als Quelle neuartiger Sekundärmetabolite erkannt werden. Dies trifft sowohl auf das Phylum der *Verrucomicrobia*, als auch auf das Phylum der *Actinobacteria* zu. Darüber hinaus stellt die Beschreibung von *Rubritalea marina* einen Ansatzpunkt für die weitere Analyse von marinen Verrucomicrobien dar.

1. Summary

Marine sponges (*Porifera*) represent a rich source for bioactive compounds. Frequently these substances are only present in low amounts in the animal which makes sustainable production, for instance for medical uses, impossible. Moreover, several sponges are associated with a huge biomass of highly sponge specific microorganisms, which are present extracellularly in the mesohyl. In the course of this study, selected sponge-associated microorganisms were characterized taxonomically and analysed in respect to their ability to produce bioactive secondary metabolites and their biotechnological potential.

During the course of the presented PhD thesis it has been possible to isolate a novel, obligate marine bacterium of the phylum *Verrucomicrobia* and to characterise it taxonomically. Due to the low homology of its 16S-rRNA gene of <83% to other cultivated *Verrucomicrobia*, the isolate Pol012 represents the first member of a new genus of this phylum. The growth conditions and its cellular and biochemical properties were characterized. The bacterium probably is able to produce prodigiosins. Prodigiosins are already known as cytotoxic secondary metabolites from other bacteria. The isolate Pol012 was described as a taxonomically new species with the name "*Rubritalea marina*".

By using specific agar media streptomycete strains were cultivated from various marine sponges. The cultivated bacteria were tested for the production of antimicrobial substances. Mainly activities against gram-positive bacteria, like *S. aureus*, were detected. The antimicrobial activities of strain Aer003 were ascribed to saturated fatty acids, namely palmitic acid and docosanoic acid (T. Gulder AG Bringmann, University of Wuerzburg). The bioactive compounds of strain Pol001 are currently under investigation. Because of a low 16S-rRNA gene sequence homology of 97.6% to any other member of the genus *Streptomyces*, strain Pol001 probably represents a novel streptomycete species. Construction and screening of a genomic library of this streptomycete for secondary metabolite gene clusters lead to the detection of a biosynthetic gene cluster encoding for a glycopeptide. Sequencing and *in silico* analysis of this gene cluster suggests the encoding of a structural novel glycopeptide with similarities to vancomycin.

Furthermore, FADH₂-dependent halogenases were detected within the microbial communities of various marine sponges. FADH₂-dependent halogenases play a major role during the biosynthesis of halogenated secondary metabolites in bacteria. By using degenerate PCR primers, gene fragments of 34 different halogenases were identified in various sponges. Phylogenetic analyses in comparison to the homologous region of known enzymes revealed that most of the sequences from marine sponges formed a specific halogenase cluster, of which the function is not known yet. Screening of a metagenomic library of the microbial consortium of the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba* lead to the identification of four fosmid clones bearing different halogenase genes. The insert of one of the fosmids was sequenced completely. Additionally, 7 kb of the sequence, surrounding the halogenases from the other three fosmids, were analyzed. The deduced amino acid sequences of the four enzymes revealed the presence of the two sequence motifs GxGxxG and WxWxI, which are essential for halogenase activity. A phylogenetic comparison revealed that three of the new sequences formed a separate line of descent. The heterologous expression of one of the four halogenases was possible in *E. coli*.

The described halogenases and the surrounding genomic areas give first insights into the halogenating potential of microbial consortia of marine sponges. Further analyses can lead to biotechnologically relevant applications. Furthermore it is possible that various bacterial strains, that have been cultivated during the presented study, will be identified as the producers of novel secondary metabolites. This is true for the phylum *Verrucomicrobia* as well as for the phylum *Actinobacteria*. Additionally, the description of *Rubritalea marina* is starting point for the further analysis of marine *Verrucomicrobia*.

2. Einleitung

2.1 Marine Schwämme

2.1.1 Taxonomie, Morphologie und Ernährung

Schwämme stellen eine der ältesten Gruppen der mehrzelligen Organismen auf der Erde dar. Schon vor 580 Millionen Jahren besiedelten sie die Weltmeere (Müller, 1998). Gegenwärtig werden die *Porifera* in drei rezente Klassen unterteilt, die *Hexactinellida* (Glasschwämme), die *Demospongiae* (Hornschwämme) und die *Calcarea* (Kalkschwämme). Die bei weitem artenreichste Klasse stellen die *Demospongiae* dar. Ihnen werden etwa 95% der taxonomisch beschriebenen 7000 Spezies zugerechnet. Schätzungen gehen davon aus, dass die tatsächliche Artenvielfalt des Phylums *Porifera* bei über 15000 liegt (Hooper und Van Soest, 2002). Eine kleine Auswahl an *Demospongiae* zeigt Abbildung 1.



Abbildung 1 Unterwasseraufnahmen mariner *Demospongiae* (Susanne Schmitt und Thorsten Winter, AG Hentschel, Universität Würzburg).

Die äußerste Schicht von Schwämmen wird durch eine einzellige Schicht von Pinacozyten gebildet, dem Pinacoderm. Diese grenzt die inneren Bereiche des Tieres, das Mesohyl, vom Umgebungswasser ab. Im Mesohyl befinden sich verschiedene Typen von hochbeweglichen Zellen, die sich in andere Zelltypen differenzieren können (Totipotenz). Die extrazelluläre Matrix des Mesohyls besteht aus einem Proteingerüst, das Ähnlichkeiten zu Kollagen besitzt und zum größten Teil aus Spongin besteht (Brusca und Brusca, 1990). Zusätzlich finden sich in vielen Schwammarten Spiculae aus Silikat oder Kalk im Mesohyl. Das Pinacoderm wird durch zahlreiche Poren, die in ein differenziertes Wasserleitsystem münden, durchbrochen. Innerhalb dieser Kanäle sorgt eine Schicht flagellierter Zellen (Choanozyten) für einen gerichteten Wasserstrom durch den Schwamm. Der Ausstrom des Wassers erfolgt durch vergleichsweise große Öffnungen, den Osculi (Hooper und Van Soest, 2002). Schwämme ernähren sich durch Filtration von Mikroorganismen aus dem sie umgebenden Wasser. Eine schematische Darstellung des Wasserleitsystems eines marinen Hornschwammes zeigt Abbildung 2. In spezialisierten Bereichen des Kanalsystems, den Choanozytenkammern, erfolgt die Aufnahme der im Wasser vorhandenen Mikroorganismen und Nährstoffe. Filtrationsleistungen von mehreren tausend Litern pro Tag und Kilogramm Schwamm konnten dabei beobachtet werden (Vogel, 1977). Wasser, welches den Schwamm wieder verlässt, weist im Vergleich mit dem Umgebungswasser eine bis zu 10000fach reduzierte Anzahl an Mikroorganismen auf (Ribes et al., 1999; Wehrl et al., im Druck).

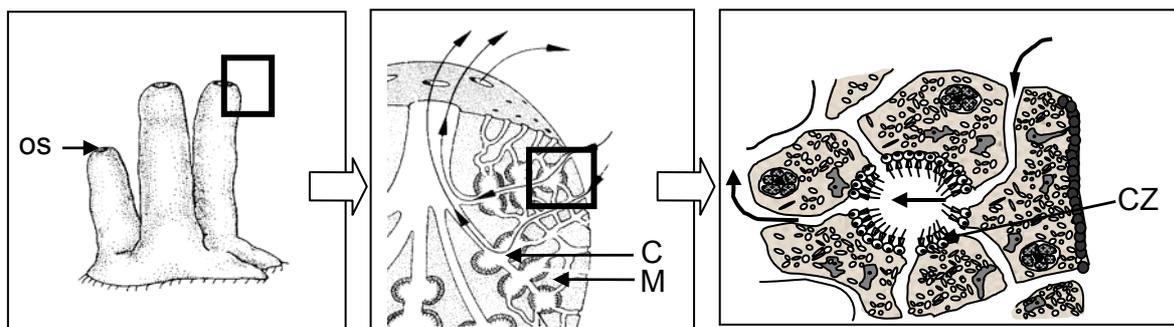


Abbildung 2 Schematische Darstellung der morphologischen Organisation mariner Demospongiae. OS: Osculum, C: Choanozytenkammer, M: Mesohyl, CZ: Choanozyten (nach Fieseler, 2005 und Hentschel et al., 2003, verändert).

2.1.2 Bioaktive Sekundärmetabolite

Schwämme sind, mit bisher mehr als 4000 isolierten Substanzen, eine der reichhaltigsten Quellen für marine Naturstoffe (MarinLit 2003). Im Jahr 2002 stammten 37% der erstmals beschriebenen Moleküle aus Schwämmen und erreichten somit einen fast doppelt so hohen Wert wie Metabolite aus Hohltieren (21%) (Blunt et al., 2004).

Die biologische Funktion dieser Vielzahl von Sekundärmetaboliten in Schwämmen ist wahrscheinlich eine Art „chemische Verteidigung“. Schwämme als sessile Tiere sind nicht in der Lage, vor Fraßfeinden zu flüchten. Auch ihre morphologischen Gegebenheiten stellen keinen ausreichenden Schutz dar, was vermutlich im Zuge der Evolution die Entwicklung einer chemischen Verteidigung notwendig machte. Da ihre Lebensweise als Filtrierer sie in engen Kontakt mit einer Vielzahl von Mikroorganismen bringt, benötigen sie außerdem einen wirksamen Schutz vor Überwachsung, dem so genannten „Biofouling“. Zusätzlich macht der Konkurrenzdruck auf marinen Riffen, einem der artenreichsten ökologischen Habitate, diese Verteidigung notwendig.

Verschiedenste Substanzen aus marinen Schwämmen (Abbildung 3) werden gegenwärtig auf ihre Tauglichkeit im Einsatz gegen Krankheiten untersucht und befinden sich in unterschiedlichen klinischen Testphasen (Salomon et al., 2004). Als potentielle Antikrebsmittel sind Laulimalid aus *Cacospongia mycofijiensis* oder Pelorusid A aus *Mycale hentscheli* zu nennen. Daneben gibt es Beispiele von biologisch aktiven Molekülen aus Schwämmen gegen eine Vielzahl von Krankheitserregern. Halichondramid aus einer *Halichondria* sp. besitzt antifungale Wirkung gegenüber *C. albicans* (Kernan et al., 1987), Sigmosceptrellin-B aus *Diacarnus erythraeanus* besitzt antiparasitäre Aktivität gegen *P. falciparum* (El Sayed et al., 2001), Mycalamid A aus *Mycale* sp. zeigt antivirale Aktivität gegen *H. simplex* (Perry et al., 1990) und Cribrostatin 6 aus *Cribrochalina* sp. zeigt antibakterielle Aktivität gegen *S. pneumoniae* (Pettit et al., 2004).

Trotz der großen Zahl an bioaktiven Molekülen aus Schwämmen werden zurzeit nur wenige pharmazeutisch genutzt (Faulkner, 2000). Dies liegt vor allem daran, dass diese Substanzen meistens nur in sehr geringen Mengen in Schwämmen vorkommen und durch Sammlung und Extraktion von Biomasse in nicht ausreichender Menge gewonnen werden können. Zusätzlich ist eine Vielzahl von ihnen strukturell sehr komplex, sodass eine synthetische Herstellung schwierig und aufwendig wäre. Da viele Schwämme mit Mikroorganismen assoziiert sind, ist

es möglich, dass nicht der Schwamm selbst, sondern diese Mikroorganismen die eigentlichen Wirkstoffproduzenten sind. In diesem Fall kann versucht werden, den Ausgangsstamm zu kultivieren und die Wirkstoffe durch Fermentation in großem Maßstab zugänglich zu machen. Der Nachweis einer bakteriellen Produktion von ursprünglich aus Schwämmen isolierten Substanzen gelang beispielsweise bei Diketopiperazinen aus *Tedania ignis*, die von einem *Micrococcus*-Bakterium gebildet werden (Stierle et al., 1988) oder bei polychlorierten Alkaloiden aus dem Schwamm *Dysidea herbacea*, die durch das symbiontische Cyanobakterium *Oscillatoria spongliae* synthetisiert werden (Unson et al., 1994). Hinweise auf eine bakterielle Produktion von Schwamm-Metaboliten wäre die Lokalisation der betreffenden Substanz in den Bakterien. Dies kann durch eine mechanische Abtrennung der Mikroorganismen aus dem Schwamm nachgewiesen werden. Ein weiterer Hinweis wären strukturell ähnliche Substanzen, die schon aus Bakterien bekannt sind. Im Folgenden soll auf die Rolle der Bakterien bei der Assoziation mit dem Wirtsschwamm sowie im Hinblick auf die Beteiligung an der Wirkstoffsynthese näher eingegangen werden.

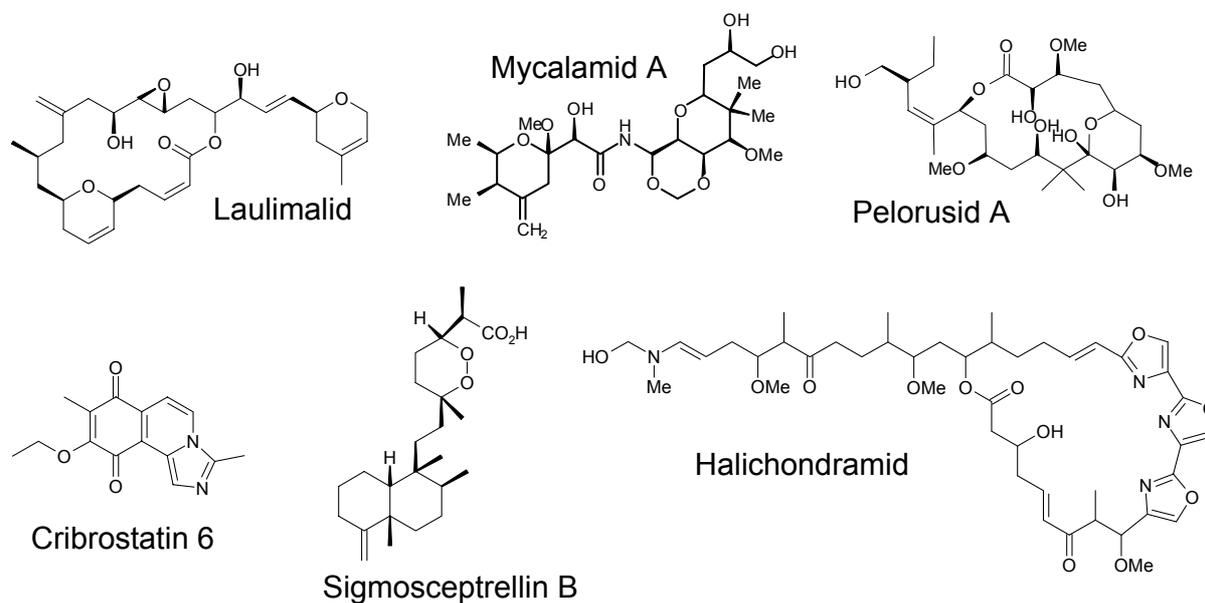


Abbildung 3 Strukturformeln verschiedener Schwamm-Metabolite.

2.2 Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme

2.2.1 Lokalisation, Abundanz und Diversität

Schon seit mehr als 30 Jahren ist bekannt, dass marine Schwämme große Mengen Bakterien innerhalb der Mesohylmatrix enthalten können (Vacelet 1975). Mittels Elektronenmikroskopie wurden dabei verschiedene bakterielle Morphotypen in Demospongiae beschrieben. Anhand dieser Studien ist auch bekannt, dass die Anzahl von Mikroorganismen in Schwämmen unterschiedlich ist. Neben Gattungen wie *Aplysina*, deren Biomasse zu bis zu 60% aus Mikroorganismen besteht und die bis zu 10^9 Bakterien pro Gramm Schwamm enthalten können (Friedrich et al., 2001), gibt es auch Schwämme, deren Konzentration an Mikroorganismen die des Meerwassers (10^6) nicht übersteigt (Vacelet und Donadey, 1977; Hentschel et al., 2006). Zwei Aufnahmen von Schwämmen der Gattung *Aplysina* sind in Abbildung 4 dargestellt. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme zeigt den Anschnitt einer Choanozytenkammer und die Abgrenzung zum Mesohyl, in dem mehrere Bakterienzellen vorliegen. In der transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahme ist eine Speicherzelle des Schwammes und eine Vielzahl sie umgebender Bakterien zu sehen.

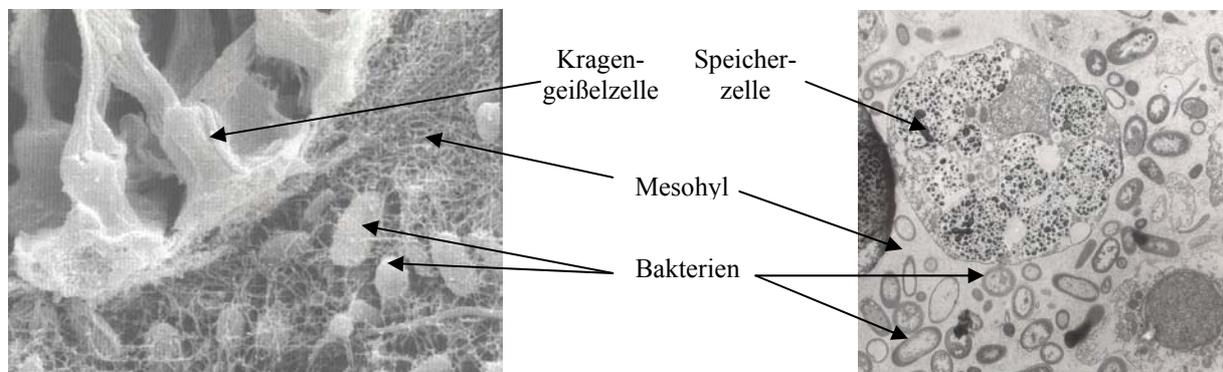


Abbildung 4 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Schwammes *A. aerophoba* (A) Rasterelektronenmikroskopie (Christine Gernert) (B) Transmissionselektronenmikroskopie (Matthias Scheuermayer)

Diverse Studien beschäftigten sich mit der Isolierung und Kultivierung dieser Mikroorganismen aus Schwämmen. Dabei konnte wiederholt die Feststellung gemacht werden, dass bestimmte bakterielle Phyla die erhaltenen Isolate dominierten. So konnten nahezu 80% der aus dem karibischen Schwamm *Ceratoporella nicholsoni* kultivierten Bakterien den Gammaproteobakterien zugeordnet werden (Santavy et al., 1990). Ein ähnliches Ergebnis wurde bei der Kultivierung von Bakterien aus den Schwämmen *Isops phlegraei*, *Haliclona* sp. 1, *Phakellia ventilabrum* und *Plakortis* sp. erhalten. Fast 90% der untersuchten 456 Isolate dieser Studie waren Gammaproteobakterien, daneben wurden auch

Vertreter der Firmicuten und der Alphaproteobakterien gefunden (Dieckmann et al., 2005). Die aus dem Schwamm *Rhopaloeides odorabile* kultivierten Bakterien wurden von einem Alphaproteobakterium dominiert (Webster und Hill, 2001). Aus den Schwämmen *Pseudoceratina clavata* und *Rhabdastrella globostellata* konnten Vertreter der Phyla *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes* und *Actinobacteria* isoliert werden (Lafi et al., 2005). In mehreren Studien wurde, übereinstimmend mit dem Phänomen der „great plate count anomaly“ in der mikrobiellen Ökologie (Amann et al., 1995), beobachtet, dass es eine sehr große Diskrepanz zwischen der Anzahl an Bakterien in Schwämmen und der tatsächlich kultivierbaren Fraktion gab. Der Prozentsatz der kultivierbaren Bakterien wurde für den Schwamm *Ceratoporella nicholsoni* mit 3-11% (Santavy et al., 1990), für *Rhopaloeides odorabile* mit 0,1-0,23% (Webster und Hill, 2001) und für *Aplysina aerophoba* mit 0,15% angegeben (Friedrich et al., 2001). Gründe für die geringe Kultivierbarkeit dürften einerseits in festen Assoziationen zwischen bestimmten Bakterien und den Schwämmen liegen, was eine getrennte Kultivierung dieser Mikroorganismen unmöglich macht und in einem unzureichenden Wissen über die Bedingungen in Schwämmen, was die Zusammenstellung eines geeigneten Kultivierungsmediums erschwert.

In jüngerer Vergangenheit wurde dazu übergegangen, mikrobielle Gemeinschaften verschiedener Schwämme mittels molekularbiologischer Untersuchungen zu analysieren. Mit Hilfe kultivierungsunabhängiger Analysen von 16S-rRNA Gensequenzen konnten in Schwämmen Vertreter der Phyla *Alphaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, *Cytophaga-Flavobacteria*, *Nitrospira*, *Cyanobacteria*, *Spirochetes*, *Actinobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Acidobacteria* und *Chloroflexi* (Abbildung 5) nachgewiesen werden (Hentschel et al., 2002; Taylor et al., 2005; Webster et al., 2001). Auch ein bis dato völlig unbekanntes Phylum, die *Poribacteria*, wurde auf diese Weise entdeckt (Fieseler et al., 2004). Im Gegensatz zu Kultivierungsstudien zeigte sich in 16S-rRNA Genbanken eine Dominanz der Phyla *Acidobacteria* und *Chloroflexi*. Alpha- und Gammaproteobakterien wurden in geringerer Zahl als in den Kultivierungsstudien nachgewiesen. Darüber hinaus war es bis heute nur in einem Fall möglich, ein aus Schwämmen isoliertes Bakterium auch mittels kultivierungsunabhängiger Methoden nachzuweisen (Thoms, 2004). Auf Grund dieser molekularbiologischen Studien ist bekannt, dass sich die Zusammensetzung der bakteriellen Konsortien von Schwämmen und Meerwasser grundlegend unterscheidet. Bakterielle Phylotypen, die in Schwämmen nachgewiesen wurden, bilden sogenannte „monophyletische Cluster“. Dies besagt, dass die

Phylotypen näher mit Bakterien aus Schwämmen verwandt sind als mit allen anderen bisher in Datenbanken abgelegten 16S-rRNA Gensequenzen (Hentschel et al., 2002) und dass die Assoziation zwischen bestimmten Bakterien und ihren Wirtsschwämmen hochgradig spezifisch ist (Taylor et al., 2004). Auf welche Weise Schwämme zwischen eingestrudelten Futterbakterien und den mit ihnen assoziierten Organismen unterscheiden, ist nicht bekannt. Eine Möglichkeit hierbei wäre, dass in Schwämmen vorhandene Bakterien sich durch markante morphologische Strukturen, wie zusätzliche Membranen oder Schleimschichten möglicherweise vor Phagozytose durch Schwammzellen schützen könnten (Friedrich et al., 1999; Wilkinson et al., 1984; Wehrl et al., im Druck). Auch die Frage, ob es sich bei der Assoziation zwischen Bakterien und Schwämmen um eine echte Symbiose zum beiderseitigen Nutzen handelt, oder ob eine kommensale Beziehung, ohne erkennbaren Nutzen für die Interaktionspartner, besteht, ist nicht geklärt. Lediglich eine pathogene Beziehung kann, aufgrund der zeitlich stabilen Assoziation, ausgeschlossen werden. Vorteile, die aus der Assoziation hervorgehen können, sind beispielsweise solche der gegenseitigen Ernährung. Die Bakterien können Abfallprodukte des Schwammstoffwechsels weiterverarbeiten, während der Schwamm von heterotrophen Bakterien profitiert.

2. Einleitung

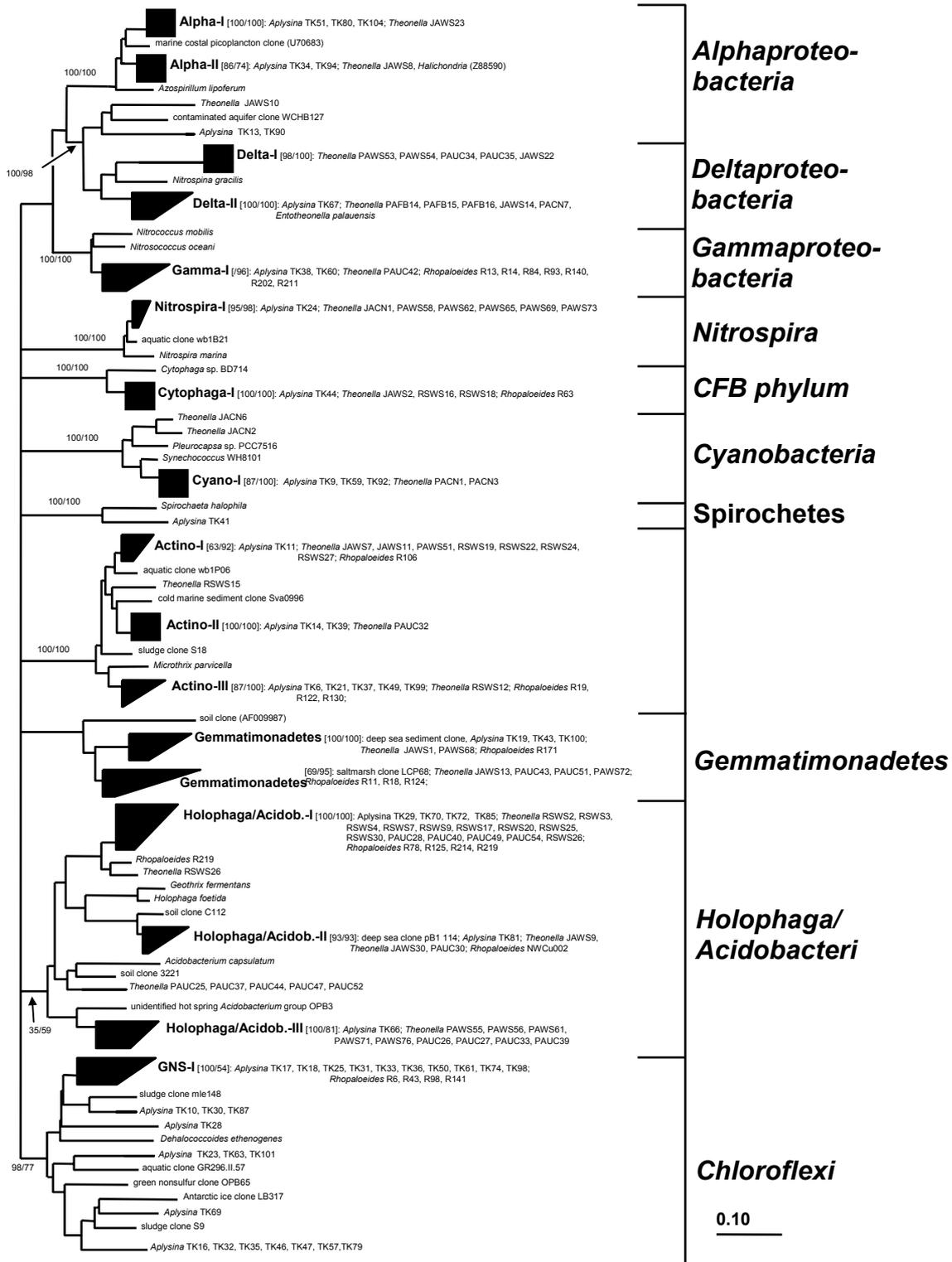


Abbildung 5 Phylogenetische Analyse von 16S-rRNA Gensequenzen aus marinen Schwämmen (nach Hentschel et al., 2002).

2.2.2 Bioaktive Sekundärmetabolite

Das mikrobielle Konsortium mariner Schwämme erwies sich bereits in der Vergangenheit als eine reichhaltige Quelle für neuartige Sekundärmetabolite. Aufgrund der hohen mikrobiellen Besiedlungsdichte in Schwämmen existieren in dieser Umgebung ideale Voraussetzungen für die Produktion von beispielsweise antimikrobiell oder cytotoxisch aktiven Metaboliten durch die Bakterien mit dem Ziel, das Wachstum konkurrierender Bakterienstämme zu hemmen oder sich vor einem Angriff durch Schwammzellen zu schützen. Vor allem mittels klassischer Kultivierung war es möglich, bioaktive Substanzen aus verschiedensten bakteriellen Schwammisolaten zu gewinnen (Scheuermayer et al., 2006). Aus dem Kulturüberstand eines mit dem Schwamm *Hymeniacidon perleve* assoziierten Pseudomonaden konnten verschiedene Alkaloide, darunter Diketopiperazine und Indolverbindungen, isoliert werden (Zheng et al., 2005). Das zytotoxische Lactam Alteramid A wurde in einem *Alteromonas*-Isolat aus dem Schwamm *Halichondria okadai* nachgewiesen (Shigemori et al., 1992). Weiterhin konnten aus verschiedenen Schwammisolaten der Gattung *Vibrio* eine Reihe von bioaktiven Sekundärmetaboliten, wie Andrimid (Oclarit et al., 1994) oder Brevianamid F (Kobayashi et al., 1995) gewonnen werden. Zwei zyklische Peptide wurden aus einem *Ruegeria*-Stamm isoliert, der mit dem Schwamm *Suberites domuncula* assoziiert war (Mitova et al., 2004). Der cyanobakterielle Symbiont *Oscillatoria spongelliae* des Schwamms *Dysidea herbacea* produziert die Substanzen Dihydrosamid C, Didechlorodihydrodysamid und 13-Demethylisodysidenin (Faulkner et al., 2000). Bioaktive Lipopeptide konnten aus mehreren *Bacillus* Stämmen aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* gewonnen werden (Pabel et al., 2003). *Bacillus pumilus* AAS3 aus dem Schwamm *Acanthella acuta* wurde als Produzent von Diglucosyl-Glycerolipiden identifiziert (Ramm et al., 2004). Metacycloprodigiosin und Undecylprodigiosin konnten in einem *Saccharopolyspora*-Isolat des Schwamms *Mycale plumose* nachgewiesen werden (Liu et al., 2005). *Microbacterium* HP2 (DSM 12583), isoliert aus *Halichondria panicea* produzierte ein Glucosylmannosyl-Glycerolipid, welches antitumorale Wirkung besitzt (Lang et al., 2004). Ein *Streptomyces* Stamm aus einem unbekanntem Schwamm erwies sich als der Produzent von zwei neuen zyklischen Peptiden aus der Klasse der Nocardamine (Lee et al., 2005a). Im Kulturüberstand eines weiteren *Streptomyces* Stammes aus einem ebenfalls unbekanntem Schwamm konnten die Urauchimycine A und B, Antimycinantibiotika, nachgewiesen werden (Imamura et al., 1993).

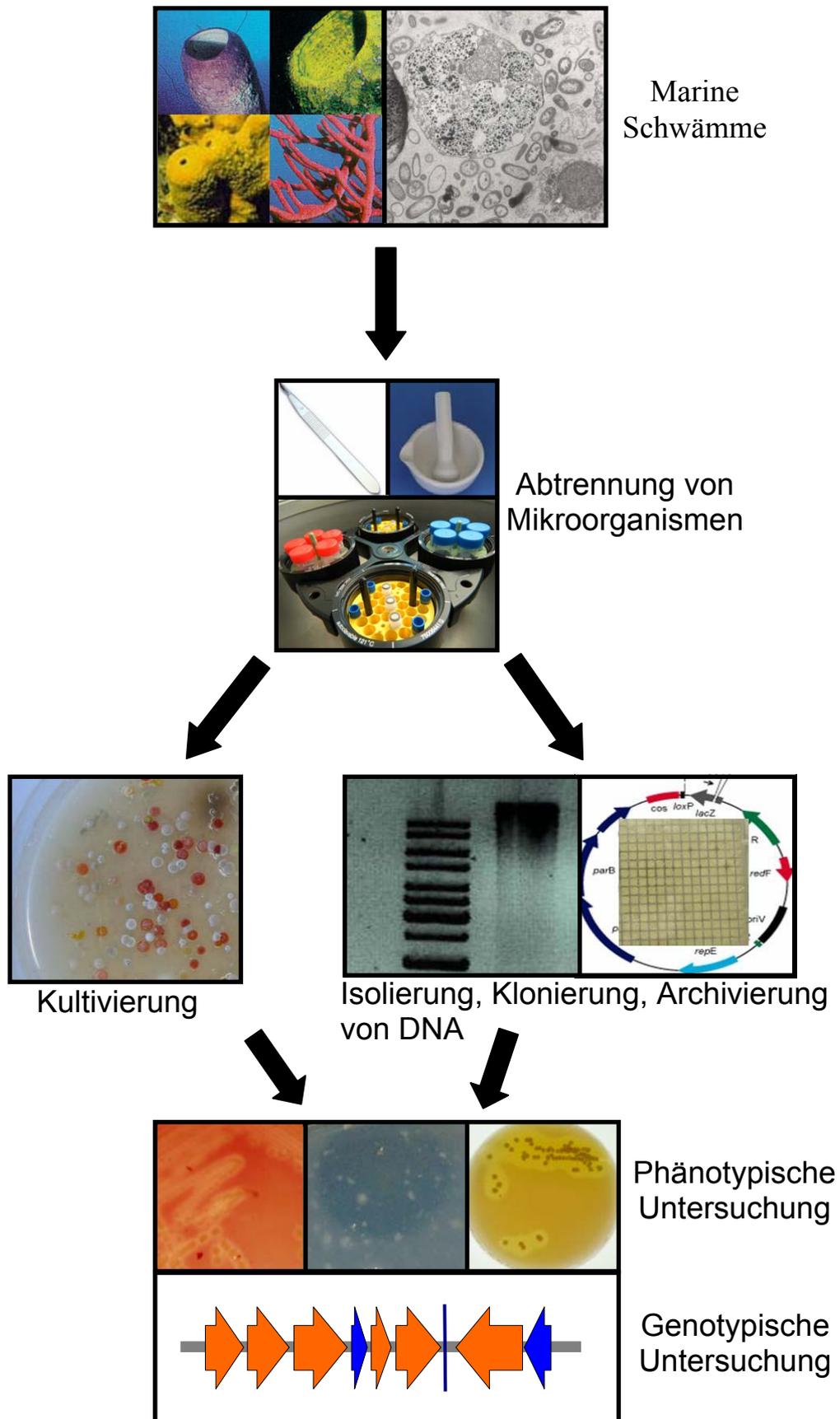


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Möglichkeiten, bakterielle Gemeinschaften mariner Schwämme zu analysieren.

Da gegenwärtig maximal 0,1-1% der existierenden prokaryontischen Organismen kultiviert werden können (Amann et al., 1995), liegt in Schwämmen ein enormes mikrobielles Potential vor, das mittels klassischer Kultivierung nicht erfasst wird. Um dennoch Einblicke in mikrobielle Konsortien mariner Schwämme zu erhalten, wird die sogenannte Metagenomik zum Einsatz gebracht. Entsprechend erlebte die Methodik einen enormen Aufschwung, was sich in der Analyse von mikrobiellen Konsortien aus Böden (Brady und Clardy, 2000; Hallam et al., 2004), marinem Bakterioplankton (Venter et al., 2004), Käfersymbionten (Piel, 2002), Darmfloren (Ferrer et al., 2005b), Biofilmen (Tyson et al., 2004), menschlichem Rachen (Diaz-Torres et al., 2003) oder marinen Schwämmen (Schleper et al., 1998; Piel et al., 2004; Fieseler et al., 2006) ausdrückte. Dabei wird die gesamte DNA eines Konsortiums von Mikroorganismen, das „Metagenom“, kloniert, um es anschließend kulturunabhängig untersuchen zu können. Eine der großen Schwierigkeiten dabei ist die Gewinnung verwertbarer hochmolekularer DNA. Bei der Isolierung genomischer DNA aus Umweltproben kann es zur Kontamination mit störenden Substanzen, beispielsweise Polyphenolen, kommen, die eine Weiterverarbeitung des Materials erschweren (Streit und Schmitz, 2004). Anschließend ist die Auswahl eines geeigneten Klonierungsvektors nötig, welcher der ursprünglichen Fragestellung des Projekts Rechnung tragen muss. Schleper und Mitarbeiter (1998) und Fieseler und Mitarbeiter (2006) nutzten die Genbanken aus marinen Schwämmen dazu, Einblicke in die Genome von neuartigen Archaeobakterien oder Bakterien zu bekommen. Piel und Mitarbeiter (2004) und Lim und Mitarbeiter (2005) dagegen verfolgten das Ziel, Sekundärmetabolit-Biosynthesecluster zu klonieren. Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Metagenomik stellen die Klonierung von neuartigen und biotechnologisch relevanten Enzymen (Schleper et al., 1997; Wexler et al., 2005) oder die Analyse viraler Gemeinschaften dar (Pedulla et al., 2003; Prangishvili et al., 2006). Je nach Anwendung kann daher die Klonierung der DNA als kleine Fragmente (< 10 kb) in Standardvektoren erfolgen, oder, beispielsweise für die Klonierung gesamter Biosynthescluster, als sehr große Fragmente in Cosmid- oder BAC-Vektoren. Auf diese Weise ist es bereits gelungen, DNA-Fragmente von bis zu 200 kb Länge aus der Umwelt zu klonieren (Beja et al., 2000). Als Wirt für die konstruierte Genbank wird standardmäßig *Escherichia coli* verwendet, aber auch *Streptomyces lividans* (Courtois et al., 2003) wurde bereits erfolgreich eingesetzt. Besonders der Einsatz von Streptomyceten als Wirt bei der Klonierung von Sekundärmetabolit-Biosyntheseclustern aus der Umwelt scheint Erfolg versprechend, da diese Bakteriengruppe für ihre Fähigkeit bekannt ist, eine Vielzahl verschiedenster Metaboliten zu synthetisieren. Die Suche nach neuartigen Substanzen oder

Enzymen in einer Metagenombank kann, ebenso wie in Kultur gehaltenen Organismus, auf zwei Arten erfolgen (Abbildung 6). Mithilfe der Verwendung geeigneter Kulturmedien und phänotypischer Untersuchungen können interessante Klone relativ einfach erkannt werden. So konnten aus pigmentproduzierenden Vertretern einer Metagenombank aus Erde die antimikrobiell wirksamen Substanzen Turbomycin A und B isoliert werden (Gillespie et al., 2002). Esterasen wurden in einer Metagenombank aus dem Mittelmeer lokalisiert (Ferrer et al., 2005a), eine Amylase in einer Metagenombank aus Erde (Yun et al., 2004) und ein Tetrazyklinresistenzgen konnte aus dem Metagenom der Mundhöhle isoliert werden (Diaz-Torres et al., 2003). Zusätzlich können mittels eines sequenzbasierten Ansatzes Gene oder Gencluster aufgespürt werden, für die kein phänotypischer Test existiert oder die im verwendeten Wirt nicht zur Expression kommen. Auf diese Weise ist es gelungen, mehrere bakterielle Chitinasegene aus verschiedenen aquatischen Habitaten zu identifizieren (LeClerc et al., 2004). Auch Gene, die für die Biosynthese von sekundären Naturstoffen wichtig sind, konnten auf diese Weise bereits detektiert werden, wie z. B. Polyketidsynthasegene (PKS) in Metagenombanken des Schwammes *Theonella swinhoei* (Piel et al., 2004), des Schwammes *Discodermia dissoluta* (Schirmer et al., 2005) oder des Schwammes *Aplysina aerophoba* (Fieseler, 2005). Eine der größten Herausforderungen besteht nun darin, die Funktion der neue entdeckten Gene und Proteine besser zu verstehen, die auf Grund der immensen Mengen an Sequenzinformation, aus Projekten wie der Analyse des mikrobiellen Konsortiums der Sargassosee (Venter et al., 2004) bekannt werden (Streit und Schmitz, 2004).

2.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit bestand in der Analyse des Sekundärmetabolismus und des biotechnologischen Potenzials mariner Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen. Es kamen Methoden der klassischen Kultivierung sowie der Metagenomik zum Einsatz.

Zunächst sollten Streptomyceten aus mediterranen und tropischen Schwämmen isoliert und mittels Sequenzierung und phylogenetischer Analyse des 16S rRNA Gens taxonomisch identifiziert werden. Die Isolate der Stammsammlung sollten auf Aktivitäten gegen verschiedene Gram-positive und Gram-negative Infektionserreger durchmustert werden. Positive Kandidaten sollten im größeren Maßstab angezogen, die Anzuchtbedingungen für Wirkstoffproduktion optimiert und die Strukturaufklärung des Wirkprinzips (in Kooperation mit T. Gulder und Prof. G. Bringmann, Organische Chemie, Universität Würzburg) aufgeklärt werden. Darüberhinaus war es ein Ziel, Wirkstoffgencluster mittels molekularbiologischer Methoden zu identifizieren und ggf. zur Expression zu bringen.

Ein taxonomisch neuartiges, dem Phylum *Verrucomicrobia* zugehöriges Isolat sollte auf die Produktion von Wirkstoffen untersucht werden. Darüberhinaus sollte eine formale taxonomische Erstbeschreibung dieser neuen Art erfolgen.

Eine in vorherigen Arbeiten erstellte Metagenombank aus dem mikrobiellen Konsortium des Schwammes *Aplysina aerophoba* sollte auf die Anwesenheit von FADH₂-abhängigen Halogenasen untersucht werden. Da Halogenasen als Schlüsselenzyme des Sekundärmetabolismus gelten, dienten Halogenasen als „Anker“ zur Identifikation von Wirkstoffgenclustern. Nach Erstellung von degenerierten PCR Primern sollten Halogenasetragende Metagenomklone sequenziert, der genomische Kontext *in silico* analysiert und der respektive Wirkstoffgencluster ggf. zur Expression gebracht werden. Da die Enzymklasse der Halogenasen von biotechnologischer Bedeutung z.B. in der Herstellung von Feinchemikalien ist, sollte darüberhinaus versucht werden, Halogenasen heterolog zu exprimieren.

3. Material

3.1 Mikroorganismen

Tabelle 1 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroorganismen.

Organismus	Verwendung	Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	Klonierungen	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIZ ΔM15</i> Tn10 (TetR)]
<i>Escherichia coli</i> M15[pREP4]	Proteinexpression	<i>Nal^S, Str^S, Rif^S, Thi⁻, Lac⁻, Ara⁺, Gal⁺, Mtl⁻, F⁻, RecA⁺, Uvr⁺, Lon⁺</i>
<i>Escherichia coli</i> Epi100	Metagenombank APAE02	Genotyp: F ⁻ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 araD139 Δ(ara,leu) 7697 galU galK λ⁻ rspL nupG</i>
<i>Amycolatopsis orientalis</i>	DNA als Matrize für PCR	Vancomycin Produzent
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	DNA als Matrize für PCR	Wildtyp
<i>Pseudomonas syringae</i>	DNA als Matrize für PCR	Wildtyp
<i>Shigella flexneri</i>	DNA als Matrize für PCR	Wildtyp
<i>Salmonella typhimurium</i>	DNA als Matrize für PCR	Wildtyp
<i>Yersinia enterocolytica</i>	DNA als Matrize für PCR	Wildtyp
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Nachweis antimikrobiell wirksamer Streptomyceten	F ⁻ , <i>endA1, hsdR17 (r_k⁻, m_k⁻), supE44, thi-1, recA1, GyrA96, relA1, λ⁻, Δ(argF-lac)U169, Φ80dlacZΔM15</i>
<i>Staphylococcus aureus</i> 118	Nachweis antimikrobiell wirksamer Streptomyceten	Wildtyp
<i>Candida albicans</i>	Nachweis antimikrobiell wirksamer Streptomyceten	Wildtyp

3.2 Plasmide

Tabelle 2 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Plasmide.

Vektor	Sequenzierprimer	[bp]	Selektionsmarker	Referenz
pAY1	pAY1seq, pAY1rev	9100	Apra ^R	Li und Piel, 2002
pCC1	pEF5f/r, T3	8100	Chl ^R	http://www.Epicentre.com
pEpiFos5	pEF5f/r, T3	7515	Chl ^R	http://www.Epicentre.com
pGEM T easy	SP6, T7, M13f/r	3018	Amp ^R	http://www.Promega.com/vectors/
pQE30	pQE30f/r	3461	Amp ^R	http://www.qiagen.com

3.3 Enzyme und „Kits“

Tabelle 3 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Enzyme und „Kits“.

Enzyme, Kits	Bezugsquelle
ABI Prism™ Big Dye™ Terminator Sequencing Ready Reaction Mix	Applied Biosystems
Phosphatase (CIP) zzgl. Reaktionspuffer	NEB
Fast DNA Spin Kit (for soil)	Q-Biogene
Größenstandards DNA	MBI Fermentas, NEB
Größenstandard Protein	NEB
Lysozym	Sigma
pGEM T easy vector system	Promega
Proteinase K	Sigma
QIAexpress® Penta-His-Antikörper	QIAGEN
QIAexpressionist™ Protein Expression	QIAGEN
QIAprep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification/ Gel Extraction Kit	QIAGEN
Pfx DNA-Polymerase	Invitrogen
Plasmid Midi Kit	QIAGEN
Restriktionsendonukleasen zzgl. Reaktionspuffer	NEB
Rnase A aus Rinderpankreas	Roche
SequiTherm EXEL™ II Long-Read™ DNA Sequencing Kit-LC	Epicentre
T4-DNA-Ligase zzgl. Reaktionspuffer	NEB
Taq DNA Polymerase zzgl. Reaktionspuffer	QIAGEN

3.4 Chemikalien

Tabelle 4 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Chemikalien.

Substanz	Bezugsquelle
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (SDS-PAGE)	Roth
40% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1 (DGGE)	BioRad
Agar	Difco
Agarose	Gibco
Ammoniumperoxodisulfat	Merck

Tabelle 4 Fortsetzung

Substanz	Bezugsquelle
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat	Fluka
Ampicillin	AppliChem
Apramycin	Sigma-Aldrich
Arginin	Sigma-Aldrich
L-Asparagin	Sigma-Aldrich
Borsäure	AppliChem
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranosa(X-Gal)	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	AppliChem
Chitin aus Krabbenschalen	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich
Chloroform	Roth
Coomassie-Blau G250	AppliChem
Difco Casaminosäuren	Difco
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Roth
N,N-Dimethylformamid	AppliChem
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Eisensulfat-Heptahydrat	Fluka
Essigsäure	AppliChem
Ethanol (absolut 100%)	Merck
Ethanol (vergällt, 96%)	Roth
Ethidiumbromidlösung	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na ₂ EDTA x 2H ₂ O)	Serva
86% Glycerin	Roth
Glukose	AppliChem
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth
Hefeextrakt	Gibco
„HiDi“-Formamid	Applied Biosystems
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	Sigma-Aldrich

Tabelle 4 Fortsetzung

Substanz	Bezugsquelle
1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	AppliChem
Kaliumacetat	AppliChem
Kaliumbromid	Fluka
Kaliumchlorid	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich
Kobaltnitrat	Sigma-Aldrich
Kupfersulfat-Pentahydrat	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	Drogerie Müller
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	AppliChem
Malzextrakt	AppliChem
Mangansulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich
Mannitol	AppliChem
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
3-Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	AppliChem
Natriumacetat-Trihydrat	AppliChem
Natriumborat	Sigma-Aldrich
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid	Fluka
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxidplättchen	AppliChem
Natriumsulfat	Merck
Nitrilotriessigsäure	Sigma-Aldrich
Osmium-Tetroxid	Sigma-Aldrich
Pektin C	Roth
Pepton aus Casein	Roth
Phenol	AppliChem
Phosphorsäure	Merck
Piperazin-1,4-bis-2-ethansulfonsäure (PIPES)	Roth
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	AppliChem

Tabelle 4 Fortsetzung

Substanz	Bezugsquelle
Ribose	Roth
Propylenoxid	Sigma-Aldrich
Saccharose	Roth
Salzsäure	AppliChem
Sojamehl	Neuform
Sorbose	Roth
Stärke, löslich	Roth
Strontiumchlorid-Hexahydrat	Fluka
TEMED	AppliChem
TES Puffer	Roth
Tris-Base	Sigma-Aldrich
Triton X-100	AppliChem
Tween-20	AppliChem
Uranylacetat	Sigma-Aldrich
Xylan	Roth
Xylencyanol	AppliChem
Zinksulfat-Heptahydrat	Sigma-Aldrich

3.5 Oligonukleotide

Tabelle 5 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingt. (°C)	Referenz	Verwendung
27f	GAGTTTGATCCTGGCTCA	56	Lane (1991)	Amplifikation bakterieller 16S-rRNA Gene
1492r	TACGGCTACCTTGTTACGACTT	56	Lane (1991)	Amplifikation bakterieller 16S-rRNA Gene
KSDPQQf	MGNGARGCANNWNSMNATGGAYCCNCARCANMG	53	Piel (2002)	Amplifikation von Typ I PKS-Systemen
KSHGTGr	GGRTCNCNARNNSWNGTNCNGTNCRTG	53	Piel (2002)	Amplifikation von Typ I PKS-Systemen
M13f	ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG	50	Promega	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
M13r	TTCACACAGGAAACAGCTATGACC	50	Promega	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
pEF5f	GGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG	60	Epicentre	Sequenzierung von pEPIfos5
PEF5r	CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC	60	Epicentre	Sequenzierung von pEPIfos5
pAY1seq	AAATTGCATCAACGCATATA	53	Grozdanov (pers. M.)	Sequenzierung des Shuttlevektors pAY1
pAY1rev	ACAGGAAACAGCTATGACCATGATT	60	Grozdanov (pers. M.)	Sequenzierung des Shuttlevektors pAY1
pQEseq	CGGATAACAATTTACACACAG	53	Qiagen	Sequenzierung des Vektors pQE30
pQEseqrev	GTTCTGAGGTCATTAAGTGG	49	Qiagen	Sequenzierung des Vektors pQE30
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	45	Promega	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
T3	AATTAACCCCTCACTAAAGGG	50	Epicentre	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
T7	GTAATACGACTCACTATAGGG	50	Promega	Sequenzierung von Klonierungsvektoren
HALOforA	CATCGGCGGCGGNMYNGSNGG	-	diese Arbeit	Amplifikation von Halogenase-Genen
HALOforC	TGAGGGCCCGGTTGRTNRTNGAYGC	-	diese Arbeit	Amplifikation von Halogenase-Genen
HALOforD	GGACGGCTGGTTCTGGNHNATHCC	63	diese Arbeit	Amplifikation von Halogenase-Genen
HALOrevD	GTCGGTGAGGGGGATCDNCCANANCCA	-	diese Arbeit	Amplifikation von Halogenase-Genen
HALOrevE	CACGCCGCGGGAGWANANNGGRTC	63	diese Arbeit	Amplifikation von Halogenase-Genen
pol012for	AATGTTAGTAACTAGTCACAGGGGTTG	58	diese Arbeit	Amplifikation des Pol012-16S-rRNA Gens
pol012rev	AAGTGACTAATACGCATTTATGTTTGA	58	diese Arbeit	Amplifikation des Pol012-16S-rRNA Gens

Tabelle 5 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingt. [°C]	Referenz	Verwendung
Ver53f	TGGCGGCGTGGWTAAGA	61	Stevenson et al. 2004	Amplifikation verrucomicrobieller 16S-rRNA Gene
Verseq	ACACYGGRACCTGAGACACGG	60	diese Arbeit	Sequenzierung verrucomicrobieller 16S-rRNA Gene
BamHallexfor	GGATCCATGCCGGTTGAAAAGCCAAT	60	diese Arbeit	Amplifikation der Halogenase 42I22
HindHallexrev	AAGCTTCCTAGTCAAGTGCCCTCCA	60	diese Arbeit	Amplifikation der Halogenase 42I22

3.6 Computerprogramme

Tabelle 6 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Computerprogramme.

Programm	Verwendung	Referenz
ARB	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf 16S rRNA Nukleotidsequenzen	http://www.arb-home.de
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Nukleotid- und Aminosäure Sequenz- und Datenbankvergleiche	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST
Bellerophon	Nachweis chimärer 16S-rRNA Gen Amplifikationsprodukte	http://foo.maths.uq.edu.au/~huber/bellerophon.pl
ClustalX	Automatisches Nukleinsäure- und Aminosäuresequenzalignment	http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/clustalx.html
DAS transmembrane prediction server	Identifikation von Transmembrandomänen in Proteinen	http://www.sbc.se/~miklos/DAS/
Genome Net	Genomdatenbank	http://www.genome.ad.jp/
Image Tool 3.00	Längenmessung von Bakterien	http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html
Interpro	Proteindatenbank	http://www.ebi.ac.uk/interpro
MDL ISIS Draw 2.5	Erstellung von Strukturformeln	http://www.mdli.com/
MultiAnalyst 1.1	Dokumentation von Agarose- und Polyacrylamidgelen	BioRad
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nih.gov/
NRPSpredictor	Analyse von Adenylierungsdomänen von NRPS Systemen	http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred
ORF-finder	ORF-Identifikation	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html
Photoshop	Bildbearbeitung	Adobe
Phylip	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html
Primer3	Design von PCR-Primern	http://www.frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Programme für bioinformatische Analysen	Verschiedene Anwendungen und Internet links	http://www.bioinformatics.weizmann.ac.il/ http://www.bip.weizmann.ac.il/bio-tools/dna-tools.html#motif
Treeview	Visualisierung phylogenetischer Stammbäume nach Phylip Anwendungen	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Vector NTI 6.0	ORF-Identifikation, Strukturierung genomischer Sequenzfragmente	Informax

3.7 Geräte und Verbrauchsmaterial

Tabelle 7 Während der vorliegenden Arbeit verwendete Materialien und Geräte.

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Autoklaven	FOM/B50	Fedegari
	9191E	Fedegari
	500	Varioklav
Brutschränke	Kelvitron t	Hereaus Instruments
	TV40b	Memmert
Destillieranlage	Bi-Dest 2304	GFL
Einmalspritzen	-	Pharmaplast
Eismaschine	AF-20	Scotsman
Elektroporationsgerät	Easyject Prima	Equibio
Faltenfilter	-	Schleicher & Schuell
Feinpipetten	Pipetman	Gilson
	Reference	Eppendorf
Feinwaage	JL-180	Chyo
Gefriertrockenanlage	Lyovac GT 2E	Steris
Geldokumentation	Gel Doc 2000	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammern	-	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer, PFGE	CHEF-DR II	Bio-Rad
Gelelektrophoresekammer, SDS-PAGE	P8DS	Owl separation systems
Gefrierschrank (-20°C)	Öko super	Liebherr
Gefrierschrank (-80°C)	Sepatech	Hereaus Instruments
Heizblock	-	Liebisch
Hybridisierungsöfen	OV5	Biometra
Heizplatte mit Magnetrührer	L32	Labinco
Kühlschrank (4°C)	Superöko	Privileg
Mikrotiterplatten (384-wells)	-	Nunc
Mikroskop	Axiolab	Zeiss
Mikrowelle	8020	Privileg
Netzgeräte (Elektrophorese)	Power Pac 300	Bio-Rad
Nylonmembran	Nytran Super Charge	Schleicher & Schuell
Objektträger	mit 8 Feldern	Superior Marienfeld
Parafilm	4 Inch x 125 Fuß	Pechiney
PCR Maschine	T3-Thermocycler	Biometra
Petrischalen (rund, 56,7cm ²)	-	Greiner
Agarschalen (quadratisch, 500cm ²)	Nunclon™	Nalgen Nunc International
pH-Meter	pH 525	WTW
Photometer	Ultraspec III	Pharmacia Biosystems
Rasterelektronenmikroskop	DSM 962	Zeiss

Tabelle 7 Fortsetzung

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Einmalküvetten	Halbmikro 1,5ml	Plastibrand
Quarzküvetten	Suprasil	Hellma
Reaktionsgefäße (1,5; 2ml)	-	Sarstedt
Reaktionsgefäße (0,5ml)	Thermo Tubes	ABgene
Reaktionsgefäße (0,2ml)	Thermo Strip	ABgene
Reaktionsgefäße (15ml)	-	Falcon
Reaktionsgefäße (50ml)	-	Greiner
Replikastempel	384 pin-replicator	Nalgen Nunc International
Röntgenfilm 13 x 18cm	X-ray RETINA 100 NIF	Photochemische Werke GmbH
Schüttler	HT	Infors AG
Sensidiscs	unbeschickt	Becton Dickinson
Sequenzierer	310 Genetic Analyzer	ABI Prism
Sequenzierer	DNA Sequenzierer 4200	LI-COR
Sterilbank	-	Nunc
Sterilfilter	Millex-GS 0,22µm	Millipore
	Bottletop Filter	Nunc
Tischzentrifuge	Biofuge frasco	Hereaus Instruments
Transmissionselektronenmikroskop	EM 10	Zeiss
Ultraschallwasserbad	SONOREX RK 100	Bandelin
Ultraschallspitze	SONOPULS HD 70 mit UW 70	Bandelin
Vivaspin Zentrifugenröhrchen	-	Vivascience
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Wasserbad	Type 1002	GFL
Zentrifuge	J2-HC	Beckman

3.8 Medien, Puffer und Lösungen

Artifizielles Seewasser (ASW) (Lyman und Fleming, 1940)

NaCl	234,7 g
Na ₂ SO ₄	39,2 g
MgCl ₂ *6H ₂ O	106,4 g
CaCl ₂	11,0 g
NaHCO ₃	1,92 g
KCl	6,64 g
KBr	960 mg
H ₃ BO ₃	260 mg
SrCl ₂	240 mg
NaF	30 mg
H ₂ O _{dd}	ad 10 l

„Blocking“ Puffer (Western-Blot)

BSA	1,5 g
TBS	ad 50 ml

CaCl₂-Lösung zur Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen

CaCl ₂ (1M)	60 ml
Glycerin (86%)	174 ml
PIPES (0,5 M; pH 7,0)	20 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Ca- und Mg-freies Seewasser (CMFASW)

Die Zusammensetzung entspricht der von artifiziellem Seewasser ohne die Salze MgCl₂*6H₂O und CaCl₂.

Coomassie-Blau G250 Lösung

Coomassie-Blau G250	2,5 g
Methanol	440 ml
Essigsäure (100%)	100 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

DNA-Ladepuffer 5x

TE	5 ml
Glycerin (86%)	4,92 ml
Xylencyanol	4 mg
Bromphenolblau	4 mg

Elutionspuffer für die Aufreinigung von Proteinen mit Ni-NTA-Agarose

NaH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	17,6 g
Imidazol	17 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Entfärbelösung für Coomassie-Blau Gele

Methanol	200 ml
Essigsäure (100%)	100 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Hutner's Salze (Cohen-Bazire et al., 1957)

Nitrilotriessigsäure	10 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	29,7 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	3,335 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4H ₂ O	9,25 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	99 mg
“Metals 44”	50 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Kolloidales Chitin (Hsu und Lockwood, 1975)

40 g Chitin aus Krabbenschalen (SIGMA C7170-100G) wurden 30 bis 50 min in 400 ml konzentrierter Salzsäure verrührt. Die Suspension wurde langsam zu 5 bis 10°C kaltem Wasser gegeben um das Chitin auszufällen. Nach Filtration wurde das Chitin mindestens drei Mal mit je 5 l Wasser gewaschen bis der pH-Wert etwa 3,5 erreichte. Die wässrige Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur gelagert.

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Lysis-Puffer für die native Aufreinigung von rekombinanten Proteinen

NaH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	17,6 g
Imidazol	0,68 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

M1-Agar (Mincer et al., 2002)

Stärke	10 g
Hefeextrakt	4 g
Peptone	2 g
Agar	18 g
ASW	ad 1 l

M2-Medium (Mincer et al., 2002)

Glycerin (100%)	6 ml
Arginin	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
MgSO ₄	0,5 g
Agar	18 g
ASW	ad 1 l

M3-Medium (Mincer et al., 2002)

Glukose	6 g
kolloidales Chitin	2 g
Agar	18 g
ASW	ad 1 l

M4-Medium (Mincer et al., 2002)

kolloidales Chitin	2 g
Agar	18 g
ASW	ad 1 l

M5-Medium (Mincer et al., 2002)

Agar	18 g
ASW	ad 1 l

„Metals 44“ (Schlesner, 1994)

Na-EDTA	250 mg
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1095 mg
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	500 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	154 mg
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	39,2 mg
Co(NO ₃) ₂ x 6H ₂ O	24,8 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ x 10 H ₂ O	17,7 mg
H ₂ O _{dd}	ad 100 ml

MM-Medium (Hopwood, 1967)

L-Asparagin	0,5 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	0,2 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,01 g
Agar	10 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml sterilfiltrierte Glukose (50% w/v) zugegeben.

MS-Agar (Hobbs et al., 1989)

Mannitol	20 g
Sojamehl	20 g
Agar	20 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

P1-Puffer

Tris	6,06 g
Na ₂ EDTA * 2 H ₂ O	3,72 g
RNAse	100 mg
H ₂ O _{dd}	ad 1 l
pH 8 mit HCl einstellen	

P2-Puffer

NaOH	8,0 g
SDS-Lösung (10%)	100 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

P3-Puffer

KOAc	294,5 g
H ₂ O _{dd}	ad 500 ml
pH 5,5 mit Eisessig einstellen (ca. 110 ml)	
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

PBS

NaCl	0,8 g
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	0,125 g
KCl	0,02 g
KH ₂ PO ₄	0,02 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

QBT-Puffer (Qiagen)

NaCl	43,83 g
MOPS (freie Säure)	10,46 g
H ₂ O _{dd}	ad 800 ml
pH 7 mit NaOH einstellen, danach Zugabe von:	
Isopropanol	150 ml
Triton X-100 (10%)	15 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

QC-Puffer (Qiagen)

NaCl	58,44 g
MOPS (freie Säure)	10,46 g
H ₂ O _{dd}	ad 800 ml
pH 7 mit NaOH einstellen, danach Zugabe von:	
Isopropanol	150 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

QF-Puffer (Qiagen)

NaCl	73,05 g
Tris	6,06 g
H ₂ O _{dd}	ad 800 ml
pH 8,5 mit HCl einstellen, danach Zugabe von:	
Isopropanol	150 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

SDS-Polyacrylamid-Sammelgel (6%)

Rotiphorese [®] Gel 40 (37,5:1)	1,6 ml
Tris-HCl (1 M; pH 6,8)	2 ml
SDS (10%)	160 µl
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	80 µl
TEMED	20 µl
H ₂ O _{dd}	6,2 ml

SDS-Polyacrylamid-Trenngel (10-15%)

Rotiphorese [®] Gel 40 (37,5:1)	2,67 - 4 ml
Tris-HCl (1 M; pH8,8)	4 ml
SDS (10%)	106,0 µl
Ammoniumperoxodisulfat (10%)	133,3 µl
TEMED	6,6 µl
H ₂ O _{dd}	3,75 – 2,4 ml

SDS-Probenpuffer (2x)

Tris-HCl (1 M; pH 6,8)	0,5 ml
SDS (10%)	2 ml
Bromphenolblau	4 mg
Glycerin (86%)	2,3 ml
β -Mercaptoethanol	59 μ l
H ₂ O _{dd}	ad 10 ml

SDS-Laufpuffer 10x

Tris-Base	60 g
SDS	15 g
Glycin	150 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

„Semi-Dry-Blotting“-Puffer

Tris	3,03 g
Glycin	14,4 g
MeOH	200 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

SET-Puffer

NaCl (1 M)	750 μ l
EDTA (0,5 M; pH 8)	500 μ l
Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	200 μ l
H ₂ O _{dd}	ad 10 ml

SMMS-Agar (Kieser et al., 2000)

Difco Casaminosäuren	2 g
TES Puffer	5,73 g
Agar	16 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Nach dem Autoklavieren wurden folgende Lösungen sterilfiltriert zugegeben:

NaH ₂ PO ₄ + K ₂ HPO ₄ (je 50 mM)	10 ml
MgSO ₄ (1 M)	5 ml
Glukose (50% w/ v)	18 ml
Spurenelemente	1 ml

SOC-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl (1 M)	10 ml
KCl (1 M)	2,5 ml
MgCl ₂ (2 M)	10 ml
Glukose (2 M)	10 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

MgCl₂ und Glukose wurden als sterilfiltrierte Lösungen zum autoklavierten Medium gegeben.

Spurenelemente für SMMS-Agar (Kieser et al., 2000)

ZnSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g
FeSO ₄ *7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂ *4H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ *6H ₂ O	0,1 g
NaCl	0,1 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

TBS

Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	10 ml
NaCl (1 M)	150 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

TBS-Tween-Triton

Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	20 ml
NaCl (1 M)	500 ml
Tween-20	0,5 ml
Triton X-100	2 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

TE

Tris-HCl-Lösung (1 M; pH 8)	10 ml
EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)	2 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

TE-50

Tris-HCl-Lösung (1 M; pH 8)	10 ml
EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8)	100 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Tris-Acetat (TAE) 50x

Tris-Base	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	100 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Tris-Borat (TBE) 5x

Tris-Base	54 g
Borsäure	27,5 g
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	20 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Tris-Phosphat (TPE) 10x

Tris-Base	108 g
Phosphorsäure (85%)	15,5 ml
EDTA (0,5 M; pH 8,0)	40 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Ver100-Medium

Trypton	1,5 g
Hefeextrakt	1,5 g
Glukose	1,5 g
Tris-HCl (1 M; pH 7,5)	5 ml
Hutner's Salze	20 ml
ASW	800 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Waschpuffer für die Aufreinigung von Proteinen mit Ni-NTA-Agarose

NaH ₂ PO ₄	3 g
NaCl	17,6 g
Imidazol	1,36 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

YEME-Medium (Kieser et al., 2000)

Bacto-Pepton	5 g
Hefeextrakt	3 g
Malzextrakt	3 g
Glukose	10 g
Saccharose	340 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l
Nach dem Autoklavieren wurden zugegeben:	
MgCl ₂ *6H ₂ O (2,5 M)	2 ml

YPD-Agar

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Glukose	20 g
Agar	15 g
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

Zobell-Medium (Oppenheimer und Zobell, 1952)

Pepton	5 g
Hefeextrakt	1 g
ASW	750 ml
H ₂ O _{dd}	ad 1 l

3.9 Größenstandards für Gelelektrophoresen

Um die Größe aufgetrennter DNA Fragmente in Agarosegelen zu bestimmen, 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 7).

„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 7).

„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 7).

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 7).

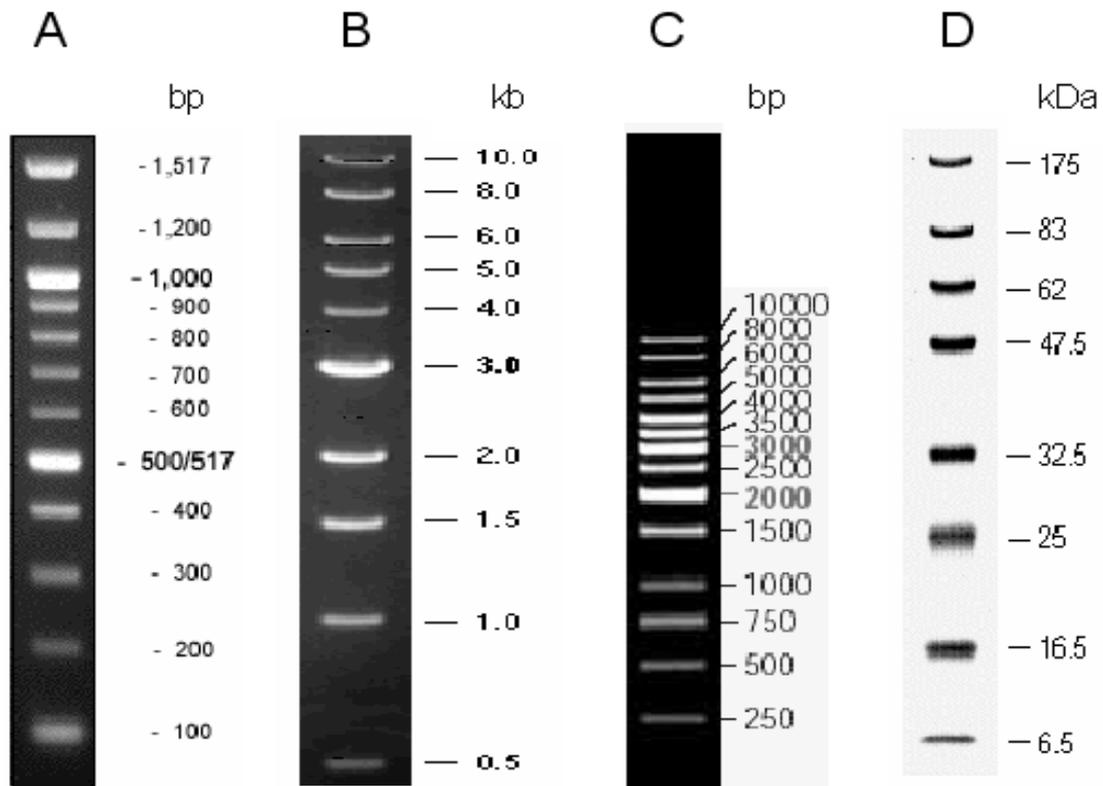


Abbildung 7 Während dieser Arbeit verwendete Größenstandards für Gelelektrophoresen. A: „100 bp DNA Ladder“ (NEB), B: „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (MBI Fermentas), C: „1 kb DNA Ladder“ (New England Biolabs), D: „prestained protein marker“ (New England Biolabs).

4. Methoden

Standardmethoden wurden Maniatis et al. (1989) und Sambrook und Russell (2001) entnommen. Die im Verlauf der Arbeit verwendeten Puffer, Lösungen, Geräte, Organismen, Vektoren, Oligonukleotide und „Kits“ wurden unter Punkt 3 (Material) aufgelistet.

4.1 Sammlung von Schwämmen

Individuen der Schwämme *Aplysina aerophoba*, *Axinella polypoides* und *Axinella damicornis* wurden 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. Proben von *Aplysina fistularis*, *A. insularis*, *A. archeri*, *A. lacunosa*, *A. cauliformis*, *Pseudoceratina crassa*, *Xestospongia muta*, *Chondrilla nucula*, *Agelas citrina*, *A. clathrodes*, *A. wiedenmayeri*, *A. cerebrum*, *Ptilocaulis* sp. und *Ectyoplasia ferox* wurden vor der Insel Little San Salvador, Bahamas, in einer Wassertiefe von 5 bis 15 m im Juli 2000 gesammelt. *Theonella swinhoei* wurde vor den Caroline Islands, Palau, gesammelt. *Aplysina fistularis* wurde außerdem vor San Diego, Kalifornien, USA, *Aplysina cavernicola* vor Elba, Italien, *Agelas wiedenmayeri* vor den Florida Keys, USA, gesammelt. Einzelne Individuen wurden in Plastiktüten zur Oberfläche gebracht und entweder sofort zur weiteren Verarbeitung an Land gebracht, oder in ca. 1 cm³ große Stücke zerteilt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung des Materials erfolgte bei -80°C.

4.2 Kultivierung von Mikroorganismen

4.2.1 Isolierung von Streptomycceten aus marinen Schwämmen

Bakterielle Fraktionen verschiedener mariner Schwämme wurden, wie unter Punkt 4.4.2 beschrieben, gewonnen. Diese wurden in ASW resuspendiert und verschiedene Verdünnungsstufen auf fünf Nährböden ausplattiert. Die Zusammensetzung dieser Nährböden sind unter Punkt 3.8 (M1-M5) beschrieben. Außer den dort angegebenen Substanzen wurde jeweils noch Rifampicin (5 µg/ ml) und Cycloheximid (100 µg/ ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte bei RT oder 30°C für mindestens 1-2 Wochen. Kolonien, die charakteristische Streptomyccetenmerkmale wie Inkrustierung im Agar oder Sporenbildung zeigten, wurden vereinzelt und überimpft. Zur Identifizierung der Bakterien wurde eine PCR mit den eubakteriellen 16S-rDNA Primern 27f und 1492r durchgeführt und das Produkt mit diesen Primern sequenziert.

4.2.2 Medienoptimierung für *Rubritalea marina*

Rubritalea marina wurde aus dem mediterranen Schwamm *Axinella polypoides* auf M1-Agar isoliert. Für die weitere Kultivierung wurde die Zusammensetzung des von der DSMZ für die Kultivierung von *Verrucomicrobium spinosum* empfohlenen Mediums wie folgt modifiziert: Die Konzentration an artifiziell Seewasser wurde von 25% auf 100% erhöht. Ebenfalls wurden die Mengen der Nährstoffe Pepton, Hefeextrakt und Glukose um das Fünffache erhöht. Auf die Zugabe spezieller Vitamine wurde verzichtet. Wenn nicht anders gekennzeichnet, erfolgte die Inkubation bei 30°C. Flüssigkulturen wurden außerdem bei 200 rpm geschüttelt.

4.3 Mikrobiologische Nachweisverfahren

4.3.1 Überschichtungsassay

Die zu testenden Bakterien wurden auf dem jeweils für ihre Isolation benutztem Nährboden ohne Antibiotikum ausgestrichen. Die Inkubationstemperatur und -zeit richtete sich nach den individuellen Anforderungen des jeweiligen Organismus. Nach erfolgtem Bewuchs wurden die Agarplatten für 5 min mit der Öffnung nach unten über ein Uhrglas mit Chloroform gestellt, um die Bakterien abzutöten. Daraufhin wurde eine Schicht LB- (*E. coli* und *S. aureus*) oder YPD-Agar (*C. albicans*) über die Kolonien gegossen und nach Erhärtung und Trocknung die Testorganismen *E. coli* DH5 α , *S. aureus* WT oder *C. albicans* ausplattiert. Die Platten wurden für eine weitere Nacht bei 37°C (*E. coli* und *S. aureus*) oder 30°C (*C. albicans*) bebrütet und am nächsten Tag auf Hemmhöfe im Rasen der Testorganismen untersucht. Diese gaben einen Hinweis auf die Produktion einer antimikrobiell wirksamen Substanz durch die untersuchten Isolate.

4.3.2 Agardiffusionstest

Um zu ermitteln, ob bestimmte Substanzen antimikrobielle Aktivität besaßen, wurde ein sogenannter Agardiffusionstest durchgeführt. Hierzu wurden diese Substanzen in verschiedenen Lösungsmitteln (H₂O, Ethylacetat, DMSO, MeOH) aufgenommen, oder komplette organische Extrakte (MeOH, Ethylacetat) von Bakterienkulturen verwendet. Als Testorganismen wurden *E. coli* DH5 α , *S. aureus* WT und *C. albicans* verwendet. Diese wurden auf LB- (*E. coli* und *S. aureus*) oder YPD-Agar (*C. albicans*) ausplattiert. Auf diese Agarplatten wurden sterile Filterplättchen aufgebracht, die zuvor mit den organischen Extrakten oder Substanzen beschickt worden waren. Nach Inkubation bei 37°C (*E. coli* und *S. aureus*) oder 30°C (*C. albicans*) über Nacht wurden die Platten auf das Vorhandensein von

Hemmhöfen um die Testplättchen untersucht. Diese ermöglichten eine Aussage über die antimikrobielle Aktivität der auf die Plättchen aufgetragenen Substanzen oder Extrakte.

4.3.3 Analyse zellulärer Eigenschaften

Die Bestimmung der Peptidoglycanstruktur der Zellwand erfolgte durch die DSMZ (Braunschweig, Deutschland) nach Schleifer (1985). Der GC-Gehalt, die zellulären Fettsäuren und die Chinone wurden von Dr. B. J. Tindall (DSMZ) bestimmt.

4.3.4 Oxidase- und Katalase-Test

Zur Bestimmung der Produktion von Oxidasen wurden Bakterien auf festem Nährmedium angezogen. Nach Bildung von ausreichend Biomasse wurde eine Probe mittels eines Spatels von der Platte abgenommen und auf ein „DrySlide™ Oxidase“ Testplättchen (DIFCO Laboratories) überführt. Das Bakterium wurde positiv in Bezug auf Oxidaseproduktion eingestuft, wenn es zu einer violetten Farbreaktion kam. Zur Bestimmung der Produktion von Katalasen wurden Bakterien auf festem Nährmedium angezogen. Nach Bildung von ausreichend Biomasse wurden die Kolonien mit H₂O₂ (30%) übergossen. Das Bakterium wurde positiv in Bezug auf Katalaseproduktion eingestuft, wenn es zu einer Gasentwicklung kam.

4.3.5 Spektrophotometrische Analyse

Für die Extraktion des roten Pigmentes von *Rubritalea marina* wurden Zellen aus 5 ml einer bis zur stationären OD gewachsenen Flüssigkultur bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge für 2 min abzentrifugiert und das Pellet in 1 ml EtOH (100%) resuspendiert. Durch zweiminütiges intensives Vortexen konnte der rote Farbstoff aus den Zellen herausgelöst werden, die nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation ein farbloses Pellet bildeten. Vom rötlichen EtOH-Überstand wurde mittels eines Spektrophotometers ein Absorptionsspektrum zwischen 220 und 900 nm Lichtwellenlänge aufgenommen.

4.4 Nukleinsäureanalytische Methoden

4.4.1 Isolierung von DNA aus Schwammgewebe

Für die Isolierung von DNA aus Schwammgewebe wurde das „FastDNA® SPIN Kit (for soil)“ der Firma Q-BIOgene verwendet. Das Schwammgewebe wurde dazu in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Ungefähr

500 mg des zerriebenen Schwammgewebes wurden dann gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet.

4.4.2 Isolierung von DNA aus Schwamm-assoziierten Mikroorganismen

Frisch gesammelte Schwämme wurden gesäubert und in kaltem CMFASW+10 mM EDTA in ca. 10 mm³ kleine Stücke zerschnitten. Ungefähr 10 ml dieser Stücke wurden mit dem fünffachen Volumen CMFASW für 15 bis 20 min bei Raumtemperatur geschüttelt und im Anschluss mit Mörser und Pistill soweit wie möglich zerkleinert. Grobe Schwammstücke wurden durch Filtration über einen Faltenfilter entfernt. Um die Schwammzellen abzutrennen, wurde die Suspension für 45 min bei 200 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und erneut bei 4000 x g und 4°C für 45 min zentrifugiert. Mittels Lichtmikroskopie konnte festgestellt werden, dass das Pellet zum größten Teil aus Mikroorganismen bestand und nur eine geringe Zahl an Schwammzellen aufwies. Zur Isolierung der DNA wurde im Anschluss das „FastDNA[®] SPIN Kit (for soil)“ der Firma Q-BIOgene verwendet.

4.4.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Plasmidisolierung wurden 3 ml LB-Medium mit dem jeweils notwendigen Antibiotikum in ein Kapsenbergröhrchen gegeben, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Jeweils 1,5 ml der Kulturen wurden dann bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge pelletiert, der Überstand bis auf 100 µl abgossen und die Bakterien im verbleibenden Medium resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lysepuffer und vorsichtigem mehrmaligen Invertieren erfolgte ein Inkubationsschritt bei RT für 5 min. Zur Ausfällung der Proteine wurden anschließend 150 µl Natriumacetat-Lösung (3 M; pH 4,8) zugegeben, erneut mehrmals vorsichtig invertiert und zweimal für jeweils 5 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 500 µl Isopropanol ausgefällt, bei 13000 rpm für 15 min pelletiert, mit 500 µl EtOH (70%) gewaschen und erneut für 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O_{dd} aufgenommen.

4.4.4 Isolierung von Fosmid-DNA aus Metagenom-„Pools“

Um alle Fosmide eines APAE02 „Pools“ gleichzeitig zu analysieren, wurden die 384 Klone in einem „Pool“ mittels eines „384 pin replicators“ (Nunc) auf Agarplatten transferiert und bis zur Bildung ausreichender Biomasse bei 37°C inkubiert. Die Kolonien wurden von der Platte

mit Hilfe eines Drigalskispatels und 10 ml TE abgeschwämmt, zentrifugiert und die Fosmide mit dem „QIAprep[®] Miniprep Kit“ (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben für die Aufreinigung von „low copy“ Cosmiden gereinigt. Die Fosmid-DNA des gesamten Pools wurde anschließend mittels PCR untersucht.

4.4.5 Analytische Isolierung von Fosmid-DNA einzelner Metagenomklone

Um einzelne Fosmide terminal ansequenzieren zu können, wurden 8 ml Übernachtskultur des jeweiligen Metagenomklones abzentrifugiert und aus der Zellmasse Fosmid-DNA mit Hilfe des „QIAprep[®] Miniprep Kit“ (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben für die Aufreinigung von „low copy“ Cosmiden gereinigt.

4.4.6 Präparative Isolierung von Fosmid-DNA einzelner Metagenomklone

Zur Fosmidisolierung wurden 500 ml LB-Medium mit dem notwendigen Antibiotikum in einen 1 l Erlenmeyerkolben gegeben, mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Die Bakterien wurden in einer Beckman J2-HC Zentrifuge (Rotor: JA-10) bei 6000 rpm und 4°C pelletiert und in 20 ml P1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 20 ml Puffer P2 und vorsichtigem Invertieren wurde die Lösung für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit 20 ml Puffer P3 versetzt und 30 min auf Eis gelagert. Nach zweimaliger Zentrifugation in oben erwähnter Zentrifuge (Rotor: JA-14) für 30 min bei 12000 rpm und 4°C wurden 42 ml Isopropanol zum Überstand gegeben und die ausgefällte DNA unter den gleichen Bedingungen pelletiert. Nach fünfminütiger Antrocknung des Pellets wurde dieses in 2 ml TE-50 aufgenommen, mit 1 ml einer 7,5 M Kaliumacetat-Lösung versetzt und 30 min bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen des Pellets erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm. Der Überstand wurde mit QBT-Puffer (Qiagen) auf ein Volumen von 10 ml aufgefüllt und auf eine mit 4 ml QBT-Puffer equilibrierte „Qiagen Tip 100“-Säule gegeben. Die Säule wurde im Anschluss zweimal mit jeweils 10 ml QC-Puffer (Qiagen) gewaschen bevor die DNA mit 5 ml auf 70°C erwärmten QF-Puffer (Qiagen) eluiert wurde. Nach erneuter Fällung mit dem 2,5 fachen Volumen Ethanol (100%) wurde die DNA bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 30 min pelletiert, mit Ethanol (70%) gewaschen, erneut abzentrifugiert und nach Trocknung in 100 µl TE aufgenommen.

4.4.7 Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* M15[pREP4] Zellen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* M15[pREP4] von einer LB-Agarplatte in LB-Medium gepickt und über Nacht bei 37°C und 220 rpm geschüttelt. Agar und Medium enthielten Kanamycin (25 µg/ ml), um den Selektionsdruck für den Repressionsvektor pREP4 aufrecht zu erhalten. Anschließend wurden 100 ml LB-Kanamycin-Medium mit 1 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt. Die Kultur wurde dann für 10 min auf Eis abgekühlt und anschließend für 10 min abzentrifugiert (Heraeus Instruments Multifuge 1L-R, 4°C, 4200 rpm). Die Zellen wurden in 20 ml eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert, pelletiert, in frischen 20 ml CaCl₂-Lösung resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die erneut abzentrifugierten Zellen wurden in 4 ml eiskalter CaCl₂-Lösung aufgenommen und bei -80°C in 100 µl Aliquots eingefroren.

4.4.8 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* XL1-Blue Zellen

Zur Herstellung einer Vorkultur wurde eine Einzelkolonie von *E. coli* XL1-Blue von einer LB-Agarplatte in LB-Medium gepickt und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Anschließend wurde 1 l LB-Medium in einem 2 l Erlenmeyer Kolben mit 10 ml der Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,8 angezogen. In der Zwischenzeit wurden die notwendigen Materialien auf 4°C gekühlt. Nach Erreichen der erwähnten Zelldichte wurde die Suspension für 30 min auf Eis gekühlt und die Bakterien bei 4°C und 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde erst mit einem Liter und dann mit einem halben Liter 4°C kaltem H₂O_{dd} und einem halben Liter 4°C kaltem 10%igem Glycerin gewaschen und dazwischen jeweils, wie oben beschrieben, abzentrifugiert. Das resultierende Bakterienpellet wurde abschließend in seinem zwei- bis dreifachen Volumen an Glycerin (4°C) resuspendiert und 80 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

4.4.9 Hitzetransformation chemisch-kompetenter *E. coli* M15[pREP4] Zellen

Die für die Transformation vorgesehenen Zellen wurden für 10 min auf Eis aufgetaut und dann mit 100 ng Vektor in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gemischt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock für 1,5 min bei 42°C im Wasserbad und danach eine Zugabe von 900 µl LB-Medium. Die Zellen wurden anschließend für 90 min bei 37°C und 180 rpm geschüttelt. Die Ausplattierung erfolgte auf Selektionsagarplatten in Konzentrationen von 10% und 90% der eingesetzten Zellen.

4.4.10 Elektroporation von *E. coli* XL1-Blue Zellen

Vor der Elektroporation wurden die dafür vorgesehenen Zellen für 10 min auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 1-2 µl der Plasmidlösung und Überführung der Zellsuspension in eine Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) erfolgte ein Spannungspuls mit 2500 V in einem Elektroporationsgerät der Marke Easyject Prima (EQUIBIO). Direkt im Anschluss wurden 900 µl SOC-Medium zugegeben und die Zellen bei 37°C für 1 h geschüttelt. Üblicherweise wurden 10% und 90% der Zellen auf Selektionsagarplatten ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.4.11 Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Fragmente wurden, abhängig von der zu erwartenden Größe, in 1-4%igen Agarosegelen mit TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Die angelegte Spannung betrug dabei 6 V cm⁻¹ Elektrodenabstand. Die Gele wurden in einer wässrigen Ethidiumbromidlösung (5 µg/ ml) für 15 min gefärbt, anschließend einige Sekunden in H₂O_{dd} entfärbt, und die DNA mit Hilfe eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht.

4.4.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren in Lösungen

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen erfolgte spektrophotometrisch in Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Hierzu wurde die Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Ein Wert von 1 entspricht dabei einer Konzentration von 50 µg/ ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ ml RNA, sowie 37 µg/ ml Einzelstrangoligonukleotiden. Die Konzentration wurde folgendermaßen berechnet:

$c = (A_{260} \times A \times B) / 1000$, mit c : Nukleinsäurekonzentration, A_{260} : Absorption bei 260 nm, A : 50 für dsDNA, 40 für RNA, 37 für einzelsträngige Oligonukleotide, B : Verdünnungsfaktor.

4.4.13 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um Phosphatgruppen am 5'-Ende von DNA-Molekülen zu entfernen, wurde das Enzym alkalische Phosphatase verwendet. Ein typischer Reaktionsansatz bestand aus 0,5-5 µg DNA, 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 U Enzym pro nmol 5'-Enden in einem Gesamtvolumen von 50 µl. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurde die gleiche Menge alkalischer Phosphatase noch einmal zugegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde das Enzym bei 65°C für 10 min inaktiviert und die DNA mit Hilfe des „QIAquick[®] PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen gemäß Herstellerangaben gereinigt.

4.4.14 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde für die Synthese von DNA-Fragmenten für die Erstellung von 16S-rRNA 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* als Positivkontrolle. Das Reaktionsvolumen betrug jeweils 50 µl (5 µl 10 x *Taq* DNA Polymerase Puffer; 1 µl 10 mM dNTPs, je 1 µl jedes Primers (25 µM), 1 µl 100 ng µl⁻¹ DNA-Matrize oder direkt aus einer Kolonie gepickte Bakterienzellen, 1 U *Taq* DNA Polymerase). Die verwendeten Oligonukleotidprimer und ihre jeweiligen „Annealing“-Temperaturen sind in Tabelle 5 aufgelistet (3. Material). Die PCR Zyklen wurden bezüglich der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer und der Größe des erwarteten PCR Produktes eingestellt. Es wurde dabei folgende Abfolge durchgeführt: Startdenaturierung: 2-5 min, 96°C; 1. Denaturierung: 30 s, 96°C; 2. Hybridisierung: 30 s, 45-63°C; 3. Elongation: 30 s bis 4 min, 72°C, finale Elongation: 2-10 min, 72°C. Die Punkte 1 bis 3 wurden jeweils 30fach wiederholt. 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.

4.4.15 Klonierung von PCR-Produkten

Die Klonierung von PCR-Produkten erfolgte mit dem pGEM-T[®] Easy Vektor System (Promega) gemäß Herstellerangaben. Dieses System beinhaltet einen linearisierten Vektor, der an den 5'-Enden ungepaarte Thymidinreste besitzt. PCR-Fragmente, die mit der *Taq* DNA-Polymerase generiert wurden, konnten direkt in diesen Vektor kloniert werden, da dieses Enzym bei der Verdopplung der DNA an das 3'-Ende einen nicht codierten Adeninrest anfügt. Fragmente, die mit der *Pfx*-Polymerase erzeugt wurden, mussten in einem weiteren Schritt mit Adeninresten verknüpft werden. Hierzu wurden 7 µl des gereinigten PCR-Produkts mit 5 U *Taq* Polymerase und 0,04 mM dATP für 30 min bei 70°C inkubiert (Knoche et al., 1999). Die so behandelten Fragmente konnten dann ebenso mit dem Vektor ligiert werden wie mit *Taq* DNA-Polymerase erzeugte Produkte. Dabei wurde gemäß der Angaben des Herstellers verfahren.

4.4.16 Nachweis ausgewählter Klone in Genbanken mittels PCR

Der Nachweis von spezifischen Genen, wie Halogenasen, auf Einzelklonen in den verschiedenen Genbanken erfolgte mittels PCR. Hierzu wurden zuerst Reaktionen

durchgeführt, in denen sämtliche Fosmide eines „Pools“, bestehend aus 384 Einzelklonen, als Matrize dienten. Konnten auf diese Weise positive „Pools“ identifiziert werden, wurden von diesen sogenannte „Subpools“ erstellt. Dazu wurden jeweils 96 Klone von einer über Nacht inkubierten Agarplatte abgeschabt, in 1 ml H₂O_{dd} resuspendiert und für 10 min bei 100°C im Wasserbad aufgekocht. Nach kurzer Abkühlung auf Eis und anschließender Zentrifugation in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm für 2 min diente 1 µl des Überstandes als neue Matrize für eine weitere PCR. Positive „Subpools“ wurden wiederum aufgeteilt bis schließlich Einzelklone als Template dienten und so die jeweiligen Fosmide identifiziert werden konnten.

4.4.17 Enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die analytische Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen wurden 5 µg dieser DNA mit 2 µl 10x Reaktionspuffer und 10 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 20 µl zusammengegeben und entsprechend der optimalen Reaktionstemperatur des eingesetzten Restriktionsenzymes inkubiert. Präparative Ansätze wurden mit entsprechend größeren Mengen und Volumina durchgeführt. Die Überprüfung der vollständigen Spaltung erfolgte durch Elektrophorese in Agarosegelen, aus welchen es eluiert und mit Hilfe des „QIAquick[®] PCR Purification Kit“ gemäß Herstellerangaben (Qiagen) gereinigt wurde.

4.4.18 DNA-Sequenzierung

Die Bestimmung von DNA-Sequenzen erfolgte an einem ABI 377XL Sequenzierer. Ein Reaktionsansatz bestand aus 4 µl Plasmid-DNA oder 1 µl PCR-Produkt, 25 pmol des Sequenzierprimers, 2 µl 5 x Puffer und 2 µl „AmpliTaq[®] FS Big Dye Terminator“ Mix. Die durchgeführte Reaktion begann mit einer initialen Denaturierung bei 94°C für 2 min gefolgt von 30 Zyklen: 30 sec Denaturierung bei 94°C, 15 sec Anlagerung der Primer bei der primerspezifischen Temperatur ($\leq 60^\circ\text{C}$) und 4 min Verlängerung der Primer bei 60°C. Im Anschluss wurde die DNA mit Natriumacetat und Ethanol (100%) gefällt, abzentrifugiert, mit Ethanol (70%) gewaschen, erneut abzentrifugiert und bei RT getrocknet. Das in 25 µl HIDI-Formamid aufgenommene DNA-Pellet konnte dann mit einem ABI 377XL Sequenzierer analysiert werden. Klonierte genomische DNA-Fragmente auf den Metagenomklonen 3K12, 26C24, 29G1, 42I22 wurden von der AGOWA GmbH (Berlin) (<http://www.agowa.de>) sequenziert.

4.4.19 Sequenzannotation

Für die Annotation der Metagenomklone 3K12, 26C24, 29G1 und 42I22 wurde das Computerprogramm Vector NTI 6.0 (Informax) verwendet. Die Identifizierung der „open reading frames“ (ORFs) wurde mit Hilfe des „ORF-finders“ (NCBI) überprüft. 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).

4.4.20 Konstruktion degenerierter Primer

Für die Konstruktion degenerierter Primer zur Amplifikation FADH₂-abhängiger Halogenasen wurden die Aminosäuresequenzen folgender Enzyme aus Biosyntheseclustern von Sekundärmetaboliten verwendet: ComH (gi:15029325) aus *S. lavendulae*, CmlS (gi:20151233) aus *S. venezuelae*, Asm12 (gi:21449358) aus *A. pretiosum subsp. auranticum*, StaK (gi:21911407) und StaI (gi:21911409) aus *S. toyocaensis*, PltA (gi:7522171) und PltM (gi:7522172) aus *P. fluorescens*, AdpC (gi:9715735) aus *A. circinalis* 90, XAC4089 (gi:21244806) aus *X. axonopodis*, BhaA (gi:3688117) aus *A. balhimycina* und AAL06656 (gi:24575085) aus *S. globisporus*. Nach Übermittlung der Sequenzen im FASTA-Format an den „BLOCK MAKER SERVER“ (<http://blocks.fhcrc.org/>) (Henikoff et al., 1995) wurden fünf kurze konservierte Bereiche identifiziert. Diese Bereiche wurden verwendet, um mit dem „CODEHOP“ Programm (<http://blocks.fhcrc.org/codehop.html>) (Rose et al., 1998) teilweise degenerierte Oligonukleotide zu konstruieren. Oligonukleotide gerichtet gegen zwei dieser Bereiche erwiesen sich zur spezifischen Amplifikation von Halogenasegenfragmenten geeignet. Die konservierten Aminosäuresequenzen und die daraus abgeleiteten Oligonukleotide dieser Domänen sind in Tabelle 8 abgebildet.

4. Methoden

Tabelle 8 Konstruktion degenerierter Primer für FADH₂-abhängige Halogenasen. Zwei konservierte Bereiche von elf Halogenasen aus verschiedenen Biosyntheseclustern sind aufgelistet. Die Zahlen vor den Aminosäuresequenzen geben die Position im jeweiligen Protein an. Hervorgehobene Sequenzbereiche aus den abgeleiteten Consensus-Sequenzen stellen die Zielsequenzen der beiden Primer dar.

Halogenase	Forward-Primer	Reverse-Primer
ComH	(217) AFESGWFYIPLSD	(303) LVGDAACFVDPVFSSGV
CmlS	(210) TFEDGWVWMIPIKD	(292) LCGDAACFTDPIFRRSV
XAC4089	(231) CGPGYWFWLIPLSS	(315) LTGEAGVFLDPFYSPGS
Asm12	(212) SHSDGWIWAIPLSA	(291) MVGDAGCFGDPMFSSGV
StaK	(216) TFDGGWFYVPLFG	(302) LVGDAACSVDFLFSGGV
StaI	(238) AFDSGWFYIPLSD	(324) LVGDAACFVDPVFSSGV
AAL06656	(217) TFEHGWFWYIPLSP	(303) LVGDAACFVDPVFSSGV
BhaA	(215) AFDSGWFYIPLSD	(301) LVGDAACFVDPVFSSGV
PltA	(232) PMTNTWVWQIPITE	(313) LIGDAARFVDPIFSSGV
PltM	(232) IFEEGWLWVLPFNN	(318) LLPQATGFIDPLFSRGL
AdpC	(297) CGEGYWVWTIPLST	(379) CVGEAGTFPDPFYSPGT
consensus	CFEG GGWFYIPLSD	LVGDAACFV DPFFSRGV
Primersequenz	5'-G GAC GGC TGG TTC TGG NHN ATH CC-3'	5'-CAC GCC GCG GGA GWA NAN NGG RTC-3'
Primerbezeichnung	HALOford	HALOreVe
Primereigenschaften	24 mer, Deg. 144-fach	24 mer, Deg. 256-fach

N=A+C+G+T, H=A+C+T, W=A+T, R=A+G

4.4.21 Phylogenetische Analyse von 16S-rRNA Gensequenzen

Die phylogenetische Analyse von 16S-rRNA Gensequenzen wurde mit Hilfe des ARB Programmpakets durchgeführt. Die hierbei verwendeten Sequenzen bestanden jeweils aus mehr als 1200bp. Das Alignment der verschiedenen Sequenzen wurde mit dem im Paket enthaltenen Programm ClustalW erstellt. Zur Berechnung der Dendrogramme wurde die Neighbor-Joining Methode verwendet, wobei jeweils 1000 Wiederholungen durchgeführt wurden. Die Visualisierung der Bäume erfolgte mit dem Programm „tree-view“ (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page 1996).

4.4.22 Konstruktion einer Genbank aus *Streptomyces sp. Pol001*

Die nachfolgend unter Punkt 4.4.22 beschriebenen Arbeiten wurden von Dr. Grozdanov (AG Hentschel, Universität Würzburg) durchgeführt.

Isolierung hochmolekularer DNA

Bei der Isolierung hochmolekularer DNA aus *Streptomyces sp. Pol001* wurde nach der Methode von Pospiech und Neumann (1995) vorgegangen. Zur Beimpfung von 400 ml YEME Medium wurden Sporen von *Streptomyces sp. Pol001* von einer dicht bewachsenen MS-Agarplatte abgeschwämmt. Die Inkubation der Kultur erfolgte bei 28°C und 220 rpm für 4 Tage oder bis ausreichend Zellmasse für die DNA Isolation gebildet worden war. Das

Mycel von 30 ml Kultur wurde in 5 ml SET Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (50 mg/ ml in Wasser) für 1 h bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden 140 µl Proteinase K Lösung (20 mg/ ml in Wasser) und 600 µl SDS (10%) hinzugegeben, durch Invertieren gemischt und für 2 h bei 55°C inkubiert. Während dieser Zeit wurde die Lösung wiederholt invertiert. Nach Zugabe von 2 ml NaCl (5 M) wurde der Ansatz auf 37°C abgekühlt, 5 ml Chloroform zugegeben und für 30 min bei 20°C invertiert. Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 4500 x g bei 20°C pelletiert und der Überstand mit 0,6 Volumen Isopropanol vermischt. Nach 3 min wurde die DNA mit Hilfe einer verschlossenen Pasteurpipette aus der Lösung gezogen, in 5 ml EtOH (70%) gewaschen, an der Luft getrocknet und in 2 ml TE bei 55°C gelöst.

Ligation hochmolekularer DNA

Die Analyse und weitere Aufarbeitung der DNA erfolgte auf einem 0,7%igem TAE-Agarosegel. Fragmente von 40kb oder größer wurden mit dem Enzym GELase aus dem „pWEB™ Cosmid Cloning Kit“ (EPICENTRE, Madison, USA) isoliert. Auch die weiteren Schritte, wie die Reparatur der Fragmentenden und die Ligation in den „Shuttlevektor“ pAY1 (Li und Piel, 2002), wurden mit diesem Kit gemäß Herstellerangaben durchgeführt.

Transduktion des Ligationsansatzes

Die Verpackung des Ligationsansatzes in MaxPlax™ Lambda Phagen (EPICENTRE, Madison, USA) erfolgte für 90 min bei 30°C mit anschließender Infektion von *E. coli* Epi100™ Zellen. Dazu wurde *E. coli* Epi100™ vor der Infektion in 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose LB Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 1,8 bei 37°C geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur mit MaxPlax™ Lambda Phagen infiziert. Transduzierte *E. coli* Epi100™ Zellen wurden auf LB Medium + 50 µg ml⁻¹ Apramycin ausplattiert und 12-16 h bei 37°C inkubiert. 324 Apramycin-resistente, und demzufolge Fosmid-tragende Klone wurden identifiziert, einzeln und separat in den Vertiefungen einer 384-well Platte in LB-Medium mit 50 µg/ ml Apramycin und 20% Glycerin archiviert. Die so erstellte Genombank aus *Streptomyces* sp. Pol001 erhielt die Bezeichnung pol001pAY1.

4.5 Proteinanalytische Methoden

4.5.1 *Phylogenetische Analyse von Aminosäuresequenzen*

Aminosäuresequenzen wurden mit dem Computerprogramm ClustalX (<http://www.hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/clustalx.html>) (Thompson et al., 1997) aligniert und mit dem Phylip Programmpaket phylogenetisch analysiert. Hierbei wurden sowohl „Maximum Parsimony“ und „Distance“ Matrizen verwendet (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) (Retief 2000). Die berechneten Cladogramme wurden mit dem Programm „tree-view“ (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) (Page 1996) visualisiert.

4.5.2 *Analyse von Proteinen in denaturierenden SDS-Polyacrylamidgelen*

Zur Auftrennung von Proteinen wurden Mini-Protein-Gele (Peqlab) bestehend aus einem unteren Trenngel (10-15% Polyacrylamid) und einem oberen Sammelgel (6% Polyacrylamid) verwendet. Das Trenngel wurde bis auf eine Höhe von etwa 1 cm unterhalb des Taschenformers zwischen zwei Glasplatten der Gelapparatur gegossen und, zur Ausbildung einer glatten Oberfläche, mit Wasser überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Wasser abgegossen, das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet und ein Taschenformer eingesetzt. Das zu untersuchende Proteingemisch wurde in SDS-Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C für 5 min denaturiert, bevor es auf das Gel aufgetragen wurde. Die Elektrophorese erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 100 V.

4.5.3 *Coomassie-Blau Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen*

Nach Auftrennung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel wurde dieses für 15 min in Coomassie-Blau Färbelösung bei RT geschwenkt. Danach wurde das Gel jeweils für 15 min bei RT in Entfärbelösung vorsichtig geschüttelt, wobei diese solange ausgewechselt wurde, bis keine unspezifische Bindung des Farbstoffes an das Gel mehr beobachtet werden konnte. Anschließend wurde das Gel getrocknet und visuell ausgewertet.

4.5.4 *Heterologe Expression der Halogenase auf Fosmid-Klon Apae02-42I22*

Für die Expression der Halogenase wurde das „QIAexpressionist system“ (Qiagen) verwendet. Das Gen wurde mit den Primern BamHallexfor und HindHallexrev amplifiziert. Diese waren dafür konzipiert, an den voraussichtlichen Start- bzw. Stop-Codons des Halogenasegens anzusetzen. Zusätzlich trugen sie Schnittstellen für die Restriktionsenzyme

BamHI oder HindIII, über welche das resultierende Insert in den Expressionsvektor kloniert werden sollte. Die Amplifikation erfolgte mittels der „Platinum[®] Pfx DNA Polymerase“ (Invitrogen), wobei das Fosmid Apae002-42I22 als Matrize für die Reaktion diente. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pGEM-T[®] Easy (Promega) kloniert, aus diesem über die eingeführten Schnittstellen BamHI und HindIII herausgeschnitten und in den Expressionsvektor pQE30 (Qiagen) ligiert. Dieses, im Folgenden als pQE30-Halo42I22 bezeichnete, Konstrukt wurde anschließend in den für die Expression vorgesehenen Stamm *E. coli* M15[pREP4] mittels Hitzeschock transformiert.

Für die Expression des klonierten Gens wurde eine Vorkultur mit einer Einzelkolonie von *E. coli* M15[pREP4/ pQE30-Halo42I22] in LB-Medium (25 µg/ ml Kanamycin/ 100 µg/ ml Ampicillin) inokuliert und über Nacht bei 37°C und 220 rpm inkubiert. 5 ml dieser Übernachtskultur wurden verwendet um 100 ml Medium anzupflanzen und diese wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 20°C und 220 rpm angezogen. Die Expression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur für 4 h bei 20°C und 220 rpm geschüttelt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (Heraeus Instruments Multifuge 1L-R, 4°C, 4200 rpm), der Überstand verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

4.5.5 Native Aufreinigung der Halogenase 42I22

Die nachfolgend beschriebenen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Zunächst wurde das eingefrorene Zellpellet aus Punkt 4.5.4 auf Eis aufgetaut und in 4 ml Lysispuffer resuspendiert. Es wurden 1 mg/ ml Lysozym zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wurde anschließend mit einem Ultraschallstab sechsmal für 10 sec sonifiziert und dazwischen jeweils 10 sec auf Eis abgekühlt. Die Zelltrümmer wurden dann 30 min bei 13000 rpm und 4°C in eine Tischzentrifuge pelletiert. Zum Überstand wurde 1 ml einer 50%igen Ni-NTA-Agarose-Suspension gegeben und der Ansatz für 1 h bei 4°C vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurde die Lösung in eine leere Chromatographiesäule gegeben und die Agarose nach Abfluss des Überstandes zweimal mit je 4 ml Waschpuffer gespült. Die Proteine wurden viermal mit je 0,5 ml Elutionspuffer von der Säule eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden für eine Analyse mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufbewahrt.

4.5.6 Western-Blot Analyse der Halogenase 42I22

Nach Entfernung des fertigen Polyacrylamidgels aus der Gelkammer wurde dieses für 5 min in Semi-Dry-Blotting-Puffer eingelegt. Eine exakt auf die Größe des Gels zugeschnittene PVDF-Membran wurde für 10 sec in MeOH eingelegt um diese zu aktivieren, in H₂O_{dd} für 5 sec gewaschen und dann ebenfalls in Semi-Dry-Blotting-Puffer gelegt. Gel und Membran wurden übereinander zwischen jeweils drei in oben genanntem Puffer getränkten Whatmanpapieren platziert und so in einer Elektroblot-Apparatur positioniert, dass die Membran auf der Pluspolseite des Gels lag. Die Apparatur wurde verschlossen und für 1 h bei 20 V geblottet. Nach der Übertragung wurde die Membran zweimal für 10 min mit TBS bei RT gewaschen bevor sie für 1 h bei RT in „blocking“ Puffer inkubiert wurde. Es folgten zwei weitere Waschungen für 10 min in TBS-Tween-Triton bei RT und Inkubation über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (Penta-His Antikörper (Qiagen) 1:1000 in „blocking“ Puffer). Danach wurde erneut zweimal für je 10 min bei RT mit TBS-Tween-Triton und einmal mit TBS gewaschen bevor die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:2000 in 10% Magermilchpulver in TBS) für 1 h bei RT erfolgte. Abschließend wurde viermal für je 10 min bei RT mit TBS-Tween-Triton gewaschen. Zum Nachweis des gebundenen Antikörpers wurden je 5 ml der Lösungen A und B des „ECL AdvanceTM Western Blotting Detection Kit“ (Amersham Biosciences) gemischt und über die Membran gegossen. Von der derart behandelten Membran wurden mit Hilfe eines „Chemi Lux-Imagers“ Aufnahmen gemacht.

4.6 Elektronenmikroskopische Methoden

4.6.1 Transmissionselektronenmikroskopie von Dünnschnitten

Von einer Flüssigkultur des Isolates Pol012 wurden 10 ml abzentrifugiert und das Zellpellet über Nacht in einer 2,5% Glutaraldehyd/ PBS-Lösung fixiert. Am nächsten Tag wurde das Pellet dreimal für 20 min mit PBS gewaschen und abschließend über Nacht in 2% Osmium Tetroxid/ PBS inkubiert. Die Zellen wurden dann mittels einer aufsteigenden Ethanolreihe (30%, 50%, 70%, 90% und 100%) entwässert, 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 Mikrotom ultradünn (20-30 nm) geschnitten und die Schnitte zur Kontrastierung für 10 min in 0,5% Uranylacetat/ MeOH und in Reynold's Bleicitrat für 5 min gefärbt. Die Schnitte wurden anschließend mit dem Transmissionselektronenmikroskop (EM10, Zeiss, Deutschland) untersucht.

4.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie von ganzen Zellen

Zu 1 ml einer bakteriellen Übernachtskultur wurden 100 µl Glutaraldehyd (2,5%) gegeben und die Zellen für 5 min fixiert. 8 µl der Suspension wurden auf ein beschichtetes Kupfernetzchen gegeben, 2 min inkubiert und die Flüssigkeit mit Whatmanpapier abgenommen. Die Färbung erfolgte mit einem Tropfen Uranylacetat (0,5% in H₂O_{dd}) für 5 min, anschließender Abnahme mit Whatmanpapier und Lufttrocknung. Daraufhin wurden die Bakterien mit dem Transmissionselektronenmikroskop (EM10, Zeiss, Deutschland) untersucht.

4.6.3 Rasterelektronenmikroskopie von Bakterienkolonien

Einzelkolonien oder dicht bewachsener Agar wurden mit umgebendem Material von einer Agarplatte entfernt und über Nacht in 6,25% Glutaraldehyd fixiert. Anschließend wurden die Proben dreimal für je 10 min in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und jeweils 15 min mit 30-, 50-, 70-, 90- und dreimal mit 100% Aceton entwässert. Nach der kritischen Punkt-Trocknung und Platinbeschichtung des getrockneten Materials wurden die Bakterien mit einem DSM 962 Rasterelektronenmikroskop (Zeiss, Deutschland) betrachtet.

5. Ergebnisse

Sämtliche DNA-Sequenzen, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit gewonnen wurden, wurden der gedruckten Ausgabe in elektronischer Form beigelegt.

5.1 Beschreibung der neuen Bakterienart *Rubritalea marina*

Das bakterielle Isolat „Pol012“, welches aus dem mediterranen Schwamm *Axinella polypoides* (Abbildung 8) isoliert wurde, fiel durch eine niedrige Sequenzhomologie des 16S-rRNA Gens zu den 16S-rRNA Gensequenzen anderer Bakterien auf. Zwar existierte eine relativ große Homologie von 95% mit dem marinen Klon „Artic96BD-2“ (Bano und Hollibaugh, 2002), jedoch betrug die größte Übereinstimmung zu einem kultivierten Bakterium, *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004) lediglich 83%. Phylogenetische Analysen zeigten, dass das Isolat Pol012 dem Phylum *Verrucomicrobia* zugehörig ist. Im Gegensatz zu häufig vorliegenden 16S-rRNA Gensequenzen aus Umweltproben existiert für dieses Phylum nur eine geringe Anzahl an kultivierten Vertretern. Ziel dieser Arbeit war es, das Isolat Pol012 phylogenetisch zu charakterisieren und seine zellulären Eigenschaften und Wachstumseigenschaften zu beschreiben. Für die Beschreibung der neuen Bakterienart wurde der Name *Rubritalea marina* gewählt (Scheuermayer et al., im Druck).



Abbildung 8 Der mediterrane Schwamm *Axinella polypoides*

5.1.1 Phylogenetische Zuordnung

Der phylogenetische Vergleich des 16S-rRNA Gens (ca. 1400 bp) von *R. marina* mit 16S-rRNA Gensequenzen kultivierter und unkultivierter Vertreter des Phylums *Verrucomicrobia* ist in Abbildung 9 dargestellt. *R. marina* fällt in die sogenannte „Subdivision“ 1 (Hugenholtz et al., 1998) der Verrucomicrobien. Isolate aus Süßwasser wie *Verrucomicrobium spinosum* (Schlesner, 1987), nach dem das Phylum benannt worden ist, und verschiedene *Prostheco bacter* Stämme (Hedlund et al., 1997) stellen andere Organismen aus

5. Ergebnisse

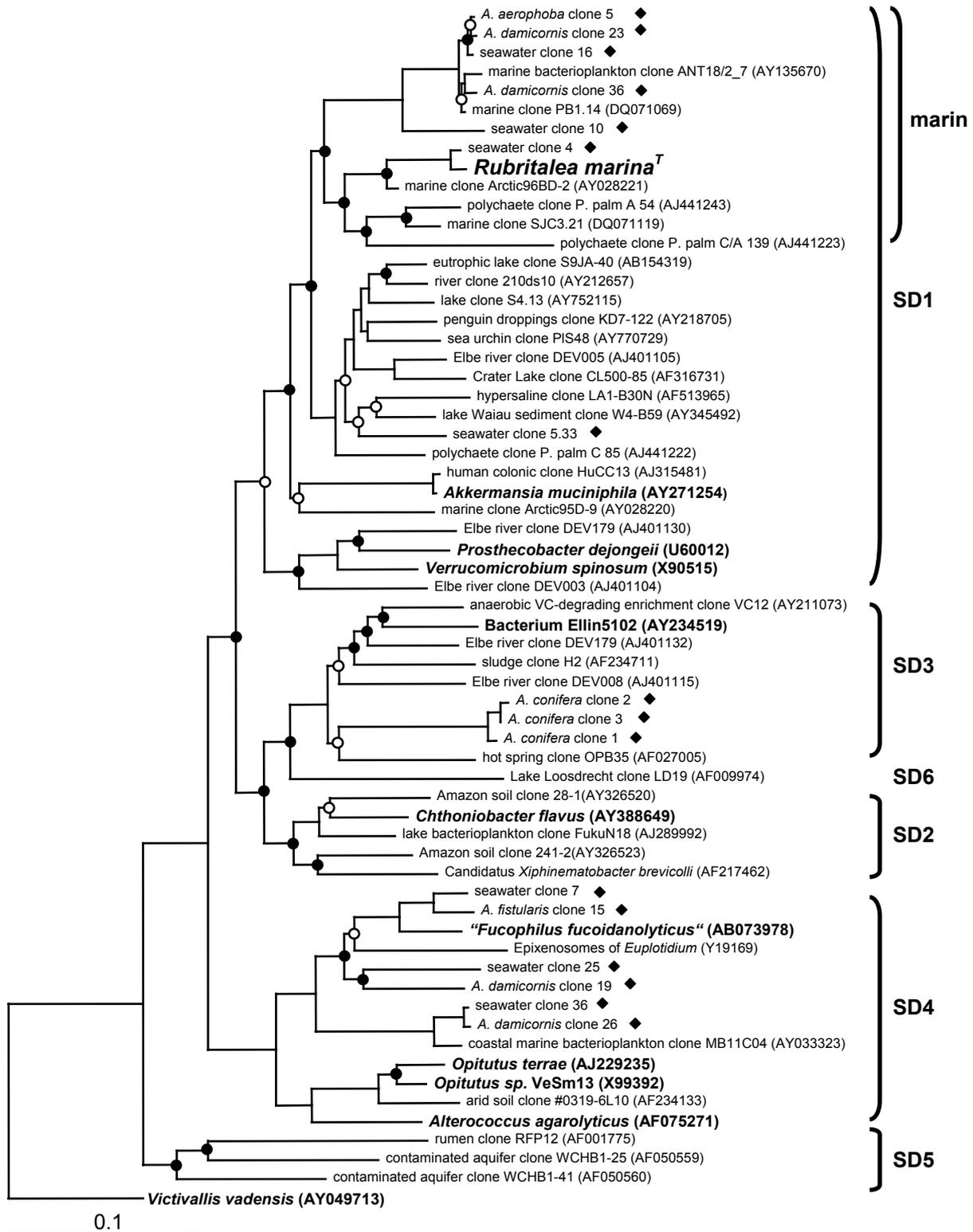


Abbildung 9 „Neighbor-Joining“ Dendrogramm des Phylums *Verrucomicrobia*. Es wurden ausschließlich Sequenzen mit einer Länge von mehr als 1200 bp für die Berechnung berücksichtigt. Die Einteilung der „Subdivisions“ (SD1-SD6) wurde gemäß Hugenholtz et al. (1998) vorgenommen. Geschlossene Kreise an den Verzweigungsstellen repräsentieren „Bootstrapwerte“ von mehr als 75% (von 1000), offene Kreise von mehr als 50%. Kultivierte Bakterien sind durch Fettschrift hervorgehoben. Im Verlauf dieser Arbeit erhaltene 16S-rRNA Gensequenzen aus dem marinen Habitat sind mit Rauten gekennzeichnet. Als „Outgroup“ wurde das 16S-rRNA Gen von *Victivallis vadensis* verwendet. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 10% an.

„Subdivision“ 1 dar. Ein Isolat aus dem menschlichen Darm, *A. muciniphila* (Derrien et al., 2004), wird ebenfalls dieser Gruppe zugeordnet. Neben einer Anzahl weiterer 16S-rRNA Gensequenzen aus Süßwasser und dem menschlichen Darm gibt es in dieser Gruppe mehrere marine verrucomicrobielle Sequenzen, wie z. B. den marinen Polychaetenklon „P. palm A 54“ (Alain et al., 2002), oder den marinen Klon „Arctic 96BD-2“ (Bano und Hollibaugh, 2002). *R. marina* bildet mit mehreren marinen Sequenzen ein eigenes Cluster, welches in Abbildung 9 mit dem Synonym „marin“ gekennzeichnet wurde.

5.1.2 Zelluläre Eigenschaften

Einen ersten Eindruck über Form und Größe von *R. marina* lieferte die Elektronenmikroskopie.

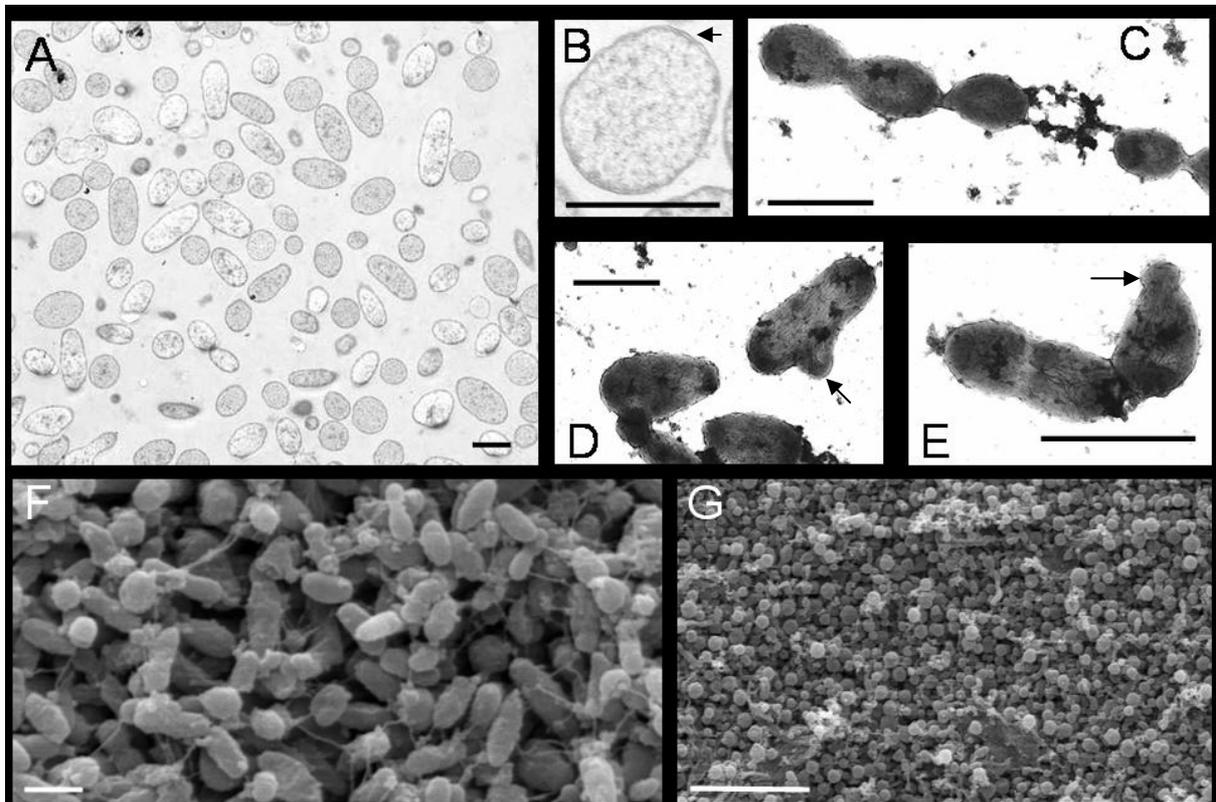


Abbildung 10 Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Zellen von *R. marina*. (A+B) Transmissionselektronenmikroskopie von Dünnschnitten (C+D+E) Transmissionselektronenmikroskopie von negativkontrastierten Zellen (F+G) Rasterelektronenmikroskopie Kolonien auf Agar; Größenmaßstäbe: 1µm (A-E,G) und 10µm (F)

Zellen von *R. marina* besitzen weder Flagellen noch Cilien. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden keine beweglichen Zellen beobachtet. *R. marina* reagierte bei Gram-Färbung negativ. Darüber hinaus konnte durch die

Transmissionselektronenmikroskopie (Abbildung 10, B, Pfeil) gezeigt werden, dass *R. marina* von zwei getrennten Membranen umgeben ist. Der Test auf die Produktion von Katalase verlief negativ, während die Zellen positiv im Oxidasetest reagierten. Die Vermehrung von *R. marina* erfolgt wahrscheinlich durch Knospung (D und E, Pfeile). Die Zellform von *R. marina* ist nicht einheitlich (A, F), insofern als sowohl nahezu kokkoide Zellen mit Durchmessern von 0,5 bis 1,1 µm, als auch stäbchenförmige Zellen, mit Breiten zwischen 0,4 und 1,0µm und Längen zwischen 0,6 und 1,8 µm beobachtet werden konnten. Zur Bestimmung der Zellgrößen wurden 35 elektronenmikroskopische negativkontrastierte Aufnahmen sowie das Computerprogramm „UTHSCSA Image Tool for Windows Version 3.00“ (University of Texas) verwendet.

Tabelle 9 Zelluläre Fettsäuren von *R. marina*. Fettsäuren mit weniger als 1% am Gesamtanteil sind nicht angegeben.

Symbol	Fettsäure	Anteil (%)	Kettenform
16:0	Hexadecansäure	22,9	unverzweigt
14:0 iso	12-Methyltridecansäure	21,8	verzweigt
16:1 w7c und/ oder	cis-9-Hexadecensäure und/ oder 2-	21,5	ungesättigt/
15:0 iso 2OH	Hydroxy-13-Methyltetradecansäure		verzweigt
14:0	Tetradecansäure	9,1	unverzweigt
15:0 anteiso	12-Methyltetradecansäure	6,1	verzweigt
15:0	Pentadecansäure	4,4	unverzweigt
14:0 iso 3OH	3-Hydroxy-12-Methyltridecansäure	2,8	verzweigt
17:0	Heptadecansäure	2,4	unverzweigt
16:0 iso	14-Methylpentadecansäure	2,4	verzweigt
18:1 w7c	Delta-9 Octadecensäure	1,0	ungesättigt
18:0	Octadecansäure	1,0	unverzweigt

Die Analyse der Peptidoglycanstruktur des Stammes *R. marina* wurde durch Dr. Schumann (DSMZ, Braunschweig) nach Schleifer (1985) durchgeführt. Dabei ergaben sich Probleme, wie sie in der Regel bei Isolation von Peptidoglycan aus Gram-negativen Bakterien auftreten. Daher wurden die Aminosäuren im Totalhydrolysat (4N HCl, 100°C, 16 h) nach MacKenzie (1987) derivatisiert und mit GC/ MS analysiert. Als Hauptkomponenten konnten die Aminosäuren Alanin, Glutaminsäure und *meso*-Diaminopimelinsäure (*meso*-Dpm) identifiziert werden. Im Partialhydrolysat (4N HCl, 100°C, 45 min) wurden die Peptide

L-Ala-D-Glu und Dpm-D-Ala durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie nachgewiesen. Daraus ließ sich ableiten, dass *R. marina* den Peptidoglycantyp A1 γ meso-Dpm-direkt enthält. Für den GC-Gehalt wurde ein Wert von 50,9 mol % bestimmt. Die Analyse der Chinone wurde von Dr. B. J. Tindall (DSMZ, Braunschweig) durchgeführt. Die Menachinone MK8 (23%) und MK9 (77%) konnten dabei nachgewiesen werden. Die Analyse der zellulären Fettsäuren wurde von Dr. Susanne Verborg (DSMZ, Braunschweig) bestimmt. Die Ergebnisse hieraus sind in Tabelle 9 aufgelistet.

R. marina zeigte eine auffallend rote Färbung sowohl auf Platte (Abbildung 11, A) als auch in Flüssigkultur (Abbildung 11, B). Das dafür verantwortliche Pigment konnte leicht sowohl mit Methanol als auch mit Ethanol extrahiert werden. Das Pigment diffundierte nicht in den Agar und nicht in das Flüssigkulturmedium. Der Proteinase K-Verdau eines Zellpellets aus 2 ml Flüssigkultur führte nicht zu einem Verlust der rötlichen Färbung, woraus geschlossen wurde, dass die Färbung vermutlich nicht von einem Protein hervorgerufen wird.

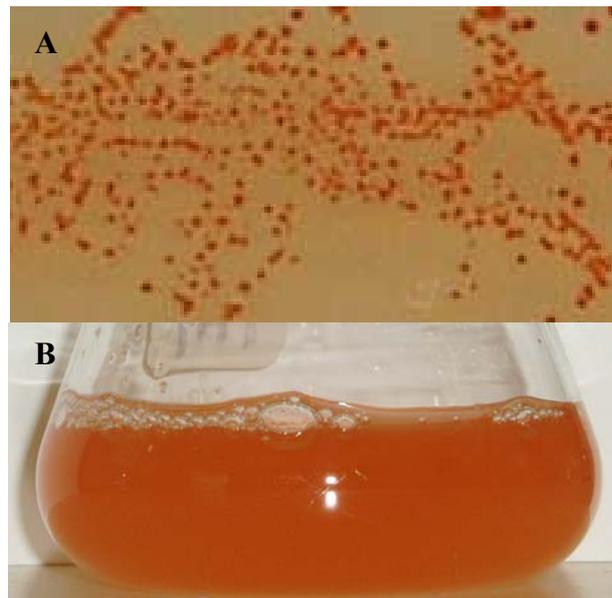


Abbildung 11 Anzucht von *R. marina* auf Agar (A) und in Flüssigkultur (B)

Die Absorption eines zellfreien Ethanolextraktes ergab ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 495 nm (Abbildung 12). Im Agardiffusionstest zeigte das Pigment keine antimikrobielle Wirkung gegenüber *E. coli* DH5 α , *S. aureus* WT oder *C. albicans*. Auch eine lichtabhängige Veränderung des Wachstumsverhaltens oder der Färbung von *R. marina* wurde nicht beobachtet. Die Struktur des Pigments wird gegenwärtig von T. Gulder (AK

Bringmann, Organische Chemie, Universität Würzburg) aufgeklärt, um daraus Aussagen über seine Funktion ableiten zu können. Erste Daten lassen vermuten, dass es sich um eine Substanz aus der strukturellen Gruppe der Prodigiosine (Abbildung 13) handelt.

Absorptionsspektrum eines EtOH-Extrakts von *R. marina*

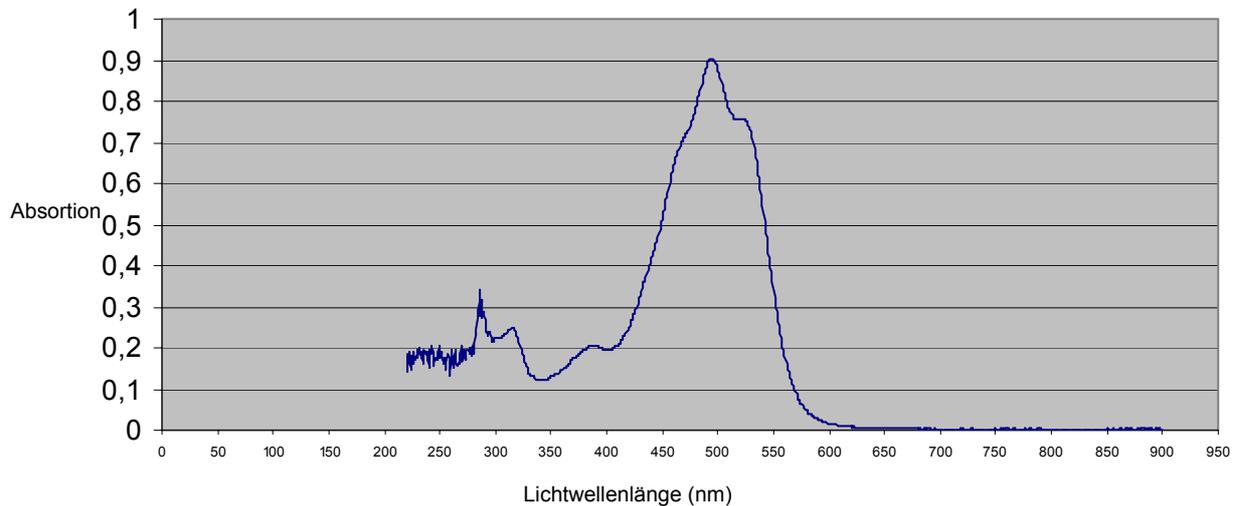


Abbildung 12 Absorptionsspektrum eines zellfreien ethanolischen Extrakts von *R. marina* bei Wellenlängen zwischen 220 und 900 nm.

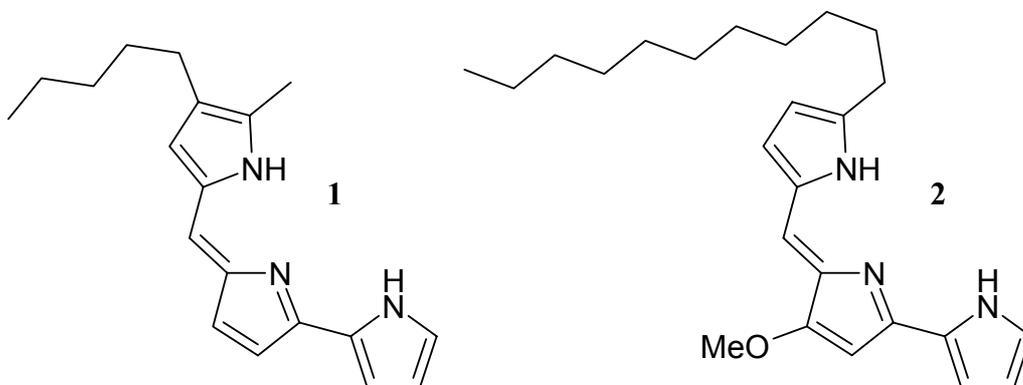


Abbildung 13 Strukturformeln von Prodigiosinen. 1: Prodigiosin; 2: Undecylprodigiosin (Fürstner, 2003)

5.1.3 Wachstumseigenschaften

Ein Wachstum von *R. marina* konnte zwischen 8°C und 30°C beobachtet werden während unter 4°C und bei mehr als 35° kein Wachstum möglich war. Das Temperaturoptimum lag zwischen 25°C und 30°C. Wachstum war bei pH-Werten zwischen 6,8 und 8,2 möglich, nicht jedoch unter einem pH von 6,0. Die Messung im Bereich oberhalb von 8,2 war nicht möglich, da im verwendeten Medium eine Präzipitation unbekannter Salze erfolgte.

5. Ergebnisse

Zur Bestimmung von Substanzen, die *R. marina* als alleinige Kohlenstoffquelle dienen konnten, wurde Ver100-Medium ohne Pepton, Hefeextrakt und Glukose verwendet, welches dann mit der zu testenden Energiequelle versetzt wurde. Hierbei konnte Wachstum in Schüttelkulturen mit Glukose, Melibiose, Lactose, Xylose, Brenztraubensäure oder Pektin beobachtet werden. Ein Wachstum konnte nicht mit Maltose, Mannose, Galaktose, Saccharose, Arabinose, Ribose, Alanin, Leucin, Lysin, Prolin, Mannitol, Zitronensäure, Maleinsäure, Tartrat, Chitin, Xylan oder Stärke beobachtet werden. Die Polymere Chitin, Xylan, Stärke und Pektin wurden in einer Konzentration von 0,1% (w/v) eingesetzt. Alle anderen Substanzen wurden in Konzentration von 10 mM verwendet. Ein Wachstum wurde durch Messung der OD bei einer Lichtwellenlänge von 600 nm identifiziert. Nur Substanzen, die zu einer Zunahme der optischen Dichte nach sechs Tagen führten, wurden als verwertbare Kohlenstoffquellen angesehen. Die Monosaccharide Galaktose, Maltose, Fruktose und Fucose und die Aminosäure Glutamat führten nicht zu einer Zunahme der OD, es konnte allerdings auch keine Abnahme, wie dies bei einer Negativkontrolle ohne jegliche Energiequelle der Fall war, beobachtet werden.

Weiterhin wurde das Wachstum von *R. marina* in Flüssigkultur in Anwesenheit verschiedener Antibiotika getestet. Eine Zusammenstellung der Ergebnisse ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10 Wachstum von *R. marina* in Anwesenheit verschiedener Antibiotika. (+) Wachstum (-) kein Wachstum

Antibiotikum	10 µg/ µl	50 µg/ µl	100 µg/ µl
Ampicillin	-	-	-
Streptomycin	+	+	+
Gentamycin	+	+	+
Kanamycin	+	+	+
Chloramphenicol	-	-	-
Vancomycin	+	+	+
Neomycin	+	+	+
Lincomycin	-	-	-
Tetrazyclin	+	+	+
Erythromycin	-	-	-
Oxazillin	-	-	-

Das Wachstum von *R. marina* war strikt von artifiziellm Meerwasser (ASW) im Medium abhängig. Konzentrationen von 60 bis 160% der Salzkonzentrationen von ASW konnten dabei im Kulturmedium toleriert werden, wohingegen kein Wachstum unter 40% oder über 180% ASW beobachtet wurde. Die ausschließliche Verwendung von NaCl anstelle von ASW war nicht möglich.

5.1.4 Testung auf Antimikrobielle Aktivität

Es konnte keine Wachstumshemmung gegen *S. aureus* WT, *E. coli* DH5 und *C. albicans* nach Überschichtung von *R. marina* Kolonien auf Ver100-Agar mit den Teststämmen beobachtet werden. Hemmhöfe um Ethylacetatextrakte aus *R. marina* Flüssigkulturen wurden ebenfalls nicht beobachtet.

5.1.5 Nachweis von Verrucomicrobien in anderen Schwämmen

Um die Verbreitung von *R. marina* und anderen Verrucomicrobien in verschiedenen Schwämmen und Meerwasser zu überprüfen, wurden PCR Analysen durchgeführt. Zum einen wurden für die Analyse die Primer Pol012for und Pol012rev verwendet, die für das 16S-rRNA Gen von *R. marina* spezifisch waren. Zum anderen wurden die Schwämme und das Meerwasser mit dem Verrucomicrobia-spezifischen Primer Ver53F (Stevenson et al., 2004) und dem allgemeinen eubakteriellen Primer 1492r auf die Anwesenheit anderer *Verrucomicrobia* untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11 16S-rRNA Gensequenzen von *R. marina* und anderen Verrucomicrobien.
(-) keine Amplifikation möglich; (+) Amplifikation möglich

Untersuchungs- objekt	<i>R. marina</i> 16S-rRNA Gen	<i>Verrucomicrobia</i> 16S-rRNA Gene
<i>Axinella polypoides</i>	-	-
<i>Axinella damicornis</i>	-	+
<i>Agelas conifera</i>	-	+
<i>Agelas cerebrum</i>	-	-
<i>Aplysina fistularis</i>	-	+
<i>Aplysina aerophoba</i>	-	+
<i>Aplysina cavernicola</i>	-	-
<i>Ptilocaulis sp.</i>	-	-
<i>Verongula gigantea</i>	-	-
<i>Chondrilla nucula</i>	-	-
Meerwasser	-	+

Die Produkte wurden in den Vektor pGem-Teasy kloniert und jeweils 50 Klone pro Schwamm und Meerwasser mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) analysiert. Die Sequenzierung von Klonen mit individuellen Bandenmustern ergab nach Beseitigung von Chimären sieben unterschiedliche verrucomicrobielle Sequenzen aus Meerwasser, vier aus *Axinella damicornis*, drei aus *Agelas conifera* und jeweils eine Sequenz aus *Aplysina aerophoba* und *A. fistularis*. Die phylogenetischen Positionen dieser Sequenzen sind in Abbildung 9 dargestellt und mit Rauten hervorgehoben. Der Nachweis des *R. marina* 16S-rRNA Gens war in keinem der Schwämme oder dem Meerwasser möglich.

5.1.6 Taxonomische Beschreibung von *Rubritalea marina* sp. nov.

R. marina-Zellen sind gram-negativ, unbeweglich, kokkoid- oder stäbchenförmig und besitzen ein rotes Pigment. Wachstum ist mit Glukose, Xylose, Melibiose, Cellobiose, Lactose, Brenztraubensäure und Pektin als alleiniger Kohlenstoffquelle unter aeroben Bedingungen möglich. *R. marina* kann nicht anaerob wachsen. Der G+C-Gehalt der DNA beträgt 50,9 mol %. Die hauptsächlich vorhandenen Fettsäuren sind: Hexadecansäure, 12-Methyl-Tridecansäure, Cis-9-Hexadecansäure und/ oder 2-Hydroxy-13-Methyl-Tetradecansäure, 12-Methyl-Tetradecansäure und Pentadecansäure. *R. marina*-Zellen enthalten die Isoprenoidchinone MK8 und MK9. Die Struktur des Peptidoglycans der Zellwand ist vom A1 γ meso-Dpm Typ mit direkten Quervernetzungen. *R. marina* reagiert positiv im Test auf Oxidase und negativ auf Katalase. Wachstum in Flüssigkultur ist möglich bei Salzkonzentration zwischen 60 und 160% derer von artifiziellem Meerwasser, bei pH-Werten zwischen 6,8 und 8,2 und bei Temperaturen zwischen 8 und 30°C. *R. marina* wurde ursprünglich aus dem mikrobiellen Konsortium des mediterranen Schwammes *Axinella polyoides* isoliert. Der Name *R. marina* wurde von der Färbung des Bakteriums (ruber = rot), seiner Form (talea = ein Stock) und seiner Herkunft (marina = dem Meer zugehörig) abgeleitet.

5.2 Isolierung und Screening von Streptomycceten aus marinen Schwämmen

Während der vorliegenden Arbeit konnten insgesamt acht Streptomycceten aus marinen Schwämmen isoliert werden. Drei weitere Isolate (A188, A233 und SB182) lagen in bakteriellen Stammsammlungen der AG Hentschel vor. Zusätzlich wurden acht Streptomycceten aus Gartenerde (G001-G008) isoliert. Eine Auflistung dieser Bakterien ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12 Herkunft der Streptomycceten

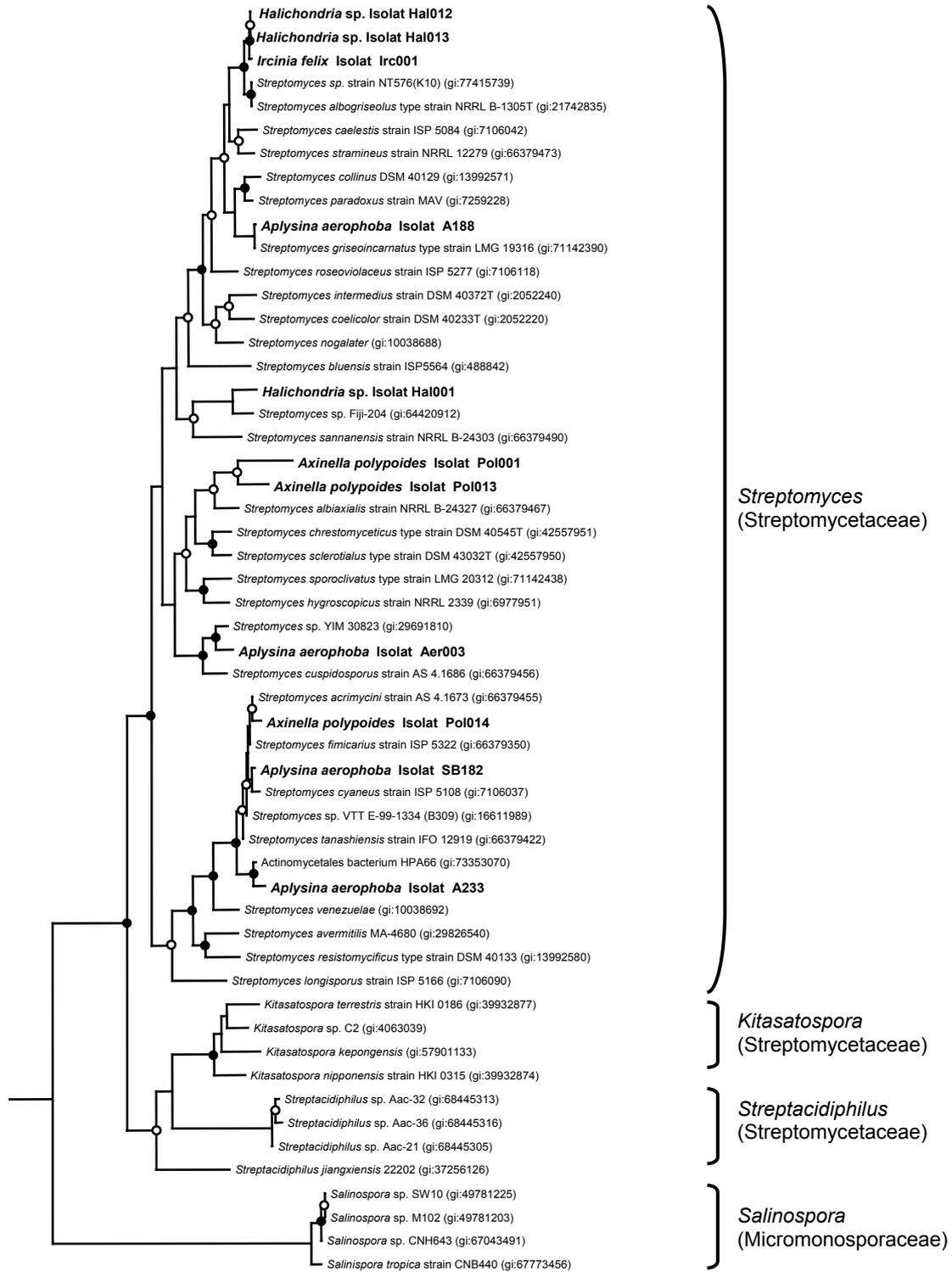
Isolat	Ausgangsmaterial	Organismus mit höchster 16S-rRNA Gensequenzhomologie	16S-rDNA-Homologie (%)
Pol001	<i>Axinella polypoides</i>	<i>Streptomyces sclerotialis</i> (GI:42557950)	97,6
Pol013	<i>Axinella polypoides</i>	<i>Streptomyces albiacialis</i> (GI:66379467)	98,8
Pol014	<i>Axinella polypoides</i>	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1334 (GI:16611989)	99,7
Hal001	<i>Halichondria</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. Fiji-204 (GI:64420912)	98,9
Hal012	<i>Halichondria</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. strain NT576(K10) (GI:77415739)	99,7
Hal013	<i>Halichondria</i> sp.	<i>Streptomyces</i> sp. strain NT576(K10) (GI:77415739)	99,6
Irc001	<i>Ircinia felix</i>	<i>Streptomyces</i> sp. strain NT576(K10) (GI:77415739)	99,7
Aer003	<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Streptomyces</i> sp. YIM 30823 (GI:29691810)	99,4
A188	<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Streptomyces griseoincarnatus</i> (GI:71142390)	100
A233	<i>Aplysina aerophoba</i>	Actinomycetales bacterium HPA66 (GI:73353070)	99,6
SB182	<i>Aplysina aerophoba</i>	<i>Streptomyces</i> sp. VTT E-99-1334 (GI:16611989)	99,9
G001	Gartenerde	<i>Streptomyces</i> sp. N0016 (GI:54306553)	100
G002	Gartenerde	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> (GI:66379318)	100
G003	Gartenerde	<i>Streptomyces galilaeus</i> (GI:10038680)	99,9
G004	Gartenerde	Actinomycetales bacterium N12 (GI:61678252)	100
G005	Gartenerde	<i>Streptomyces</i> sp. B8 (GI:33337855)	99,9
G006	Gartenerde	<i>Streptomyces aurantiogriseus</i> (GI:66379359)	99,9
G007	Gartenerde	<i>Streptomyces</i> sp. B8 (GI:33337855)	99,9
G008	Gartenerde	<i>Streptomyces</i> sp. N0016 (GI:54306553)	99,8

5.2.1 Phylogenetische Zuordnung

Mit Hilfe der Computersoftware ARB wurde die phylogenetische Position der isolierten Streptomyceten innerhalb der Familie *Streptomycetaceae* bestimmt. Dafür wurde ein Vergleich der 16S-rRNA Gene der elf Isolate und weiterer *Streptomyces*, *Kitasatospora*, *Streptacidiphilus* und *Salinospora* Arten durchgeführt. *Streptomyces*, *Kitasatospora* und *Streptacidiphilus* stellen die drei Gattungen der Familie *Streptomycetaceae* dar (Waksman und Henrici, 1943; Zhang et al., 1997; Kim et al., 2003), wohingegen *Salinospora* eine erst kürzlich in marinem Sediment entdeckte Gattung aus der Familie der *Micromonosporaceae* (Mincer et al., 2002) repräsentiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abbildung 14 dargestellt. Alle Isolate dieser Studie sind der Gattung *Streptomyces* zugehörig.

5.2.2 Wachstumseigenschaften und Zellmorphologie

Da die Produktion antimikrobiell aktiver Substanzen durch Streptomyceten vermutlich von dem verwendeten Wachstumsmedium abhängig ist, wurden die einzelnen Isolate auf verschiedenen Nährböden angezogen. Abbildung 15 stellt die unterschiedlichen Kolonietypen und Wuchsformen in Abhängigkeit vom verwendeten Agarmedium dar. Es wurden zwei Meerwassermedien (M1 und M2), zwei Minimalmedien (MM und SMMS) und ein Vollmedium (MS) verwendet.



0.01

Abbildung 14 „Neighbor-Joining“ Analyse von Streptomyccetenisolaten. Nur Sequenzen mit mehr als 1200bp wurden verwendet. Geschlossene Kreise an den Verzweigungsstellen repräsentieren Bootstrapwerte von mehr als 75% (von 1000 verschiedenen Bäumen), offene Kreise Bootstrapwerte von mehr als 50%. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Isolate sind durch einen größeren Schriftfont hervorgehoben. Der Maßstab gibt einen Sequenzunterschied von 1% an.

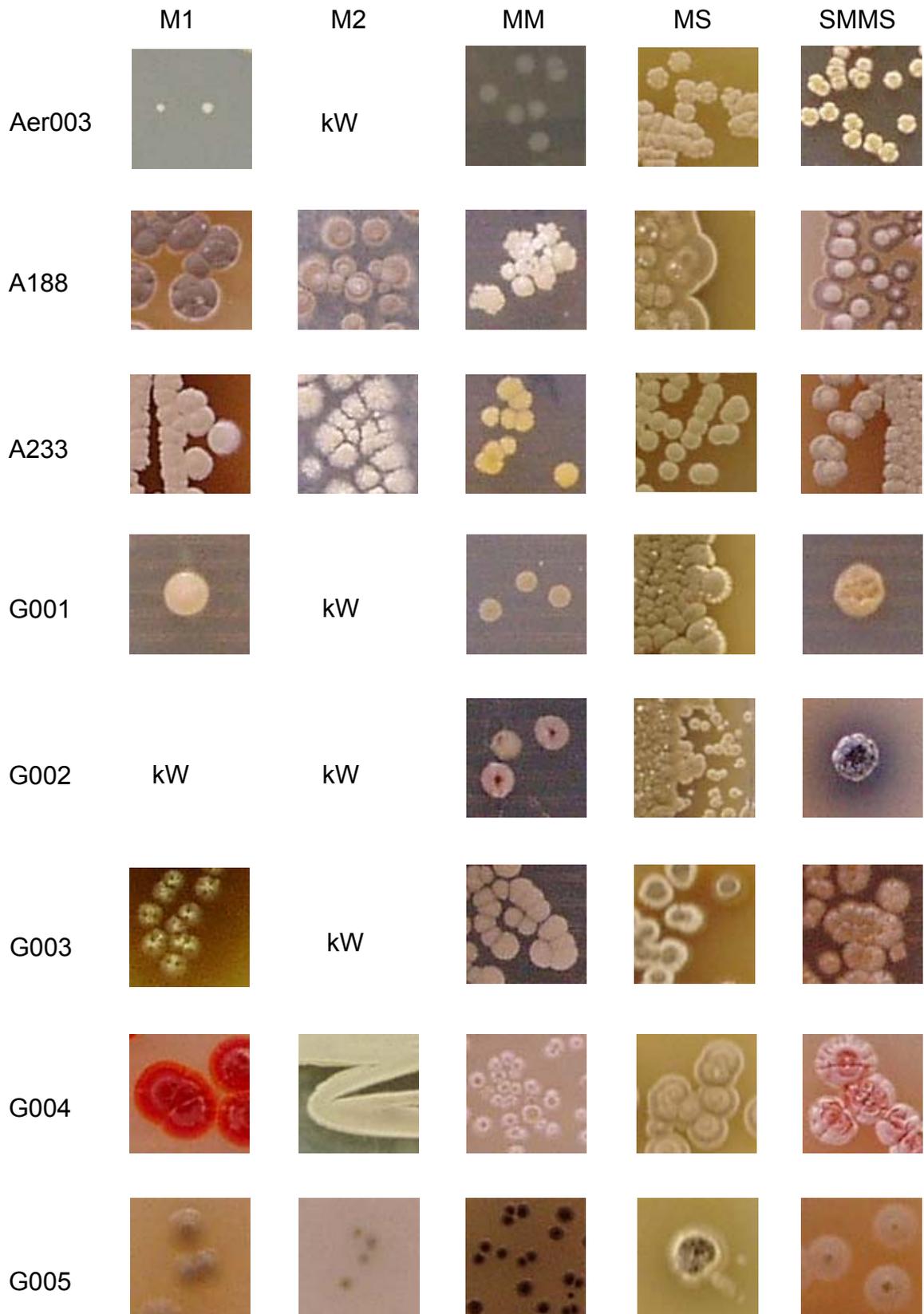


Abbildung 15 Wuchsformen von Streptomycceten auf verschiedenen Agarmedien. Linke Spalte: Bezeichnung der Stämme; obere Zeile: verwendete Agarmedien; kW: kein Wachstum

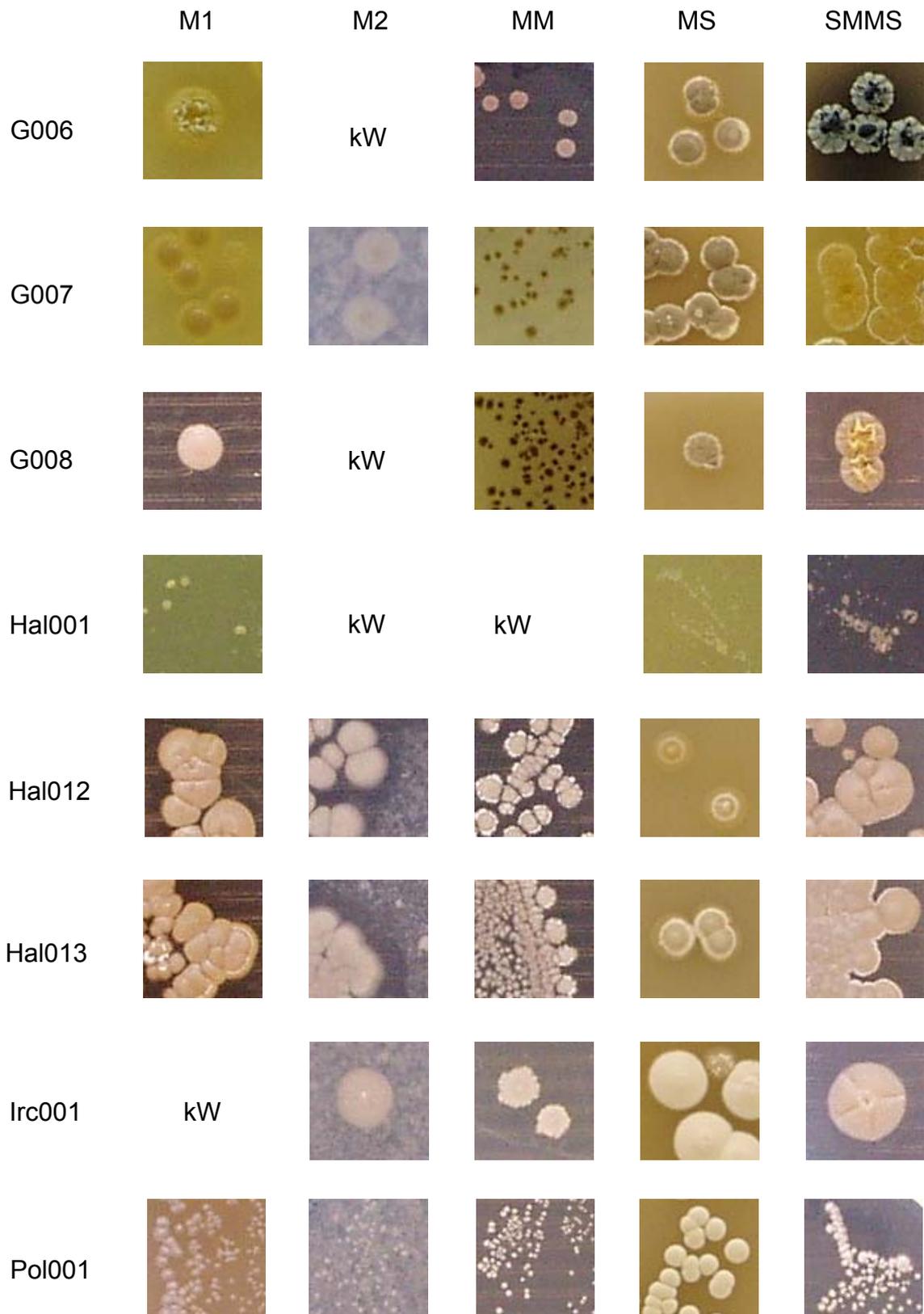


Abbildung 15 Fortsetzung

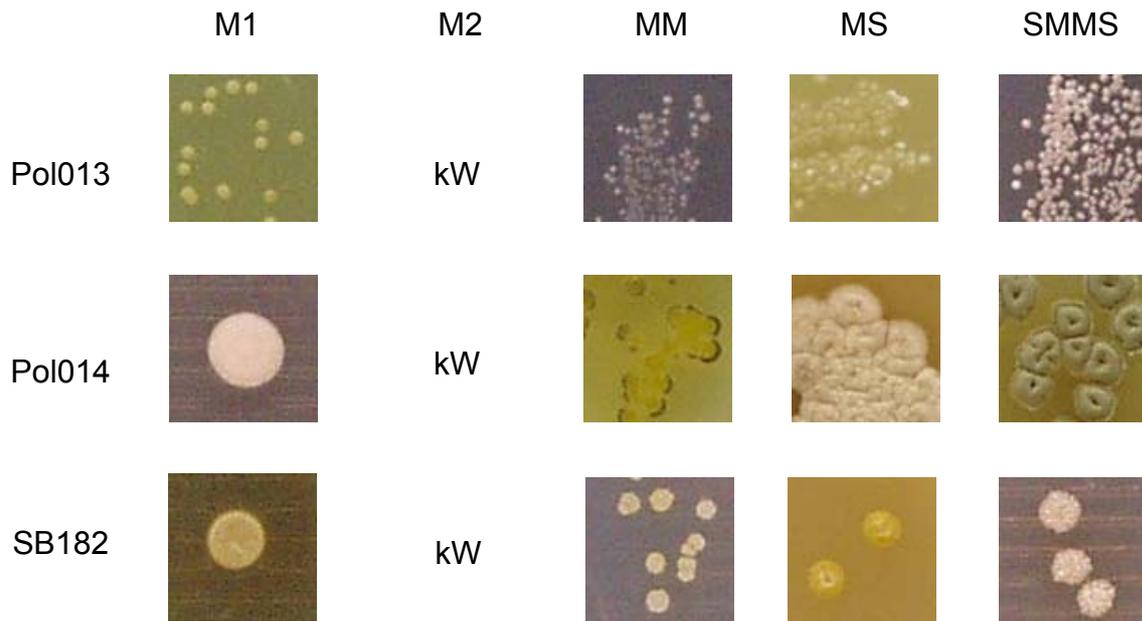


Abbildung 15 Fortsetzung

Um einen Einblick in die Zellmorphologie einzelner Streptomyccetenisolate zu erhalten, wurden einige kultivierte Stämme mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht. Alle untersuchten Isolate zeigten das für Streptomycceten typische filamentöse Wachstum. Dieses konnte auch bei Stamm Aer003 (Abbildung 16, A) erahnt werden, wobei hier offenbar eine einheitlichere Zellschicht gebildet wurde als bei den anderen Isolaten. Obwohl sämtliche Isolate bis zur makroskopisch sichtbaren Sporenbildung inkubiert wurden, war eine mikroskopische Beobachtung dieser Sporen lediglich bei Isolat Pol014 (Abbildung 16, G), möglich.

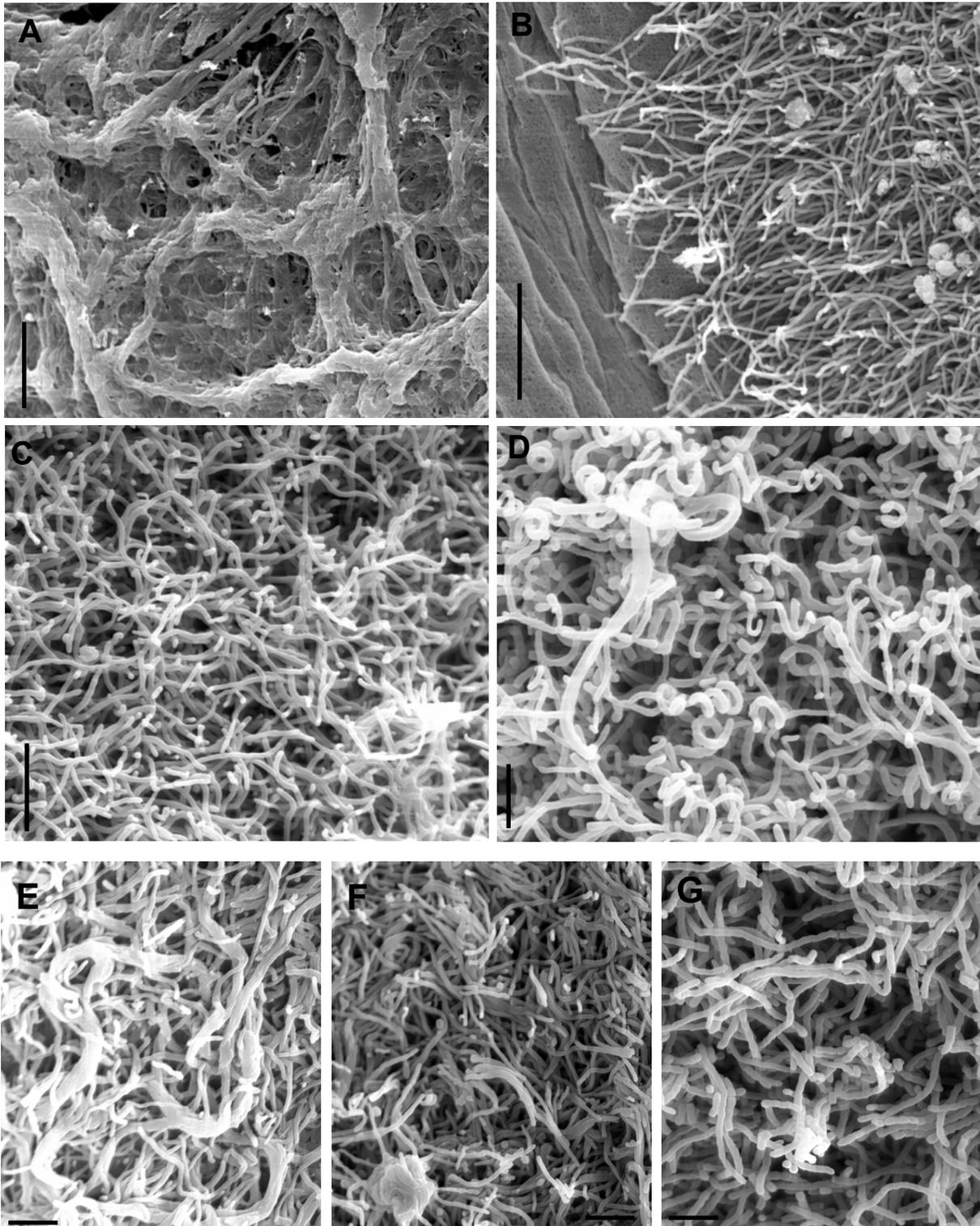


Abbildung 16 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Streptomycceten nach Wachstum auf MS-Agar. (A) Stamm Aer003 (Größenmaßstab 20 μm) (B) Stamm Hal001 (Größenmaßstab 10 μm) (C) Stamm Hal013 (Größenmaßstab 10 μm) (D) Stamm Irc001 (Größenmaßstab 5 μm) (E) Stamm Pol001 (Größenmaßstab 5 μm) (F) Stamm Pol013 (Größenmaßstab 5 μm) (G) Stamm Pol014 (Größenmaßstab 5 μm)

5.2.3 Antimikrobielle Aktivitäten und Wirkstoffe

Die Identifikation antimikrobieller Aktivitäten von Streptomyceten erfolgte unter Verwendung der gleichen Nährböden wie unter Punkt 5.2.2 besprochenen. Hierzu wurden mit Streptomyceten bewachsene Agarplatten mit LB- (*S. aureus* und *E. coli*) oder TY-Agar (*C. albicans*) sowie den jeweiligen Teststämmen, *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* überschichtet. Nach Inkubation bei 37°C bzw. 30°C über Nacht wurden die Platten auf die Bildung von Hemmhöfen untersucht (Abbildung 17, A und B). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

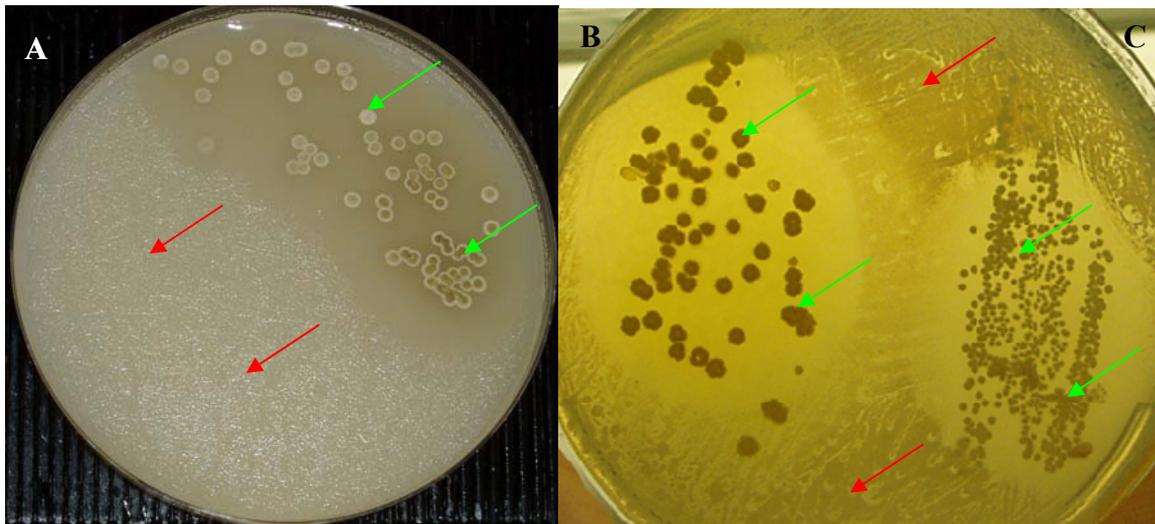


Abbildung 17 Bildung von Hemmhöfen durch drei ausgewählte Streptomyceten. (A) Pol001 auf MS-Agar (B) Aer003 und (C) Pol013 auf SMMS-Agar. Kolonien der Streptomyceten sind durch grüne Pfeile gekennzeichnet. Als Testorganismus wurde jeweils *S. aureus* WT (rote Pfeile) verwendet.

Insgesamt konnten elf Stämme identifiziert werden, die unter den gewählten Kulturbedingungen gegen die verwendeten Testorganismen wachstumshemmende Wirkungen zeigten. Zehn der Isolate konnten das Wachstum des gram-positiven Organismus *S. aureus* hemmen, wohingegen nur zwei eine antimikrobielle Aktivität gegen das gram-negative Bakterium *E. coli* zeigten. Eine hemmende Wirkung gegen den eukaryontischen Pilz *C. albicans* wurde nicht beobachtet.

Tabelle 13 Antimikrobielle Aktivitäten von Streptomyceten gegen verschiedene Testorganismen.

Isolat	<i>S. aureus</i>					<i>E. coli</i>					<i>C. albicans</i>				
	M1	M2	MS	MM	SM MS	M1	M2	MS	MM	SM MS	M1	M2	MS	MM	SM MS
G001	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G002	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G003	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G004	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
G005	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G006	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G007	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G008	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol001	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol013	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol014	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hal001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hal012	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hal013	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aer003	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A188	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A233	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SB182	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Irc001	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Bisher wurden die Stämme Aer003 und Pol001 chemisch im Hinblick auf die identifizierten antimikrobiellen Wirkprinzipien untersucht.

Stamm Aer003

Für die Untersuchung von Isolat Aer003 wurden 30 bewachsene M1-Agarplatten mit Ethylacetat extrahiert. Nach Auftrennung dieses Extrakts mittels HPLC konnten für zwei verschiedene Fraktionen antimikrobielle Aktivitäten gegen *S. aureus* WT identifiziert werden. Weitere MS-Analysen ergaben, dass es sich um verschiedene gesättigte und ungesättigte Fettsäuren handelte (Tobias Gulder, AK Bringmann, Organische Chemie Universität Würzburg, persönliche Mitteilung). Zwei der gesättigten Fettsäuren konnten strukturell als Docosansäure und Palmitinsäure aufgeklärt werden. Diese sind in Abbildung 18 dargestellt.

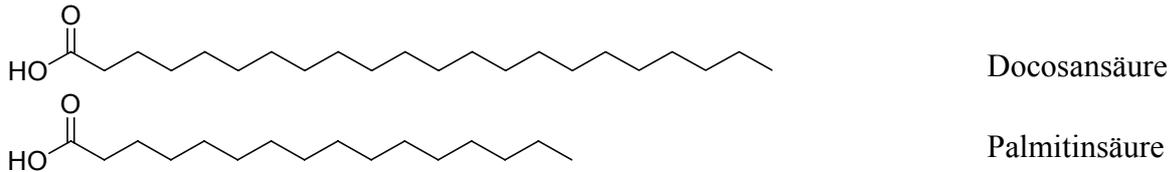


Abbildung 18 Strukturformeln der Fettsäuren aus Stamm Aer003 mit antimikrobieller Aktivität gegen *S. aureus* WT.

Stamm Pol001

Aus dem Ethylacetatextrakt von 200, mit Isolat Pol001 bewachsenen, MS-Agarplatten konnten mittels HPLC vier Substanzen aufgereinigt werden (T. Gulder, persönliche Mitteilung). Diese zeigten, im Vergleich mit einer Lösungsmittelkontrolle (Abbildung 19, K), eine unterschiedlich starke wachstumshemmende Wirkung gegenüber *S. aureus* WT (Abbildung 19, 1-4).



Abbildung 19 Agardiffusionstest verschiedener HPLC-Fractionen eines Ethylacetatextrakts des *Streptomyces* Stammes Pol001 gegen *S. aureus* WT. (K) Lösungsmittelkontrolle, (1-4) Fraktionen 1-4 (jeweils 50µg)

Bei diesen Substanzen kann ausgeschlossen werden, dass es sich um Fettsäuren handelt. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden die Strukturen dieser Substanzen von T. Gulder und Prof. G. Bringmann aufgeklärt.

5.3 Nachweis eines Glycopeptidbiosyntheseclusters in *Streptomyces* sp. Pol001

5.3.1 Nachweis einer FADH₂-abhängigen Halogenase

Gene FADH₂-abhängiger Halogenasen wurden in Reinisolaten der Gattung *Streptomyces*, welche zuvor aus verschiedenen Schwämmen kultiviert wurden, identifiziert. Mit Hilfe der degenerierten PCR Primer HALOford und HALOrevE wurde das Fragment eines Halogenasegens aus *Streptomyces* sp. Pol001 amplifiziert. Ausgehend von der ca. 300 bp langen Sequenz wurde eine von Dr. Grozdanov (AG Hentschel, Universität Würzburg) konstruierte Genbank von Stamm Pol001 nach dem kompletten Halogenasegen mittels PCR durchsucht und die Halogenase auf dem Cosmidklon Pol001PAY1-D15 lokalisiert. Der phylogenetische Vergleich der Aminosäuresequenz dieser Halogenase mit ausgewählten Halogenasen aus Biosyntheseclustern ist in Abbildung 20 dargestellt.

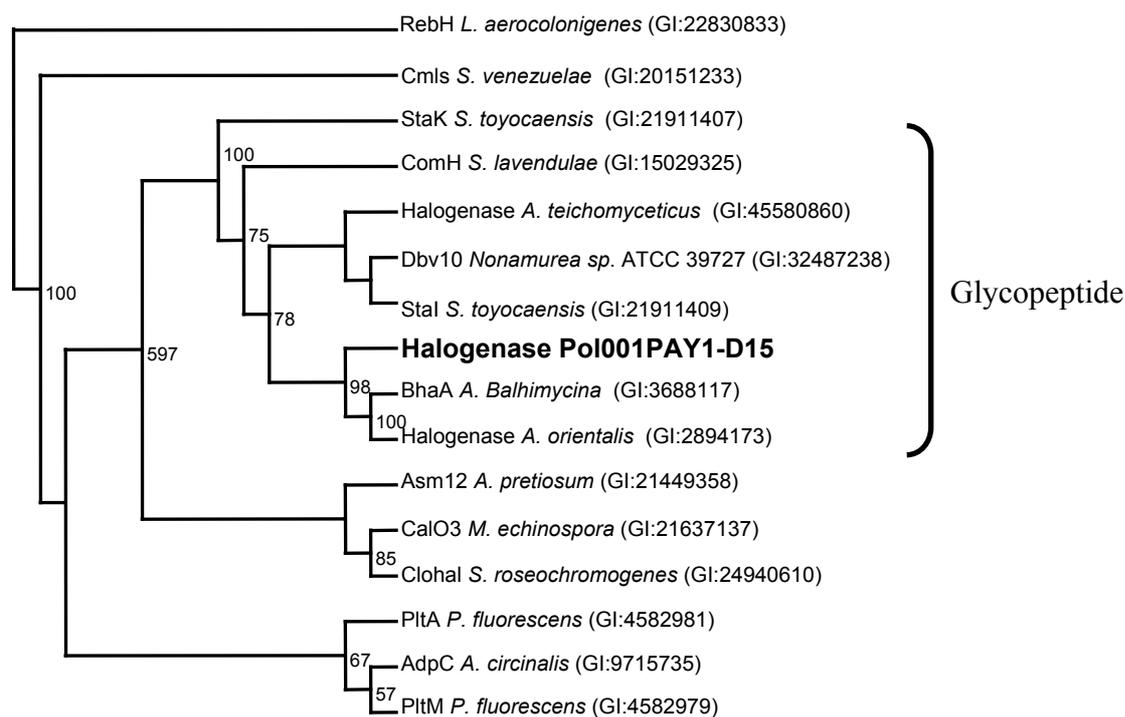


Abbildung 20 Phylogenetischer Vergleich der Halogenase aus *Streptomyces* sp. Pol001 mit homologen Enzymen aus verschiedenen Sekundärmetabolit-Biosyntheseclustern. Es wurde eine „Maximum Parsimony“ Berechnung mit 1000 Wiederholungen durchgeführt. Bootstrapwerte über 50% wurden an den jeweiligen Knotenpunkten angegeben. Als „Outgroup“ wurde eine Tryptophan-umsetzende Halogenase, RebH, verwendet.

Es zeigte sich, dass das in *Streptomyces* sp. Pol001 nachgewiesene Enzym der Gruppe von Halogenasen zuzuordnen ist, die an der Biosynthese von Glycopeptiden wie Vancomycin beteiligt ist.

5.3.2 Sequenzierung und Annotation des Glycopeptidbiosyntheseclusters

Die Sequenzierung des Cosmids Pol001PAY1-D15 und der angrenzenden Cosmide Pol001PAY1-L12, Pol001PAY1-P4, Pol001PAY1-I7 und Pol001PAY1-N11 führte zur Beschreibung eines Glycopeptidbiosyntheseclusters des Vancomycin-Typs. Diese Sequenzierung wurde unter Verwendung der unter Punkt 8.2 angegebenen Oligonukleotide durchgeführt (Tabelle 24). Die Cosmide L12, P4, I7 und N11 konnten mittels PCR als angrenzende Cosmide, sogenannte „Contigs“, von D15 identifiziert werden. Die schematische Darstellung des Biosyntheseclusters sowie die Orientierung und Überlappung dieser Cosmidklone ist schematisch in Abbildung 21 gezeigt. Eine Auflistung der einzelnen ORFs nach ihrer möglichen Funktion und der Vergleich mit Homologen aus anderen Genclustern von Glycopeptiden zeigt Tabelle 14.

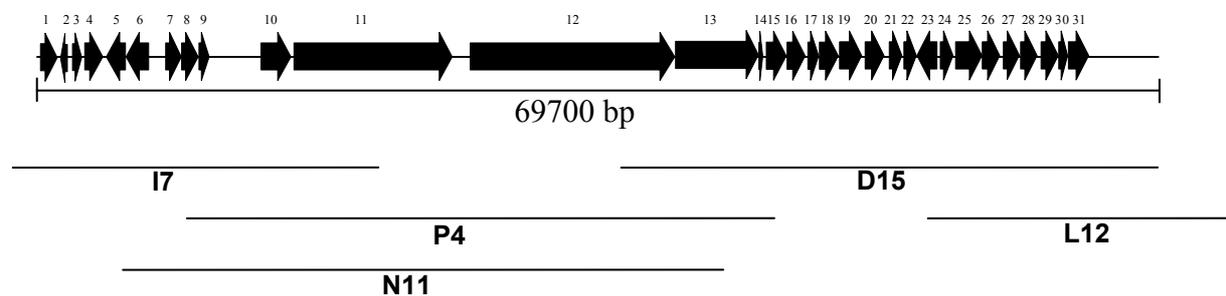


Abbildung 21 Schematische Darstellung des Glycopeptidbiosyntheseclusters aus *Streptomyces* sp. Pol001. Die Nummerierung der einzelnen ORFs entspricht Tabelle 14. Im unteren Bereich der Abbildung wurde die Orientierung der einzelnen Cosmidklone (I7, D15, P4, L12 und N11) dargestellt.

5. Ergebnisse

Tabelle 14 Analyse des Glycopeptidbiosyntheseclusters aus *Streptomyces* sp. Pol001. Neben der Nennung der möglichen Funktion dieser ORFs ist ein Vergleich mit homologen Proteinen aus den Biosyntheseclustern der Glycopeptide Balhimycin, Chloroeremomycin, Substanz A40926, Substanz A47934 und Teicoplanin angegeben.

ORFs	mögliche Funktion	AS-Homologien (%) zu anderen Glycopeptidgenclustern:				
		Balhimycin	Chloroeremomycin	A40926	A47934	Teicoplanin
1	Transkriptionsregulator StrR	82	82	79	56	50
2	Carboxypeptidase VanY	62	-	74	-	-
3	Transkriptionsr. VanRst	89	-	52	87	87
4	Transkriptionsr. VanSst	63	-	-	66	67
5	FemABX-Homolog	-	-	-	57	-
6	MurF	-	-	-	80	80
7	VanH	-	-	-	70	73
8	VanA	-	-	-	76	75
9	VanX	-	-	-	77	78
10	ABC-Transporter	82	84	74	72	79
11	NRPS-Module 1-3	69	71	69	67	68
12	NRPS-Module 4-6	77	78	75	71	72
13	NRPS-Modul 7	82	82	77	74	77
14	hypothetisches Protein	85	86	80	-	73
15	Oxidoreduktase OxyA	72	74	72	70	76
16	Oxidoreduktase OxyB	75	76	72	66	65
17	Sulfotransferase	-	-	-	47	-
18	Oxidoreduktase OxyC	80	82	72	70	70
19	Halogenase	85	85	78	79	80
20	Glycosyltransferase BgtfB	81	77	69	-	69
21	hypothetisches Protein	70	71	56	-	60
22	N-Methyltransferase	62	70	59	-	-
23	Aminotransferase HpgT	84	85	74	47	45
24	Hydrolase Bhp	87	89	-	-	-
25	NRPS BpsD	84	86	-	-	-
26	Oxidoreduktase OxyD	86	87	-	-	-
27	Hpg-Synthese HmaS	81	75	60	65	51
28	Hpg-Synthese Hmo	81	82	57	63	55
29	Dpg-Synthese DpgA	83	85	81	70	71
30	Dpg-Synthese DpgB	81	82	76	55	53
31	Dpg-Synthese DpgC	83	82	81	67	63

5.3.3 Analyse der NRPS-Adenylierungsdomänen

Die sieben Adenylierungsdomänen der NRPS-Systeme aus dem Glycopeptidbiosynthesecluster aus *Streptomyces* sp. Pol001 wurden bezüglich ihrer Aminosäurespezifität analysiert. Ziel war es, Aufschlüsse über die Struktur des Heptapeptidrückgrats der vorausgesagten Substanz zu erhalten. Zu diesem Zweck wurde der „NRSPredictor“ (<http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred>) verwendet (Rausch et al., 2005). Dieses Programm führte zwei verschiedene Berechnungsarten durch, um die Aminosäurespezifität einer Adenylierungsdomäne zu bestimmen. Zum einen wurden Aminosäurereste, die an der Bildung der Bindungstasche des Substrats beteiligt sind, analysiert (Stachelhaus et al., 1999). In Tabelle 15 sind diese Aminosäurereste für die Adenylierungsdomänen A1 bis A7 des Glycopeptidbiosyntheseclusters aus Pol001 aufgeführt. Die Nummerierung dieser Reste bezieht sich auf das Modellsystem der Adenylierungsdomäne des PheA NRPS-Systems aus *Bacillus brevis* (Marahiel et al., 1985). Wenn möglich wurde die Aminosäure angegeben, die wahrscheinlich von der jeweiligen Domäne als Substrat verwendet wird.

Tabelle 15 Darstellung der Aminosäurereste aus den Bindungstaschen der Adenylierungsdomänen A1 bis A7. Die Identität gibt an, zu wie viel Prozent die aufgelisteten Aminosäurereste zu bereits bekannten Adenylierungsdomänen identisch sind.

	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	vorgeschlagenes Substrat	Identität (%)
A1	D	A	F	Y	Q	G	L	V	W	K	keine Ähnlichkeit	-
A2	D	A	S	T	V	A	A	V	C	K	Tyr oder Bht	je 100
A3	D	V	L	L	V	G	T	V	A	K	Ala	70
A4	D	I	F	H	L	G	L	L	C	K	4-HPG	100
A5	D	A	V	H	L	G	L	L	C	K	4-HPG	100
A6	T	P	S	T	L	G	A	I	C	K	Bht	80
A7	D	P	Y	H	G	G	A	L	C	K	3,5-Dhpg	90

Tyr = Tyrosin; Bht = β -Hydroxytyrosin; Ala = Alanin; 4-Hpg = 4-Hydroxyphenylglycin; 3,4-Dhpg = 3,4-Dihydroxyphenylglycin

Zusätzlich wurde mit Hilfe dieses Programms eine Berechnungsart ausgeführt, bei der alle die Aminosäurereste mit einbezogen wurden, die in einem Abstand von bis zu 8 Å um das Substrat vorhanden sind. Mit dieser Analyse lassen sich Gruppen von ähnlichen Aminosäuren vorhersagen, die als Substrat für die untersuchte Adenylierungsdomäne in Frage kommen. Es wurden Berechnungen für zwei unterschiedliche Annahmen gemacht: Für die erste dieser

Berechnungen („large clusters“) wurde angenommen, dass mehrere Aminosäuresubstrate ähnliche Eigenschaften besitzen, für die zweite Annahme („small clusters“), dass nur kleine Gruppen von Aminosäuren ähnliche Eigenschaften besitzen. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16 Vorhersage der Aminosäurespezifität der Adenylierungsdomänen A1 bis A7 nach Rausch et al. (2005).

	„large clusters“	„small clusters“
A1	Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Abu, Iva	Val, Leu, Ile, Abu, Iva
A2	Phe, Trp, Phg, Tyr, Bht	Tyr, Bht
A3	keine Voraussage möglich	keine Voraussage möglich
A4	Ser, Thr, Dht, Dhpg, Dpg, Hpg	Dhpg, Dpg, Hpg
A5	Ser, Thr, Dht, Dhpg, Dpg, Hpg	Dhpg, Dpg, Hpg
A6	Phe, Trp, Phg, Tyr, Bht	Tyr, Bht
A7	Ser, Thr, Dht, Dhpg, Dpg, Hpg	Dhpg, Dpg, Hpg

„large clusters“: Vorhersage von Substraten unter der Annahme, dass mehrere Aminosäuren ähnliche Eigenschaften besitzen. „small clusters“: Vorhersage von Substraten unter der Annahme, dass nur wenige Aminosäuren ähnliche Eigenschaften besitzen. Abkürzung der Aminosäuren: Gly = Glycin; Ala = Alanin; Val = Valin; Leu = Leucin; Ile = Isoleucin; Abu = 2-Aminobutansäure; Iva = Isovalin; Phe = Phenylalanin; Trp = Tryptophan; Phg = Phenylglycin; Tyr = Tyrosin; Bht = β -Hydroxytyrosin; Ser = Serin; Thr = Threonin; Dht = Dihydroxytyrosin ; Dhpg = 3,5-Dihydroxyphenylglycin; Dpg = Dipropylglycin; Hpg = 4-Hydroxyphenylglycin

Aus den Analysen ließ sich die folgende Struktur des Heptapeptidrückgrats ableiten: Position 1 wird von einer aliphatischen Aminosäure gebildet, gefolgt von Tyrosin oder β -Hydroxytyrosin. Die Aminosäure an Position 3 konnte nicht zweifelsfrei ermittelt werden, eine aliphatische Aminosäure erscheint jedoch wahrscheinlich. Die Positionen 4 und 5 werden von 4-Hydroxyphenylglycin gebildet, β -Hydroxytyrosin besetzt Position 6 und 3,5-Dihydroxyphenylglycin bildet den Abschluss an Position 7.

5.3.4 Antimikrobielle Aktivität von *Streptomyces* sp. Pol001

Gegenwärtig wird die Struktur von vier antimikrobiell aktiven Substanzen aus *Streptomyces* sp. Pol001 aufgeklärt (Punkt 5.2.3). Vorläufige Ergebnisse sprechen dafür, dass es sich bei diesen nicht um Glycopeptide des Vancomycintyps handelt (T. Gulder, persönliche Mitteilung).

5.4 Nachweis mikrobieller FADH₂-abhängiger Halogenasen in marinen Schwämmen

5.4.1 Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in Reinkulturen

Verschiedene konservierte Domänen FADH₂-abhängiger Halogenasen konnten in den Aminosäuresequenzen veröffentlichter Enzyme identifiziert werden (Punkt 4.4.20). Das aus diesen Domänen abgeleitete Primerpaar HALOforD und HALOrevE erwies sich für die Amplifikation kurzer Halogenasegenfragmente als am besten geeignet. Zur Kontrolle wurden verschiedene bakterielle Gruppen verwendet, für die das Vorhandensein von Halogenasen bekannt ist (Pelzer et al., 1999; Keller et al., 2000). PCR-Produkte der erwarteten Größe von ca. 300 bp konnten bei der Untersuchung verschiedener *Pseudomonas* Arten und bei dem Streptomyceten *Amycolatopsis orientalis* erhalten werden. In den Proteobakterien *E. coli*, *S. flexneri*, *Y. enterocolytica* und *S. typhimurium* konnten, wie erwartet, keine Halogenasen nachgewiesen werden (Abbildung 22). Die Sequenzierung der Amplifikationsprodukte für *A. orientalis* lieferte eine Aminosäureidentität von 52% (54 von 102 Aminosäuren) zu einer Halogenase aus *A. orientalis* (Zerbe et al., 2002). Das Produkt von *P. aeruginosa* zeigte höchste Homologie (56%; 59 von 104 identische Aminosäuren) zu einer putativen Alkylhalidase (YP_259890) (Synonym zu Halogenase) aus *P. fluorescens* PF-5 (Paulsen et al., 2005). Die Sequenz aus *P. syringae* zeigte eine höhere Homologie zu einer Dehydrogenase (ZP_00265813) (87%, 82 von 94 identische Aminosäuren) aus *P. fluorescens* Pf-1 (NCBI Microbial Genomes Annotation Project, 2004), als zu einer putativen Halogenase (YP_118341) aus *Nocardia farcinica* IFM 10152 (40%, 38 von 95 identische Aminosäuren) (Ishikawa et al., 2004). Aus diesen Daten wurde geschlossen, dass das verwendete Primerpaar für die spezifische Amplifikation von Halogenasegenen geeignet war. Zusätzlich dienten die Positivkontrollen *A. orientalis* und *Pseudomonas* sp. zur Optimierung der Reaktionsbedingungen der PCR.

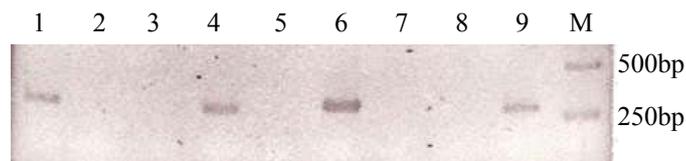


Abbildung 22 Amplifikation von Halogenasegenfragmenten aus bakteriellen Reinkulturen. (1) *A. orientalis*; (2) *S. typhimurium*; (3) *Y. enterocolytica*; (4) *P. syringae*; (5) *S. flexneri*; (6) *P. aeruginosa*; (7) *E. coli* 933; (8) Negativkontrolle; (9) Positivkontrolle; (M) Marker

5.4.2 Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in marinen Schwämmen

Die Primer HALOford und HALOrevE wurden verwendet um die mikrobiellen Konsortien verschiedener mariner Schwämme auf Halogenasen zu untersuchen. PCR-Produkte wurden für die Schwämme *Agelas cerebrum*, *A. dispar*, *A. clathrodes*, *A. conifera*, *Aplysina lacunosa*, *A. archeri*, *A. cauliformis*, *A. aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. fistularis*, *Xestospongia muta* und *Ectyoplasia ferox* erhalten. Kein Produkt lieferten die Schwämme *Ptilocaulis* sp., *Theonella swinhoei*, *Chondrilla nucula*, *Agelas citrina*, *Axinella polypoides*, *A. damicornis* und *Pseudoceratina crassa*. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Gattungen *Aplysina* und *Agelas* gelegt, da in beiden halogenierte Sekundärmetabolite nachgewiesen wurden und eine mikrobielle Beteiligung an der Biosynthese diese Substanzen postuliert wird (Teeyapant et al., 1993; König et al., 1998). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden kloniert und jeweils 20 Klone pro Schwamm einer Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) Analyse unterzogen. Klone mit abundantem Restriktionsmuster wurden sequenziert. Dabei konnten insgesamt 34 Halogenase-Teilsequenzen aus den Schwämmen *A. aerophoba*, *A. cavernicola*, *A. lacunosa*, *A. archeri*, *A. cauliformis*, *A. conifera*, *A. clathrodes*, *E. ferox* und *X. muta* identifiziert werden.

5.4.3 Phylogenetische Analyse von Teilsequenzen

Die phylogenetische Analyse der 34 partiellen Halogenase-Aminosäuresequenzen zeigte, dass die große Mehrzahl ein eigenes, unabhängiges Cluster (A) bildete (Abbildung 23). Die Sequenzen besaßen eine „in cluster similarity“ zwischen 31 und 99%. Außerdem enthielt dieses Cluster Sequenzen aus allen Schwämmen, die ein Amplifikationsprodukt lieferten. Eine kleinere Anzahl an Sequenzen fiel mit Halogenasen aus anderen Organismen oder der Sargassosee zusammen (Cluster B). Lediglich eine der Schwammsequenzen (*A. lacunosa* Klon 3) ließ sich phylogenetisch keiner anderen Schwammsequenz zuordnen und bildete eine eigene Abstammungslinie.

5. Ergebnisse

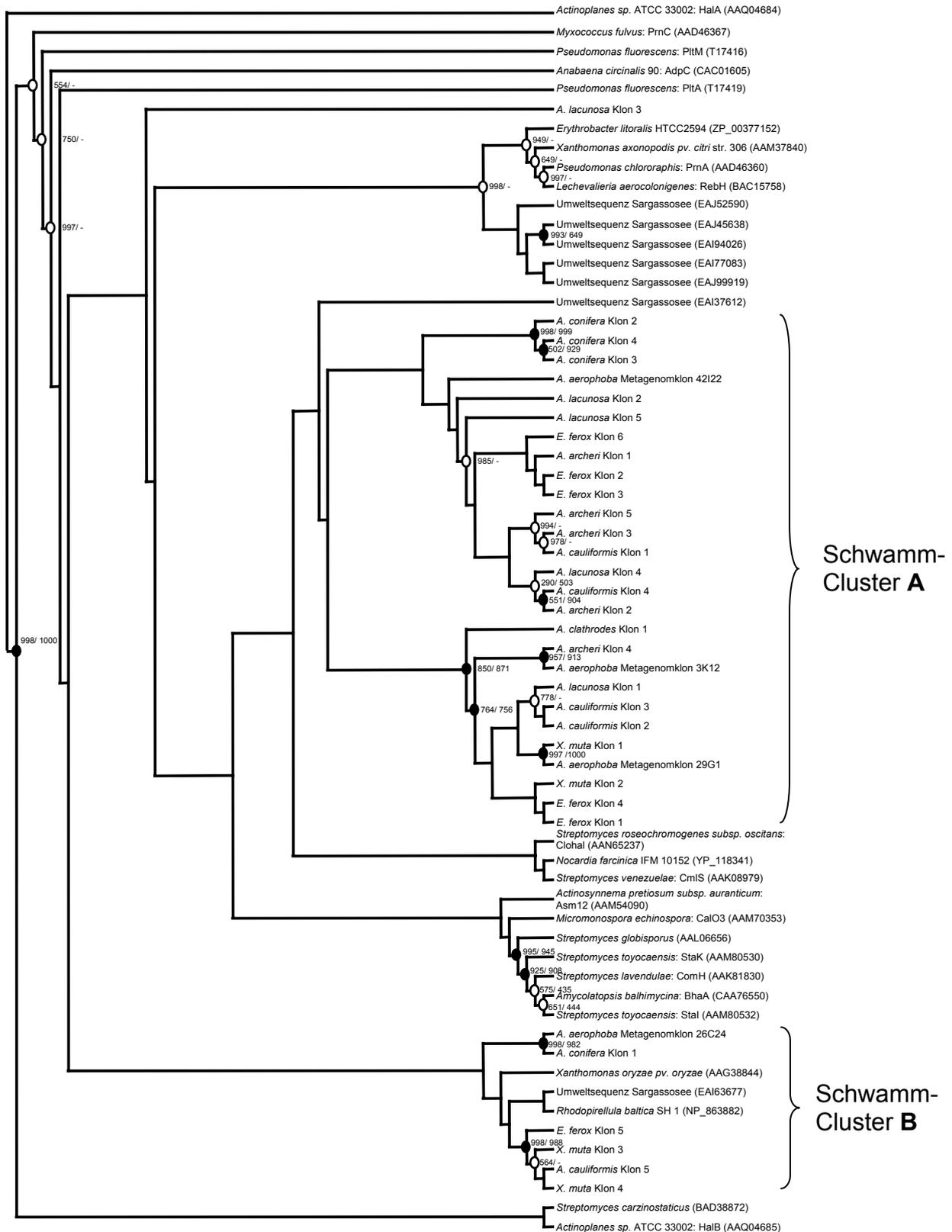


Abbildung 23 Neighbor-Joining und Parsimony Analyse partieller Halogenase-Aminosäuresequenzen mit jeweils 1000 Wiederholungen. Geschlossene Kreise markieren Verzweigungen, deren Bootstrapwerte bei beiden Methoden oberhalb 50% lagen. Offene Kreise markieren Verzweigungen, die lediglich bei einer der Berechnungsmethoden einen Bootstrapwert größer als 50% besaßen. (A) und (B) markieren Gruppen, die vor allem Sequenzen aus marinen Schwämmen beinhalteten.

5.4.4 Nachweis FADH₂-abhängiger Halogenasen in der Metagenombank Apae02

Um vollständige Halogenasegensequenzen zu erhalten, wurde die Metagenombank Apae02 des mikrobiellen Konsortiums von *Aplysina aerophoba* mittels der Primer HALOford und HALOrevE durchmustert. Diese Genbank beinhaltet 29108 Klone, die in 76 „384-well“-Mikrotiterplatten abgelegt wurden (Fieseler, 2005). Die Insertgröße der einzelnen Fosmide in dieser Bank wurde mit durchschnittlich 38000 bp bestimmt (Fieseler, 2005). Insgesamt konnten neun Halogenase-positive Klone (3K12, 12E22, 16K17, 26C24, 29G1, 35E16, 36A12, 36H6 und 42I22) identifiziert werden. Die Sequenzierung der Amplifikationsprodukte lieferte vier unterschiedliche Halogenasegene. Die Sequenzen der Klone 3K12 und 42I22 waren einzigartig, während die Sequenzen der Klone 16K17 und 29G1 sowie die Sequenzen der Klone 12E22, 26C24, 35E16, 36A12 und 36H6 identisch waren. Pro Gruppe wurde jeweils ein Klon (3K12, 26C24, 29G1 und 42I22) ausgewählt und das entsprechende Halogenasegen komplett sequenziert.

5.4.5 Nachweis konservierter Domänen

In FADH₂-abhängigen Halogenasen konnten das GxGxxG-Motiv und das WxWxI-Motiv, zwei konservierte Aminosäuredomänen, identifiziert werden. Auch die putativen Halogenasen aus dem mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* wurden auf diese Sequenzmotive hin untersucht. Es zeigte sich, dass beide Motive in den vier untersuchten Sequenzen vorhanden waren (Tabelle 17). Weiterhin wurden sämtliche putativen Halogenasen, die für phylogenetische Untersuchungen herangezogen wurden, auf diese Sequenzmotive untersucht. Das GxGxxG-Motiv der Sequenz EAJ45638 aus der Sargassosee beinhaltete demzufolge einen Threoninrest anstelle des abschließenden Glycinrests. Das WxWxI-Motiv zeigte in zwei Halogenasen (CalO3 und StaK) mit nachgewiesener Aktivität geringfügige Unterschiede (Alanin oder Valin anstelle von Isoleucin), wobei es sich hierbei jedoch um Austausche von Aminosäuren gleicher Art handelte, insofern als diese Aminosäuren aliphatische Seitenketten besitzen.

5. Ergebnisse

Tabelle 17 Konservierte Domänen verschiedener Halogenasen aus Biosyntheseclustern, Reinisolaten und aus Umweltsequenzen

Protein	Halogenierung von	GxGxxG Motiv	WxWxI Motiv	Referenz
Halogenasen mit nachgewiesener Aktivität				
AAG38844 (GI:15055554)	Xanthomonadin	(31)GGGPAG	(232)WMWLIP	Goel et al., 2002
AAL06656 (GI:24575085)	C-1027	(13)GGGPAG	(222)WFWYIP	Liu et al., 2002
AdpC (GI:9715735)	Anabaenopeptilide	(71)GGGLAG	(302)WVWTIP	Rouhiainen et al., 2000
Asm12 (GI:21449358)	Ansamitocin	(08)GGGPAG	(217)WIWAIP	Yu et al., 2002
BAD38872 (GI:51699497)	Neocarzilin	(13)GSGMAG	(243)WLWVIP	Otsuka et al., 2004
BhaA (GI:3688117)	Balhimycin	(12)GGPGG	(220)WFWYIP	Puk et al., 2002
CAG15020 (GI:45580860)	Teicoplanin	(12)GGGPAG	(220)WFWYIP	Li et al., 2004
CalO3 (GI:21637137)	Calicheamicin	(14)GGGPAG	(219)WLWYAP	Ahlert et al., 2002
Clohal (GI:24940610)	Clorobiocin	(13)GGPGG	(218)WWWVIP	Pojer et al., 2002
CmlS (GI:20151233)	Chloramphenicol	(10)GGGPAG	(215)WVWMIP	Pirae et al., 2004
ComH (GI:15029325)	Complestatin	(14)GGGPAG	(222)WFWYIP	Chiu et al., 2001
HalB (GI:33317316)	2-(3,5-dibromophenyl)pyrrol	(21)GSGLAG	(251)WIWVIP	Wynands und van Pee, 2004
PltA (GI:7522171)	Pyoluteorin	(12)GGGPAG	(237)WVWQIP	Nowak-Thompson et al., 1999
PltM (GI:7522172)	Pyoluteorin	(10)GSGIAG	(237)WLWVIP	Nowak-Thompson et al., 1999
PrnA (GI:5669511)	Pyrrolnitrin	(12)GGGTAG	(272)WTKIP	Hammer et al., 1999
PrnC (GI:5669521)	Pyrrolnitrin	(20)GSGMSG	(248)WLWVIP	Hammer et al., 1999
PyrH (GI:53854583)	Pyrroindomycin	(09)GGGTAG	(279)WMWTIP	Zehner et al., 2005
RebH (GI:21726909)	Rebecamycin	(12)GGGTAG	(282)WTKIP	Sanchez et al., 2002
StaI (GI:21911409)	A47934	(35)GGPGG	(243)WFWYIP	Pootoolal et al., 2002
StaK (GI:21911407)	A47934	(12)GGGPAG	(221)WFWYVP	Pootoolal et al., 2002

Tabelle 17 Fortsetzung

Protein	Halogenierung von	GxGxxG Motiv	WxWxI Motiv	Referenz
Enzyme aus Genomsequenzierungen ohne Funktionsnachweis				
AAM37840 (GI:21109306)		(13)GGGTAG	(263)WRWHIP	da Silva et al., 2002
NP_863882 (GI:32470889)		(42)GGGPAG	(254)WFWFIP	Glöckner et al., 2003
YP_118341 (GI:54024099)		(11)GGPGG	(225)WFWHIP	Ishikawa et al., 2004
ZP_00377152 (GI:61101698)		(13)GGGTAG	(267)WQWRIP	Genomsequenzierungsprojekt
Enzyme aus dem mikrobiellen Konsortium der Sargassosee				
EAI37612 (GI:44311431)		(09)GGGPAG	(211)WIWVIP	Venter et al., 2004
EAI63677 (GI:44348639)		(21)GGGPAG	(227)WLWYIP	Venter et al., 2004
EAI77083 (GI:44367343)		(08)GGGTAG	(258)WQWRIP	Venter et al., 2004
EAI94026 (GI:44390968)		(15)GGGTAG	(264)WQWKIP	Venter et al., 2004
EAJ45638 (GI:44464755)		(17)GVGEAT	(232)WQWKIP	Venter et al., 2004
EAJ52590 (GI:44474441)		(22)GGGTAG	(272)WRWQIP	Venter et al., 2004
EAJ99919 (GI:44544792)		(11)GGGTSG	(265)WQWRIP	Venter et al., 2004
Enzyme aus dem mit <i>A. aerophoba</i> assoziierten mikrobiellen Konsortium				
Metagenomklon 3K12		(09)GGGPAG	(213)WSWAIP	diese Arbeit
Metagenomklon 26C29		(16)GGGPAG	(221)WFWYIP	diese Arbeit
Metagenomklon 29G1		(36)GGPGG	(239)WSWAIP	diese Arbeit
Metagenomklon 42I22		(11)GGGPAG	(217)WLWNIP	diese Arbeit

5.4.6 Phylogenetische Analyse von Vollsequenzen

Die phylogenetische Analyse der kompletten Halogenase-Sequenzen (Abbildung 24) zeigte, dass sich diese Enzyme substratspezifisch und nicht phylogenetisch gruppieren. Es wurden insgesamt fünf Gruppen identifiziert. In Cluster A befinden sich Halogenasen, die für die Halogenierung von Tryptophanresten verantwortlich sind, wobei Funktionsstudien bei den

Umweltsequenzen aus der Sargassosee (Venter et al., 2004) und den Sequenzen aus *Erythrobacter* und *Xanthomonas* fehlen.

Cluster B1 besteht aus Enzymen, die für Halogenierungen von Sekundärmetaboliten mit Vancomycinstruktur, wie z.B. Complestatin (Chiu et al., 2001), Substanz A47934 (Pootoolal et al., 2002), Balhimycin (Pelzer et al., 1999) und Teicoplanin (Li et al., 2004), verantwortlich sind. Die Nähe des *S. globisporus* Enzyms zu dieser Gruppe kann dadurch erklärt werden, dass es, obwohl es keine Vancomycin-ähnliche Struktur halogeniert, für die Chlorierung eines Phenolringsystems verantwortlich ist. Diese Chlorierung wird benachbart zu einer Hydroxy- oder Ethergruppe eingeführt (Liu et al., 2002). Eine derartige Struktur liegt auch im Vancomycin und verwandten Substanzen vor.

In den Clustern C und D befinden sich die neuen putativen Halogenasen aus der Metagenombank des mikrobiellen Konsortiums aus *Aplysina aerophoba*. Die Sequenz von Fosmid 26C24 bildet eine Gruppe mit einer Umweltsequenz aus der Sargassosee (Venter et al., 2004) und einer putativen Alkylhalidase (syn. Halogenase) aus dem Planctomyceten *Rhodopirellula baltica* SH1 (Glöckner et al., 2003). Obwohl der Funktionsnachweis fehlt, gewährt der genomische Kontext der *R. baltica* Alkylhalidase interessante Schlüsse. Etwa 200 bp in 5'-Richtung der Alkylhalidase liegt ein PKS-Modul im Genom von *R. baltica* SH1 vor, welches auf Sekundärmetabolismus in diesem Stamm hinweisen könnte. Allerdings muss einschränkend bemerkt werden, dass weder halogenierte Polyketide noch andere Sekundärmetabolite aus *R. baltica* SH1 oder anderen Planctomyceten bekannt sind. Das Substrat von Halogenase 26C24 bleibt daher unbekannt.

Die putativen Halogenasen 3K12, 29C1 und 42I22 bilden ein eigenes Cluster (C) zusammen mit einer Umweltsequenz aus der Sargassosee (Venter et al., 2004) und weisen Ähnlichkeiten mit Cluster B auf. Die Mehrheit der Enzyme aus Cluster B ist an der Halogenierung von Phenolringsystemen beteiligt, wobei CmlS eine Ausnahme bildet (Pirae et al., 2004). Daher wäre es möglich, dass Phenolringsysteme als Substrat für die neu entdeckten Halogenasen dienen.

Cluster E besteht hauptsächlich aus Halogenasen, die Pyrrolringe als Substrat verwenden. Beachtenswert ist die Tatsache, dass die Sequenz von PltM, aber nicht von PltA aus dem Pyoluteorin-Biosynthesecluster (Nowak-Thompson et al., 1999) in diese Gruppe fällt.

5. Ergebnisse

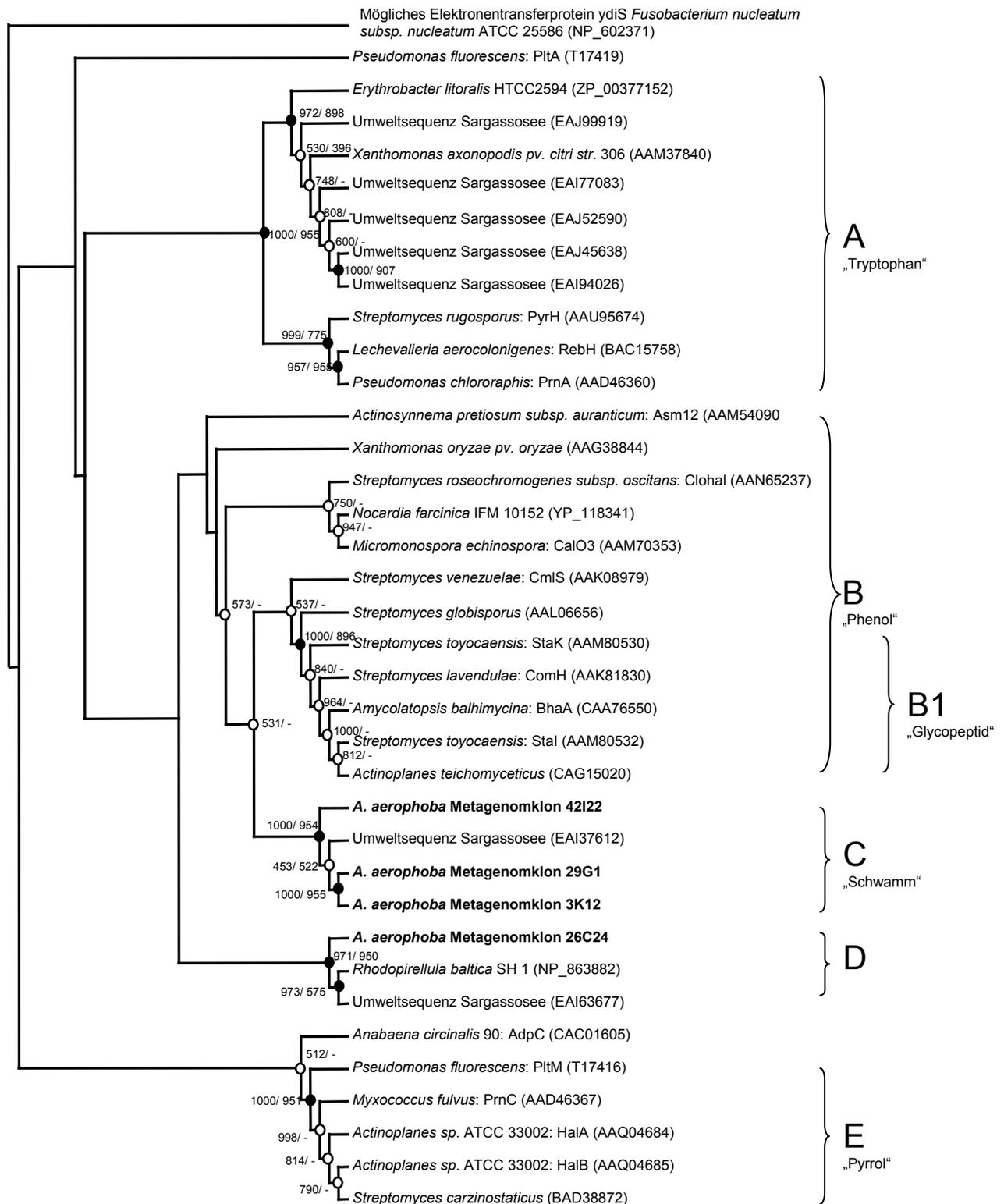


Abbildung 24 Neighbor-Joining und Parsimony Analyse von Halogenase-Aminosäurevollsequenzen mit jeweils 1000 Wiederholungen. Geschlossene Kreise markieren Verzweigungen, deren Bootstrapwerte bei beiden Methoden oberhalb 50% lagen. Offene Kreise markieren Verzweigungen, die lediglich bei einer der Berechnungsmethoden einen Bootstrapwert größer als 50% besaßen. Die Bezeichnung der einzelnen Sequenzgruppen A bis E ist im Text näher erklärt. Als „Outgroup“ wurde ein „Putatives Elektronentransferprotein“ aus *Fusobacterium nucleatum subsp. nucleatum* ATCC 25586 (NP_602371) verwendet.

Beide sind jeweils für eine Chlorierung bei der Pyoluteorinbildung verantwortlich, besitzen aber nur 19% identische Aminosäuren. Dieser Unterschied könnte durch die Annahme erklärt werden, dass eines dieser Enzyme ein bereits einfach chloriertes Pyrrolringssystem als Substrat verwendet. Die Anwesenheit der Halogenase aus dem Neocarzilingencluster in diesem Bereich des Baums ist unerwartet, da diese für die Chlorierung einer aliphatischen Seitenkette verantwortlich ist. Auch die Position von AdpC aus *Anabaena circinalis* 90, die benachbart zu Cluster E steht, ist überraschend, da dieses Enzym ein Phenolringssystem des Anabaenopeptilides 90B chloriert (Rouhiainen et al., 2000). Die phylogenetische Position könnte dadurch erklärt werden, dass es bis jetzt die einzige FADH₂-abhängige Halogenase aus Cyanobakterien darstellt.

5.4.7 Sequenzierung und Annotation von Fosmid 3K12

Durch die komplette Sequenzierung des Inserts von Klon 3K12 (AGOWA GmbH, Berlin) wurde eine Größe von 40566 bp, ein GC-Gehalt von 64,1% und 32 vollständige sowie zwei partielle proteinkodierende Gene identifiziert (Tabelle 18). Für 21 dieser „open reading frames“ (ORFs) konnten mittels NCBI Datenbank-Abgleich homologe Proteine mit bekannter Funktion aus anderen Organismen gefunden werden. Für weitere 13 ORFs konnte keine Funktion benannt werden (Abbildung 25, A; Tabelle 18). Die Aufschlüsselung der Proteine nach taxonomischen Kriterien (Abbildung 25, B) ergab Homologien zu Proteobakterien (15 Proteine), Aktinobakterien (elf Proteine), Archaeobakterien (drei Proteine), unkultivierten Bakterien aus der Sargassosee (zwei Proteine), und Firmicuten, Planctomyceten und Chloroflexi (jeweils ein Protein).

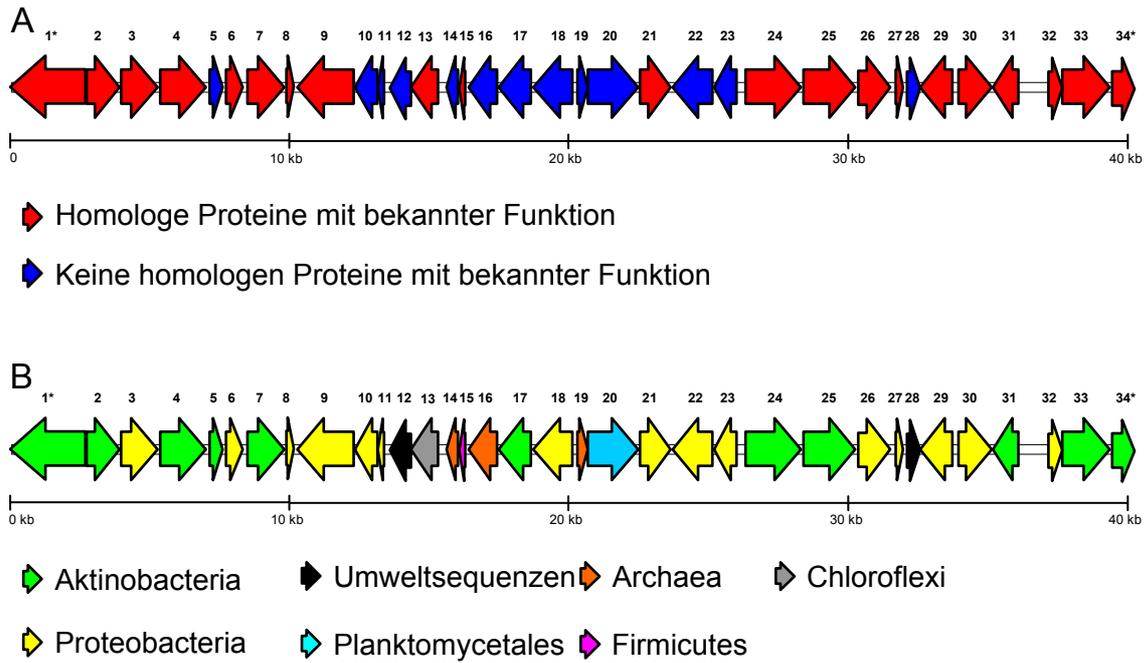


Abbildung 25 Schematische Darstellung der ORFs auf Apae02-3K12. Die Nummerierung entspricht Tabelle 18. (A) Kennzeichnung der ORFs nach Existenz von homologen Proteinen mit oder ohne bekannte Funktion; (B) Kennzeichnung der ORFs nach taxonomischen Kriterien.

5. Ergebnisse

Tabelle 18 Die verschiedenen Eigenschaften der „open reading frames“ (ORFs) von Fosmid 3K12. Die Nummerierung entspricht Abbildung 25.

ORF	AS	Mögliche Funktion	Der erste „Blast Hit“ (Protein, Accession Nummer, Herkunft)	Ähnlichkeits-, Identitätswerte (%)	E-Wert	GC (%)	Lokus
1 ¹	>889	Membranprotein	SCO2672 (NP_626907) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	36, 23	6e-10	67,2	1 – 2686 (-)
2	388	Hydrolase	SAV5668 (BAC73380) <i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	38, 23	2e-10	63,7	2692 – 3855 (+)
3	431	Coenzym F420-abhängige N5,N10-methylentetrahydromethanopterin Reductase	Bcepa03005300 (ZP_00213282) <i>Burkholderia cepacia</i> R18194	42, 25	3e-27	64,7	3944 – 5236 (+)
4	542	Halogenase	Clohal (AAN65237) <i>Streptomyces roseochromogenes subsp. oscitans</i>	53, 36	2e-70	66,5	5352 – 6977 (+)
5	157	unbekannt, MOSC-Domäne	Krad07004189 (ZP_00352713) <i>Kineococcus radiotolerans</i> SRS30216	53, 36	3e-11	65,7	7111 – 7581 (+)
6	201	N-Acetyltransferase, GNAT-Familie	blr2886 (NP_769526) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	65, 40	3e-32	64,5	7717 – 8319 (+)
7	453	Aminotransferase	SCO5655 (CAA19897) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	58, 39	5e-82	63,6	8460 – 9818 (+)
8	111	Anti-Anti-Sigma Regulationsfaktor	Magn03010666 (ZP_00055975) <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	69, 44	3e-18	62,5	9918 – 10250 (+)
9	680	Serinphosphatase RsbU	Magn03010667 (ZP_00055976) <i>Magnetospirillum magnetotacticum</i> MS-1	47, 31	4e-62	65,1	10277 – 12316 (-)
10	268	unbekannt	bl10713 (NP_767353) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	43, 30	1e-20	66,0	12342 – 13145 (-)
11	106	unbekannt	mll8176 (NP_108327) <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303099	52, 35	4e-07	58,2	13167 – 13484 (-)
12	255	unbekannt	unbekanntes Protein (EAI40110) Umweltsequenz	43, 27	0.006	65,5	13601 – 14365 (-)
13	317	A/G-spezifische DNA Glycosylase	Chlo02002162 (ZP_00358199) <i>Chloroflexus aurantiacus</i>	50, 34	2e-30	66,9	14365 – 15315 (-)
14	139	unbekannt	TTC0267 (YP_004242) <i>Thermus thermophilus</i> HB27	52, 36	2e-14	64,0	15644 – 16060 (-)
15	112	Nucleotidyltransferase	TTE0244 (NP_621936) <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	52, 29	9e-07	62,5	16056 – 16391 (-)
16	340	unbekannt	MA2021 (NP_616944) <i>Methanosarcina acetivorans</i> C2A	49, 33	7e-27	65,2	16426 – 17445 (-)
17	384	unbekannt	hypothetisches Protein (AAR92167) <i>Mycobacterium avium</i>	50, 37	2e-46	63,4	17534 – 18685 (-)

5. Ergebnisse

Tabelle 18 Fortsetzung

ORF	AS	Mögliche Funktion	Der erste „Blast Hit“ (Protein, Accession Nummer, Herkunft)	Ähnlichkeits-, Identitätswerte (%)	E-Wert	GC (%)	Lokus
18	466	unbekannt	Rgel0200115 (ZP_00244904) <i>Rubrivivax gelatinosus</i> PM1	46, 32	7e-52	63,4	18783 – 20180 (-)
19	119	unbekannt	ST1093 (NP_377016) <i>Sulfolobus tokodaii</i> str. 7	58, 38	4e-17	61,9	20355 – 20711 (+)
20	607	unbekannt	RB5268 (CAD78384) <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	39, 22	3e-04	62,5	20715 – 22535 (+)
21	357	Hydrolase	plpp0087 (YP_122242) <i>Legionella pneumophila</i> str. Paris	49, 29	2e-33	65,4	22615 – 23685 (+)
22	495	unbekannt	RSc3124 (CAD16833) <i>Ralstonia solanacearum</i>	44, 30	1e-04	62,6	23750 – 25234 (-)
23	271	unbekannt	Saro02003465 (ZP_00302097) <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444	45, 32	2e-19	62,9	25251 – 26063 (-)
24	667	Lipoprotein	SCO2721 (CAB75310) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	49, 35	5e-44	63,5	26404 – 28404 (+)
25	621	Lipoprotein	SCO2721 (CAB75310) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	51, 34	2e-42	60,1	28500 – 30362 (+)
26	396	L-Alanine-DL-Glutamate	MBNC03004090 (ZP_00196656) <i>Mesorhizobium</i> sp. BNC1	63, 42	2e-83	65,4	30421 – 31608 (+)
27	102	Plasmidstabilisierungsprotein	MCA2653 (AAU91223) <i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath	58, 39	2e-07	59,8	31902 – 32207 (+)
28	154	unbekannt	unbekanntes Protein (EAH05307) Umweltsequenz	58, 43	2e-15	64,5	32232 – 32693 (+)
29	398	Penicillinbindeprotein	RPA3284 (NP_948623) <i>Rhodopseudomonas palustris</i> CGA009	46, 31	4e-43	64,7	32681 – 33874 (-)
30	403	Acetyl-CoA Acetyltransferase	Bcep02002049 (ZP_00283342) <i>Burkholderia fungorum</i> LB400	53, 39	4e-72	66,0	34054 – 35262 (+)
31	311	sekretiertes Protein	SCO0244 (CAB53284) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	40, 23	1e-07	63,1	35308 – 36240 (-)
32	169	nukleinsäurebindendes Protein	Bcep02007472 (ZP_00277865) <i>Burkholderia fungorum</i> LB400	53, 39	1e-22	63,0	37310 – 37816 (+)
33	571	integrales Membran-Efflux-Protein	SAV3289 (BAC71000) <i>Streptomyces avermitilis</i> MA-4680	47, 30	3e-57	66,0	37816 – 39528 (+)
34 ¹	>279	integrales Membran-Efflux-Protein	ORF 91 (BAC76549) <i>Streptomyces rochei</i>	54, 32	7e-44	62,6	39528 – 40365 (+)

¹unvollständig

5.4.8 Charakterisierung ausgewählter ORFs

ORF 1

Bei dem in ORF 1 teilweise kodierten Protein handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Membranprotein. Wie aus der in Abbildung 26 dargestellten *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz hervorgeht, besitzt dieses Protein mindestens sieben alpha-helikale Transmembranbereiche. Die Sequenzierung eines weiteren 5kb großen Bereichs des Fosmids Apae02-71K1, welches als „Contig“ von Apae02-3K12 identifiziert wurde, zeigte auf, dass ORF 1 sich möglicherweise über einen sehr großen Bereich fortsetzt. Eine genaue Aussage kann hierbei auf Grund der verwendeten Sequenzierungsmethode des „single strand walkings“ nicht getroffen werden. Es zeigten sich jedoch auf Aminosäureebene Homologien zu großen, bekannten Membranproteinen, wie zum Beispiel dem „platelet binding protein“ GspB aus *Streptococcus gordonii* (GI:15991793), welches eine Größe von 3072 Aminosäuren besitzt.

ORF 2

ORF 2 kodiert für eine putative Hydrolase, die Homologien (25% identische Aminosäuren, e-Wert: $2e^{-08}$) zu CarD aus *Sphingomonas* CB3 zeigt (Shepherd und Lloyd-Jones, 1998). CarD gehört zum car Locus und spielt eine Rolle im Karbazolkatabolismus. Ein weiteres homologes Protein (21% identische Aminosäuren, e-Wert: $1e^{-07}$) ist eine 2-Hydroxymucon-Semialdehyd-Hydrolase aus *Pseudomonas putida*, welche am Abbau von Naphthalen beteiligt ist (Dennis und Zylstra, 2004). Die in ORF 2 kodierte Hydrolase könnte daher ebenso eine Rolle im Metabolismus von aromatischen Substanzen spielen.

ORF 3

Das von ORF 3 kodierte Protein zeigt Homologien (25% identische Aminosäuren, e-value: $1e^{-22}$) zur Alpha-Untereinheit einer Monooxygenase aus *Burkholderia* sp. DBT1 (Di Gregorio et al., 2004), die an der Dibenzothiophentransformation beteiligt ist. ORF 3 könnte daher, ebenso wie ORF 2 eine Rolle im Metabolismus von aromatischen Substanzen spielen. Außerdem besitzt ORF 3 Ähnlichkeiten mit Luciferasen, wie LuxA (CAA30831) aus *Photobacterium leiognathi* (Illarionov et al., 1990) und mit Enzymen aus Biosyntheseclustern, wie einer Alpha-ketten-Alkanal-Monooxygenase aus dem Rifamycin Gencluster aus *Amycolatopsis mediterranei* S699 (August et al., 1998) sowie MitH, einer F420-abhängigen

H4MPT Dehydratase aus dem Mitomycin C Gencluster aus *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564 (Mao et al., 1999).

ORF 8

Das von ORF 8 kodierte Protein ist sehr wahrscheinlich ein Anti-Anti-Sigma-Regulationsfaktor. Homologe Proteine sind beispielsweise für die Regulation der Biosynthese von Cephamycin C und Clavulansäure in *Streptomyces clavuligerus* (BldG) (Bignell et al., 2005) oder für die Regulierung der Sporulation von verschiedenen Bakterien, wie z.B. *Bacillus subtilis* (Wu et al., 1992), verantwortlich.

ORF 29

Ein InterPro-Vergleich (Apweiler et al., 2001) der abgeleiteten Aminosäuresequenz von ORF 29 führte zum Nachweis der Proteindomäne IPR012338, welche in so genannten „penicillin-binding proteins“ vorliegt. Das putative Protein zeigt entsprechend Homologien zu „penicillin binding proteins“ und zu Beta-Lactamasen. Außerdem besitzt es Homologien (32% identische Aminosäuren, e-Wert: $2e^{-36}$) zu ORF 2 aus dem Biosynthesecluster der Epothilone (Molnar et al., 2000). Ein weiteres homologes Protein (25% identische Aminosäuren, e-Wert: $3e^{-04}$), MitL, findet sich im Mitomycin C Gencluster von *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564 (Mao et al., 1999), welches Esteraseaktivität besitzt.

ORF 33 und 34

Die durch ORF 33 und 34 kodierten Proteine stellen Transporter aus der „Major Facilitator Superfamily“ dar. Diese Gruppe enthält Proteine, die für die Aufnahme von Zuckern zuständig sind, sowie Transporter, die für die Ausscheidung von Sekundärmetaboliten („Multidrug-Resistance“ Proteine) verantwortlich sind. Auch Oligosaccharid-Protonen Symporter gehören zu dieser Familie (Pao et al., 1998). Die Vertreter dieser Superfamilie bestehen jeweils aus einer Polypeptidkette mit 12-14 Transmembrandomänen. Das von ORF 33 abgeleitete Protein besitzt ebenfalls mindestens zwölf Transmembrandomänen (Abbildung 26). Da ORF 34 nicht vollständig auf dem Fosmid 3K12 vorhanden ist, konnten bei diesem nur sieben Transmembrandomänen nachgewiesen werden (Abbildung 26). Das von ORF 33 abgeleitete Protein zeigt höchste Homologien zu „Multidrug-Resistance“ Proteinen aus Sekundärmetabolit-Biosyntheseclustern aus *Streptomyces atroolivaceus*, *S. rochei* und *S. pristinaespiralis* (Cheng et al., 2002; Mochizuki et al., 2003; Blanc et al., 1995). Auch ORF 34 zeigte Homologien zu den eben erwähnten Transportern aus *S. rochei* und

S. pristinaespiralis und zusätzlich Ähnlichkeit zu einem Resistenzprotein gegen Virginiamycin aus *S. virginiae* (Lee et al., 1999).

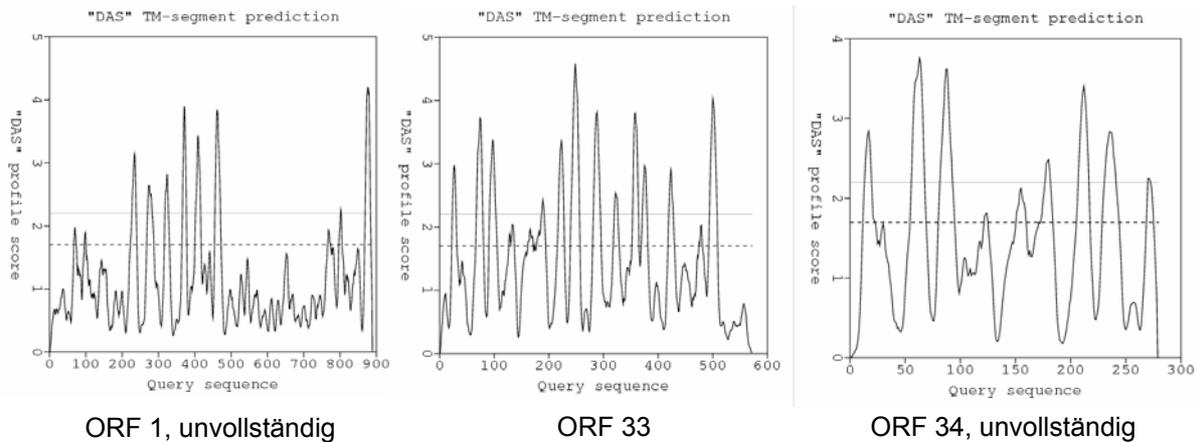


Abbildung 26 Nachweis von Transmembrandomänen der ORFs 1, 33 und 34. Die Zahl der Aminosäuren ist gegen den sog. „DAS profile score“ (Cserzo et al., 1997) aufgetragen. Übersteigt dieser „DAS profile score“ einen Schwellenwert (durchgezogene Linie), ist die Anwesenheit einer Transmembrandomäne in diesem Bereich sehr wahrscheinlich.

5.4.9 Sequenzierung und Annotation weiterer Fosmide

Neben der vollständigen Sequenzierung des Inserts von Fosmid Apae02-3K12 wurden auch Teilsequenzierungen der anderen drei Halogenase-tragenden Fosmide Apae02-26C24, Apae02-29G1 und Apae02-42I22 durchgeführt (AGOWA GmbH, Berlin). Ausgehend vom jeweiligen Halogenasegen wurde in beide Richtungen ein Bereich von insgesamt etwa 7kb analysiert. Die jeweilige Orientierung der gefundenen ORFs und deren Annotation ist in den Abbildungen 27 bis 29 und den Tabellen 19 bis 21 zusammengefasst.

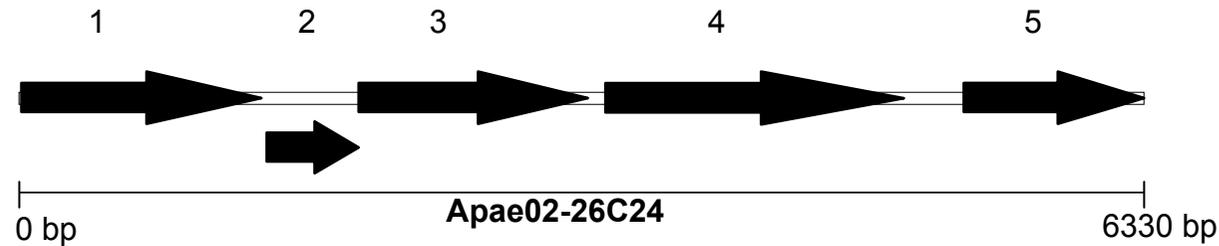


Abbildung 27 Schematische Darstellung der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-26C24. Die Nummerierung der einzelnen Gene entspricht Tabelle 19.

Tabelle 19 Annotation der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-26C24.

ORF	AS	Mögliche Funktion	Der erste „Blast Hit“ (Protein, „Accession“-Nummer, Herkunft)	Identitäts-, Ähnlichkeitswerte (%)	E-Wert	GC (%)	Lokus
1	445	Coproporphyrinogen III Oxidase	RB6485 (CAD74831) <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	52,68	2e-127	68,6	16-1350 (+)
2	168	unbekannt	RB5930 (CAD74515) <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	26,44	7e-06	68,2	1385-1888 (+)
3	456	Alkylhalidase	RB390 (CAD71555) <i>Rhodopirellula baltica</i> SH 1	41,58	2e-76	69,2	1786-3153 (+)
4	556	Coenzyme F390 Synthetase	hypothetisches Protein (CAE54293) <i>Thauera aromatica</i>	49,61	2e-93	72,5	3289-4956 (+)
5 ¹	>346	TRAP Transporter	BR1194 (AAN30113) <i>Brucella suis</i> 1330	31,51	5e-34	69,5	5294-6330 (+)

¹unvollständig

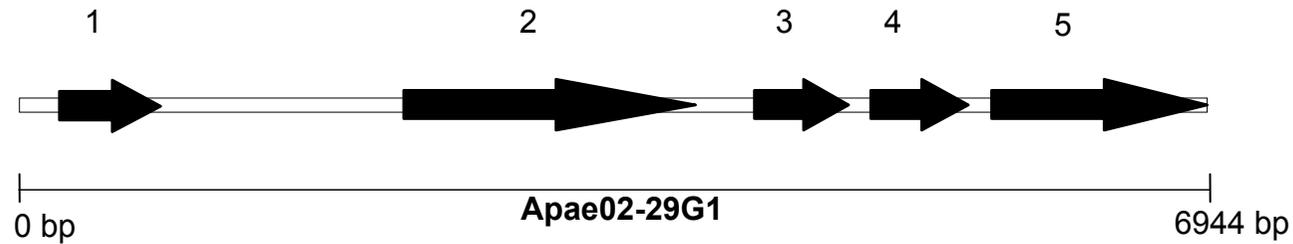


Abbildung 28 Schematische Darstellung der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-29G1. Die Nummerierung der einzelnen Gene entspricht Tabelle 20.

Tabelle 20 Annotation der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-29G1.

ORF	AS	Mögliche Funktion	Der erste „Blast Hit“ (Protein, „Accession“-Nummer, Herkunft)	Identitäts-, Ähnlichkeitswerte (%)	E-Wert	GC (%)	Lokus
1	145	unbekannt	unbekanntes Protein (EAD91849) Umweltsequenz	36,39	2e-07	63,0	156-590 (+)
2	567	Halogenase	Clohal (AAN65237) <i>Streptomyces. roseochromogenes subsp. oscitans</i>	40,57	5e-65	63,7	2195-3901 (+)
3	186	MOSC-Domänen Protein	AcidDRAFT_3710(ZP_00523287) <i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	32,51	8e-13	63,0	4234-4791 (+)
4	201	Histonacetyltransferase HPA2 und verwandte Acetyltransferasen	blr2886 (NP_769526) <i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110	43,65	1e-33	63,2	4926-5528 (+)
5 ¹	>431	Aminotransferase	SCO5655 (CAA19897) <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	39,58	1e-78	62,3	5653-6944 (+)

¹unvollständig

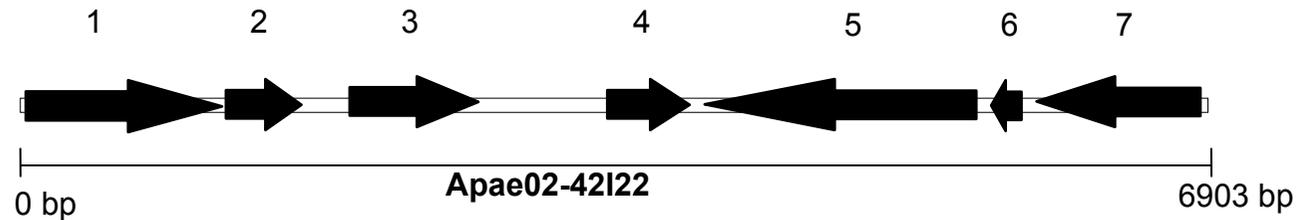


Abbildung 29 Schematische Darstellung der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-42122. Die Nummerierung der einzelnen Gene entspricht Tabelle 21.

Tabelle 21 Annotation der Halogenase und der umgebenden ORFs auf Fosmid Apae02-42122.

ORF	AS	Mögliche Funktion	Der erste „Blast Hit“ (Protein, „Accession“-Nummer, Herkunft)	Identitäts-Ähnlichkeitswerte (%)	E-Wert	GC (%)	Lokus
1	393	Histidindecaboxylase	Histidindecaboxylase (AAA25071) <i>Raoultella planticola</i>	48,69	2e-99	58,8	23-1201 (+)
2	131	Acetolactatesynthase, kleine Untereinheit	AF1672 (NP_070500) <i>Archaeoglobus fulgidus</i> DSM 4304	30,51	3e-12	58,5	1210-1602 (+)
3	230	Cytochrom c Assemblyprotein	NocaDRAFT_1550 (ZP_00658312) <i>Nocardioides</i> sp. JS614	42,57	8e-36	62,3	1912-2601 (+)
4	171	Cytochrom c-Typ Biogeneseprotein CcmE	DVU1051 (YP_010272) <i>Desulfovibrio vulgaris subsp. vulgaris str. Hildenborough</i>	36,53	4e-12	60,0	3429-3941 (+)
5	541	Halogenase	Halogenase (CAG15020) <i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	43,57	8e-75	65,9	3949-5571 (-)
6	67	Protein mit Zinkfinger	RmetDRAFT_0932 (ZP_00598092) <i>Ralstonia metallidurans</i> CH34	53,67	2e-10	58,7	5647-5847 (-)
7	314	Flavoprotein Alpha-Untereinheit	TTE0547(NP_622219) <i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4	41,61	7e-51	63,6	5928-6869 (-)

5.4.10 Heterologe Expression der Halogenase 42I22

Der Nachweis der heterologen Expression der Halogenase des Fosmids Apae002-42I22 in *E. coli* ist in Abbildung 30 dargestellt. Das Halogenasegen wurde dafür in den *E. coli* Expressionsvektor pQE30 kloniert und in *E. coli* M15(pREP4) exprimiert.

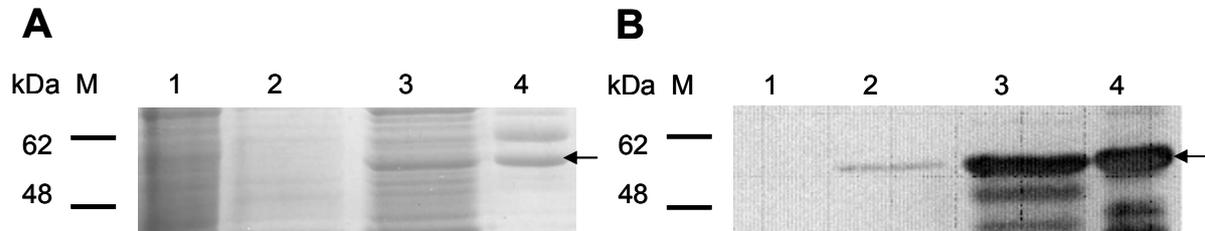


Abbildung 30 Nachweis der heterologen Expression der Halogenase 42I22 in *E. coli*. (A) Coomassie-gefärbtes Polyacrylamidgel; (B) Western-Blot mit HisTaq-Antikörpern; Spuren 1: *E. coli* Kontrolle ohne Expressionsvektor; Spuren 2: lösliche Proteinfraction nach nativer Lyse; Spuren 3: unlösliche Proteine nach nativer Lyse; Spuren 4: Aufreinigung der löslichen Proteine nach nativer Lyse mittels Ni-NTA-Agarose

Es zeigte sich, dass es bei Inkubationsbedingungen von 37°C über vier Stunden zu eine zufriedenstellenden Expression der Halogenase kam, dass das Protein jedoch intrazellulär in unlöslicher, und somit vermutlich inaktiver Form, abgelagert wurde. Durch eine Verringerung der Inkubationstemperatur auf 20°C und einer Verlängerung des Induktionszeitraums auf 12 Stunden konnte die Expression der Halogenase in teilweise löslicher Form erreicht werden. Das Protein konnte im Folgenden mittels des N-terminalen His-Tags über Ni-NTA-Agarose gereinigt und aufkonzentriert werden. Die Coomassiefärbung verschiedener Proteinfractionen ist in Abbildung 30 einer Westernblotanalyse mit His-Tag-spezifischen Antikörpern gegenübergestellt. In den mit 1 gekennzeichneten Spuren wurde jeweils ein Proteinextrakt aus Kontrollzellen aufgetragen, welche lediglich den Expressionsvektor trugen. Die Spuren 2 und 3 enthielten den löslichen und unlöslichen Teil der Proteine nach nativer Lyse von induzierten Zellen. In den Spuren 4 wurde das Eluat einer Ni-NTA-Agarosesäule aufgetragen, auf die der lösliche Anteil der Proteine nach nativer Lyse aufgetragen worden war. Wie die Westernblotanalyse (B) zeigte, konnte sowohl im löslichen, als auch im unlöslichen Anteil ein Protein der erwarteten Größe (58 kDa) nachgewiesen werden, welches durch die NTA-Agarose aufkonzentriert werden konnte (4).

6. Diskussion

6.1 Neue Verrucomicrobien aus Schwämmen

6.1.1 Schwämme als Quelle für Verrucomicrobien

Die erstmalige Beschreibung des Phylums *Verrucomicrobia* erfolgte im Jahr 1997 durch Hedlund und Mitarbeiter. Hugenholtz nahm 1998 eine Unterteilung in fünf sogenannte „Subdivisions“ (SD) vor. Zum heutigen Zeitpunkt (April 2006) sind in Reinkultur vorhandene Vertreter aus SD1 (*Verrucomicrobium spinosum* (Schlesner 1987), *Prostheco bacter* sp. (Staley et al., 1976), *Akkermansia muciniphila* (Derrien et al., 2004)), SD2 (*Chthoniobacter flavus* (Sangwan et al., 2004)), SD3 (Bakterium Ellin 5108 (Joseph et al., 2003)) und SD4 (*Opitutus* sp. (Chin et al., 2001), *Alterococcus agarolyticus* (Shieh und Jean, 1998), *Fucophilus fucoidanalyticus* (Sakai et al., 2003)) bekannt. *A. agarolyticus* wurde in der Originalarbeit fälschlicherweise den Proteobakterien zugerechnet (Sangwan et al., 2004). SD5 ist lediglich durch phylogenetische Untersuchungen von 16S-rRNA Genen aus der Umwelt bekannt (Dojka et al., 1998), ebenso wie die erst später beschriebene SD6, die nur durch eine 16S-rRNA Gensequenz repräsentiert ist (Vandekerckhove et al., 2000). Beschrieben, jedoch nicht in Reinkultur vorhandene Arten der *Verrucomicrobia* sind verschiedene *Xiphinematobacter* Arten als Endosymbionten von Nematoden der Gattung *Xiphinema* (Vandekerckhove et al., 2000) und sogenannte Epixenosomen, Ektosymbionten von marinen Ciliaten der Gattung *Euplotidium* (Petroni et al., 2000). Mehrere der näher beschriebenen Vertreter der *Verrucomicrobia* weisen interessante Besonderheiten auf. *V. spinosum*, nach dem das Phylum ursprünglich benannt wurde, kann pro Zelle mehrere Zellfortsätze, so genannte Prosthecae, besitzen (Abbildung 31, A). Die Epixenosomen (Abbildung 31, B) übernehmen für ihren Wirtsorganismus, einen Ciliaten, eine Schutzfunktion, indem sie eventuelle Fraßfeinde mit einer Harpunen-ähnlichen Struktur beschießen (Abbildung 31, C). Außerdem besitzen die Epixenosomen ein Protein das sensibel gegenüber Inhibitoren von Tubulin ist, das Tubulinantikörper bindet und das in stabilen tubulären Strukturen organisiert ist (Rosati et al., 1993; Petroni et al., 2000).

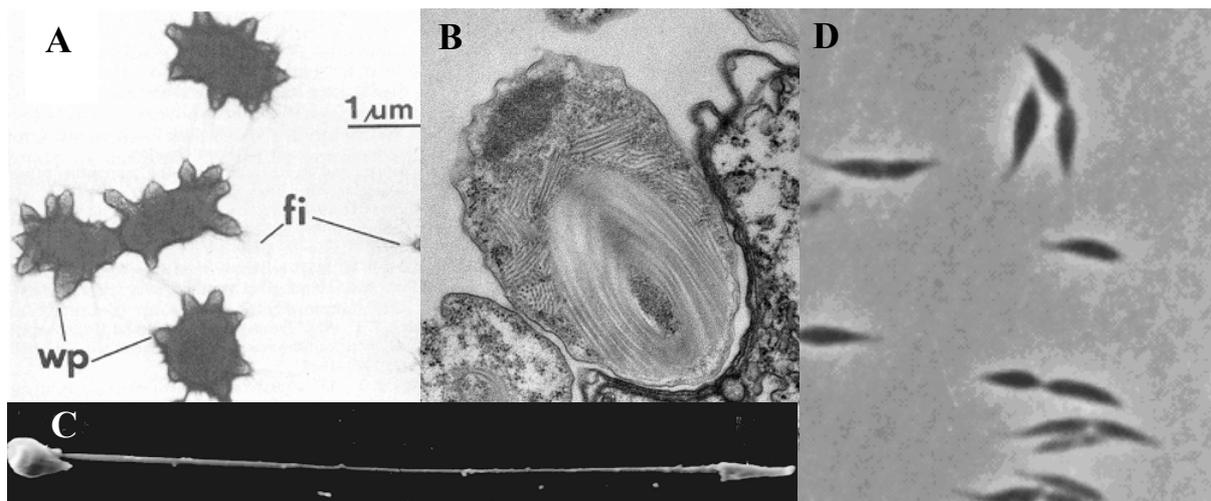


Abbildung 31 A: REM von *Verrucomicrobium spinosum*; B: TEM eines Dünnschnittes eines Epixenosoms; C: REM eines Epixenosoms nach Herausschleudern der „Harpune“; D: Phasenkontrastaufnahme von *Prosthecobacter dejongei* Zellen (Herkunft der Bilder: Schlesner et al., 2001; Petroni et al., 2000)

Interessanterweise konnten tubulinähnliche Gene in *Prosthecobacter* Arten identifiziert werden (Jenkins et al., 2002). Gegenwärtig (November 2005) ist dies das einzig bekannte Vorkommen solcher Gene in Prokaryoten. Eine weitere erwähnenswerte Tatsache in Bezug auf das Phylum *Verrucomicrobia* ist ihr scheinbar ubiquitäres Vorkommen. Schon die wenigen in Reinkultur vorhandenen Vertreter spiegeln dies wieder. Neben Frischwasserisolaten (*V. spinosum*, *Prosthecobacter* sp.), Bodenbakterien (*C. flavus*, *Opitutus* sp.) und marinen Vertretern (*F. fucoidanalyticus*, *A. agarolyticus*) gibt es offenbar auch Verrucomicrobien im menschlichen Darm (*A. muciniphila*). Vor allem jedoch mit Hilfe von Analysen von 16S-rRNA Gensequenzen aus Umweltproben konnte gezeigt werden, dass Verrucomicrobien praktisch überall zu finden sind und wenigstens in manchen Bodenproben auch einen recht großen Teil der mikrobiellen Gemeinschaft ausmachen können. Beispielsweise konnte für das nicht kultivierte Bakterium EA25 festgestellt werden, dass es in einer australischen Bodenprobe zwischen 1 und 10 % der Bakterien darstellt (Sangwan et al., 2004; Lee et al., 1996).

In einer Vielzahl phylogenetischer Studien über bakterielle Konsortien im marinen Habitat oder Habitat mit hoher Salzkonzentration konnten Beweise für die Anwesenheit von Verrucomicrobien erbracht werden. Sie konnten zum Beispiel in Sediment der Antarktis (Bowman et al., 2000; Bowman und McCuaig, 2003; Powell et al., 2003), assoziiert mit verschiedenen Tieren (Alain et al., 2002; Bowman und Nowak, 2004) und in marinem

Bakterioplankton (Bano und Hollibaugh, 2002; Harris et al., 2004; O'Sullivan et al., 2004) nachgewiesen werden. Wie schon erwähnt, sind die beiden marinen Isolate, *F. fucoidanolyticus* und *A. agarolyticus* „Subdivision“ 4 zuzuordnen. Viele der verrucomicrobiellen 16S-rRNA Gensequenzen aus dem marinen Habitat fallen jedoch in „Subdivision“ 1 und eine Reihe von ihnen bilden dort eine von *V. spinosum*, *Prostheco bacter* sp. und *A. muciniphila* abweichende Abstammungslinie. Vor Beginn der vorliegenden Arbeit war für diese kein Isolat in Reinkultur vorhanden.

Im Anschluss soll auf die Frage eingegangen werden, ob es sich bei dem Isolat *R. marina* möglicherweise um einen Schwammsymbionten handelt. In Folge der Anatomie und der Ernährungsweise von Schwämmen wird man hierbei vor ein Problem gestellt. Einerseits ernähren sich Schwämme von Mikroorganismen, die sie mit Hilfe eines verzweigten Kanalsystems aus dem Meerwasser filtern. Andererseits kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Mikroorganismen im Mesohyl von Schwämmen existieren, ohne als Nahrungsquelle verwendet zu werden. Die Frage, die bei jedem Schwamm-isolierten Bakterium stellt, ist die nach der Funktion. Handelt es sich bei der gefundenen Assoziation um eine Symbiose, bei der beide Partner voneinander profitieren, oder ist das Isolat ein Futterbakterium, welches aus dem umgebenden Meerwasser ausgefiltert wurde. In den letzten Jahren wurden wiederholt phylogenetische Analysen der mikrobiellen Konsortien mariner Schwämme vorgenommen. Dabei war es nicht möglich, verrucomicrobielle 16S-rRNA Gensequenzen in den Schwämmen *A. aerophoba*, *T. swinhoei*, *R. odorabile*, *H. panicea* oder *A. mexicana* nachzuweisen (Hentschel et al., 2003, 2006). Auch in *C. concentrica*, *K. varialosa*, *L. apicalis*, *H. balfourensis*, *M. acerata* und *S. antarcticus* (Taylor et al., 2005; Webster et al., 2004) konnten keine Verrucomicrobien identifiziert werden. In diesen Studien wurden allgemeine eubakterielle Oligonukleotide zur Amplifikation der 16S-rRNA Gene verwendet. Arten, die möglicherweise nur in einer sehr geringen Zahl im Schwamm vorhanden sind, können daher leicht unerkannt bleiben. In der vorliegenden Arbeit konnten verschiedene verrucomicrobielle 16S-rRNA Gensequenzen aus marinen Schwämmen unter Verwendung eines Verrucomicrobien-spezifischen Primers amplifiziert werden. Wie aber der phylogenetische Vergleich dieser Sequenzen mit anderen aus Meerwasser amplifizierten Sequenzen zeigte (Abbildung 9), existieren für fast alle Schwamm-spezifischen Phylotypen sehr nahe verwandte Meerwassersequenzen. Dies ist auch der Fall für die erstmals kultivierte Art *R. marina*, die somit als frei lebender mariner Organismus angesehen werden sollte, der zufällig in den Schwamm eingestrudelt worden war. Dies wird auch durch die Tatsache

unterstützt, dass eine Amplifikation des 16S-rRNA Gens von *R. marina* mit neu konzipierten Isolat-spezifischen Primern aus *A. polyoides* nicht möglich war.

Allerdings lässt sich eine Assoziation von bestimmten Verrucomicrobien mit dem Schwamm *A. conifera* nicht ausschließen. Drei der 16S-rRNA Gensequenzen aus *A. conifera* bilden eine eigene Untergruppe in SD3, für die keine verwandte Sequenz im Meerwasser gefunden werden konnte (Abbildung 9). Dass eine derartige Assoziation mit Vertretern des Phylums *Verrucomicrobia* prinzipiell möglich ist, zeigen zwei Beispiele aus der Symbioseforschung. Zum einen sind hier die Epixenosomen aus SD4 zu erwähnen, die Ektosymbionten einer marinen Ciliatenart darstellen (Rosati et al., 1993), zum anderen die Gattung „*Xiphinematobacter*“ aus SD2, welche obligate Endosymbionten in Nematoden der Gattung *Xiphinema* (Vandekerckhove et al., 2000) sind. Für eine letztlich verlässliche Aussage über die Assoziation von Verrucomicrobien mit marinen Schwämmen sind jedoch weiterführende Analysen notwendig. So sind z.B. FISH-Analysen mit spezifischen Sonden denkbar, mit denen die Anwesenheit von Verrucomicrobien in Schwämmen bewiesen und damit Hinweise auf eine Symbiose geliefert werden könnten.

6.1.2 Vergleich mit kultivierten Verrucomicrobien

Im Hinblick auf die zellulären Eigenschaften bekannter Verrucomicrobien fallen zunächst die unterschiedlichen Zellformen von *Rubritalea marina* auf. Das gleichzeitige Vorliegen von fast kokkoiden und stäbchenförmigen Zellen in Flüssigkultur (Abbildung 10, A) und auf Agar (Abbildung 10, F) ist ein selten beobachtetes Phänomen bei Bakterien. Im Fall von *R. marina* kann eine Mischkultur aus zwei unterschiedlichen Bakterien jedoch praktisch ausgeschlossen werden, da Analysen des 16S-rRNA Gens von Kulturen immer nur eine einzige Sequenz lieferten. Die Frage, ob Zellen von *R. marina* zum gleichen Entwicklungszeitpunkt morphologisch unterschiedlich vorliegen oder ob ihre Form von den Kultivierungsbedingungen, bzw. dem Alter der Kultur abhängig ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. In der Literatur ist das Auftreten unterschiedlicher bakterieller Morphotypen mehrfach beschrieben. So kann *Roseomonas lacus* gleichzeitig stäbchenförmig und kokkoid vorliegen (Jiang et al., 2006). Ein Übergang von einer stäbchen- in eine kokkoide Form zu einem bestimmten Entwicklungszeitpunkt durchläuft *H. pylori* bei Kultivierung *in vitro* (Enroth et al., 1999). Insofern wäre das gleichzeitige Auftreten von unterschiedlichen Morphotypen keine Ausnahme.

Beim Zellwandaufbau finden sich Gemeinsamkeiten von *R. marina* zu anderen Verrucomicrobien. Die Analyse der Peptidoglycanstruktur von *R. marina* ergab, dass direkte Querverbindungen vom Typ A1 γ meso-Dpm (Diaminopimelinsäure) vorliegen. Der gleiche Typ wurde bei *Chthoniobacter flavus* aus Subdivision 2 (SD2) (Sangwan et al., 2004) nachgewiesen. Auch in Arten der Gattung *Prostheco bacter* und in der Art *Verrucomicrobium spinosum* wurde M-Diaminopimelinsäure nachgewiesen (Hedlund et al., 1996; Schlesner et al., 2001). Weiterhin weist die Zusammensetzung der zellulären Fettsäuren von *R. marina* Gemeinsamkeiten mit *V. spinosum* (Sittig und Schlesner, 1993) und *C. flavus* (Sangwan et al., 2004) auf, insofern als alle drei große Mengen an Tetradecansäure (14:0) und Hexadecansäure (16:0) enthalten. Die Untersuchung der Chinone der Atmungskette ergab, dass *R. marina*, ebenso wie *V. spinosum* (Sittig und Schlesner, 1993), *C. flavus* (Sangwan et al., 2004) und den *Prostheco bacter* sp. (Hedlund et al., 1996) Menachinone enthält. *Prostheco bacter*-Arten enthalten jedoch zusätzlich auch Ubichinone.

Der GC-Gehalt von *R. marina* ist mit 50,9% niedrig im Vergleich zu den bisher untersuchten Verrucomicrobien (Tabelle 23), die den Bereich von 47,6 - 74% abdecken. Lediglich das Isolat *Akkermansia muciniphila* aus dem menschlichen Darm weist einen geringeren Wert von 47,6% auf. *Opitutus terrae* liegt mit einem Wert von 74% an der Obergrenze der GC-Gehalte von Prokaryoten, die zwischen 25-75% liegen (Bentley und Parkhill, 2004; Rocha und Danchin, 2002).

Das Spektrum an verwertbaren Kohlenstoffquellen von *R. marina* ist dem anderer kultivierter Verrucomicrobien ähnlich (Tabelle 22). Wachstum ist vor allem auf verschiedenen Zuckern möglich. Aminosäuren oder organischen Säuren (Sangwan et al., 2004), mit Ausnahme von Brenztraubensäure, können dagegen nicht verwertet werden. Es fällt jedoch auf, dass das von *R. marina* verwertbare Spektrum an Kohlenstoffquellen, im Vergleich mit anderen Arten, limitiert erscheint. Ein Unterschied dagegen besteht innerhalb der Verrucomicrobien in Bezug auf den Sauerstoffbedarf (Tabelle 23). *R. marina* ist, ebenso wie *Prostheco bacter* sp. und *C. flavus*, zu aerobem Wachstum fähig, während *V. spinosum* und *A. agarolyticus* sowohl mit als auch ohne Sauerstoff wachsen können. *O. terrae* und *A. muciniphila* besitzen dagegen einen obligat anaeroben Lebensstil.

6. Diskussion

Tabelle 22 Wachstum von *R. marina* nach Zugabe von verschiedenen Kohlenstoffquellen im Vergleich mit anderen Verrucomicrobien. (+) Wachstum, (-) kein Wachstum, (nd) nicht überprüft

Kohlenstoffquelle	<i>Rubritalea marina</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> ¹	<i>Opitutus terrae</i> ²	<i>Chthoniobacter flavus</i> ³	<i>Alterococcus agarolyticus</i> ⁴	<i>Prostheco bacter sp.</i> ⁵
Glukose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	-	+	+	+
Pektin	+	nd	+	+	nd	nd
Melibiose	+	+	+	nd	-	+
Galaktose	-	+	+	+	+	+
Fruktose	-	+	+	+	nd	+/-
Mannose	-	+	+	+	w	+
Galakturonsäure	-	nd	+	+	nd	nd
Mannitol	-	-	+	-	-	nd
Arabinose	-	-	+	-	-	+/-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+
Maltose	-	+	+	nd	nd	+
Saccharose	-	+	+	+	+	+
Laktose	+	+	+	+	+	+
Xylan	-	nd	+	+	nd	nd
Stärke	-	nd	+	+	nd	nd
Ribose	-	-	-	-	nd	+/-
Sorbose	-	nd	-	nd	nd	nd
Chitin	-	nd	-	-	nd	nd

Tabelle 22 Fortsetzung

Kohlenstoffquelle	<i>Rubritalea marina</i>	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	<i>Opitutus terrae</i>	<i>Chthoniobacter flavus</i>	<i>Alterococcus agarolyticus</i>	<i>Prostheco bacter sp.</i>
Brenztraubensäure	+	-	-	+	nd	nd
Malat	-	nd	-	-	nd	nd
Tartrat	-	nd	-	-	nd	nd
Citrat	-	nd	-	-	nd	nd
Glycerin	-	+	-	nd	nd	nd
Alanin	-	nd	-	-	nd	-
Leucin	-	nd	-	-	nd	-
Isoleucin	-	nd	-	nd	nd	-
Glutamat	-	-	-	-	nd	-
Prolin	-	-	-	nd	nd	-
Lysin	-	nd	-	-	nd	-
Ethanol	-	nd	nd	nd	nd	nd
Methanol	-	nd	nd	nd	nd	nd
Fucose	-	nd	nd	nd	nd	nd
Rhamnose	-	nd	nd	nd	nd	nd
Melibiose	-	nd	nd	nd	nd	nd
Glycin	-	nd	nd	nd	nd	nd

¹Schlesner, 1987; ²Chin et al., 2001; ³Sangwan et al., 2004; ⁴Shieh und Jean, 1998; ⁵Hedlund et al., 1997

Tabelle 23 Morphologische und physiologische Eigenschaften verschiedener Verrucomicrobien. Nach Schlesner et al., 2001, verändert.

Bakterium	Habitat	Morphologie	Farbe	Beweglichkeit	Sauerstoffbedarf	G+C (mol %)	Referenz
<i>R. marina</i>	Meerwasser	Stäbchen oder Kokken	rot	-	aerob	50,9	Scheuermayer et al., in Revision
<i>V. spinosum</i>	Süßwasser	Stäbchen mit mehreren Prothecae	leicht gelb	-	aerob und fermentativ	57,9-59,3	Schlesner, 1987
<i>Prostheco bacter</i>	Süßwasser	spindelförmig mit einem Prothecum	weiß, gelb	-	obligat aerob	54,0-60,0	Staley et al., 1976
<i>C. flavus</i>	Erde	Stäbchen	gelb	-	aerob	60,7	Sangwan et al., 2004
<i>A. agarolyticus</i>	Meer	Kokken	weiß	+	aerob und fermentativ	65,5-67,0	Shieh und Jean, 1998
<i>A. muciniphila</i>	Darm	oval		-	anaerob	47,6	Derrien et al., 2004
<i>O. terrae</i>	Erde	Kokken	farblos	+	obligat anaerob, fermentativ	74,0	Chin et al., 2001

6.1.3 Die Isolierung von Prodigiosin aus *Rubritalea marina*

Die rötliche Färbung von *R. marina* ist wahrscheinlich auf Substanzen aus der Klasse der Prodigiosine zurückzuführen (T. Gulder, persönliche Mitteilung) (Abbildung 13). Diese sind strukturell durch drei miteinander verknüpfte Pyrrolringe charakterisiert. Prodigiosine können verschiedene biologische Aktivitäten gegenüber Bakterien, Protozoen oder Pilzen besitzen (Fürstner, 2003). Neben Prodigiosinen aus γ -Proteobakterien wie *Serratia* (Harned, 1954), *Vibrio* (Shieh et al., 2003) und *Hahella* (Jeong et al., 2005) sind Prodigiosine auch aus verschiedenen Aktinobakterien, wie *Saccharopolyspora* (Liu et al., 2005), *Streptomyces* (Sevcikova und Kormanec, 2004) und *Micrococcus* (Pandey et al., 2003) bekannt. Lediglich ein nicht näher beschriebenes α -Proteobakterium wurde ebenfalls als Produzent eines Prodigiosins beschrieben (Lazaro et al., 2002). Der Nachweis dieser Substanzklasse in *R. marina* wäre daher das erste Beispiel für Prodigiosine aus Verrucomicrobien. Warum keine antibakteriellen Aktivitäten des Pigments im Verlauf dieser Arbeit nachgewiesen werden konnten, ist nicht vollständig geklärt. Zum einen ist denkbar, dass die betreffenden Substanzen in nur sehr geringer Konzentration in *R. marina* vorliegen, und daher die Nachweisgrenze für eine wachstumshemmende Wirkung nicht überschritten wurde. Zum anderen wäre auch vorstellbar, dass *R. marina* zur Bildung von Prodigiosin-Analoga fähig ist, die keine antibakterielle, möglicherweise aber cytotoxische Wirkung besitzen, die im verwendeten Assay nicht aufgefallen sind.

6.1.4 Ausblick

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt werden die Genome der meisten kultivierten Vertreter des Phylums *Verrucomicrobia* sequenziert. Der Fortlauf der Sequenzierung des Stammes *V. spinosum* DSM4136 (SD1) kann unter der Adresse <http://www.tigr.org/tdb/mdb/mdbinprogress.html> verfolgt werden. Auch das Genom von *P. dejongeii* FC1 (SD1) wird gegenwärtig entschlüsselt. Des Weiteren sind für das Jahr 2006 Genomsequenzierungen von fünf weiteren Verrucomicrobien, *A. muciniphila* (SD1), *C. flavus* (SD2), *O. terrae* (SD3), Bakterium Ellin514 (SD4) und einem nicht näher beschriebenen Vertreter aus SD4 geplant. Mit den hier vorgestellten Organismen sind sämtliche Untergruppen, die kultivierte Vertreter enthalten, abgedeckt. Ein Argument, welches für die Sequenzierung des Genoms von *R. marina* spricht, ist die Tatsache, dass keines der erwähnten Bakterien marinen Ursprungs ist. Ohne einen solchen marinen Vertreter muss die vergleichende Genomanalyse des Phylums *Verrucomicrobia* unvollständig bleiben, da auch das Meer, neben Frischwasser und dem menschlichen Darm ein von Verrucomicrobien besiedeltes Habitat darstellt. Die

Genomsequenzierung von *R. marina* kann hierbei wichtige Hinweise auf seine Anpassung an den marinen Lebensraum liefern. Mit dem vorliegendem Wissen zu den Wachstumsbedingungen und dem neu entwickelten Kulturmedium Ver100 besteht nun die Möglichkeit, weitere marine Verrucomicrobien zu isolieren. Diese Studien sollten sich nicht nur auf mikrobielle Konsortien mariner Schwämme beschränken, da eine permanente Assoziation eher unwahrscheinlich ist. Zukünftig sollte vor allem Meerwasser aber auch Sediment für die Isolierung weiterer mariner Verrucomicrobien herangezogen werden.

6.2 Isolierung und Screening von Streptomyceten aus marinen Schwämmen

6.2.1 Schwämme als Quelle für neue Streptomyceten

Actinomyceten, und im besonderen Vertreter der Gattung *Streptomyces*, stellen eine reichhaltige Quelle bioaktiver Naturstoffe dar. Beispielsweise wurden Substanzen mit antibiotischer (Erythromycin, Tetracyclin), Krebs-hemmender (Mitomycin, Daunomycin) und immunsuppressiver Wirkung (Rapamycin/ FK 506) aus Streptomyceten isoliert (Moore et al., 2005). Weiterhin ist die Gattung *Streptomyces* bemerkenswert, da mehr als ein Drittel der seit 1966 beschriebenen 670 marinen bakteriellen Metaboliten aus Streptomyceten stammt (Laatsch, 2006). Frühere phylogenetische Untersuchungen zeigten, dass eine Population an nicht näher beschriebenen Aktinobakterien in Schwämmen existiert (Hentschel et al., 2002; Montalvo et al., 2005). Die in dieser Arbeit isolierten Streptomyceten sind mit den Schwamm-spezifischen Aktinobakterienclustern jedoch nur entfernt verwandt. Daher kann die Frage ob die Streptomyceten als Symbionten von Schwämmen interpretiert werden können zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht zweifelsfrei beantwortet werden. Die Fähigkeit sämtlicher Isolate auf Hochsalzmedien und auf Niedrigsalzmedien zu wachsen (Abbildung 15) spricht aber eher gegen eine Symbiose von Streptomyceten mit Schwämmen. Ähnliche Beobachtungen in Bezug auf aus dem Meer isolierte Streptomyceten sind aus der Literatur bekannt, was Diskussionen über die wirkliche Präsenz dieser Gattung in den Meeren aufbrachte. So ging man 1984 noch davon aus, dass Streptomyceten Bodenbakterien sind und ins Meer als dormante Sporen eingewaschen wurden (Goodfellow und Haynes, 1984). Im Gegensatz hierzu jedoch berichten Moran und Mitarbeiter (1995), dass der Anteil der in einer Sedimentprobe eines Küstenabschnittes vorhandenen Streptomyceten 16S-rRNA 2 bis 5% der gesamten 16S-rRNA-Menge beträgt, die nicht aus Sporen stammte. Im Gegensatz hierzu unterstützt die phylogenetische „Clusterung“ mehrere Isolate (Hal012, Hal013 und Irc001) (Pol001 und Pol013) aus zum Teil verschiedenen Schwämmen die Annahme einer Symbiose zwischen diesen Bakterien und den Schwämmen. Um sich über diesen Punkt Klarheit zu verschaffen wäre es notwendig, nicht nur die entsprechenden Schwämme mittels streptomycetenspezifischer 16S-rDNA PCR oder FISH-Analysen zu untersuchen, sondern auch das diese Schwämme umgebende Meerwasser und Sediment, da die Bakterien ja durchaus marinen Ursprungs sein können, jedoch nur zufällig in die Schwämme eingestrudelt wurden.

Die Isolierung von Streptomycceten ergab eine überraschend hohe Anzahl an phylogenetisch neuartigen Isolaten. Neben den Bakterien aus marinen Schwämmen war es möglich, auch acht Streptomyccetenstämme aus Bodenproben zu kultivieren, die allerdings sehr ähnlich oder sogar identisch mit bereits bekannten Bakterien waren. Da Erde ein bereits sehr gut untersuchtes Habitat darstellt, werden neue Arten aus Boden nur noch selten kultiviert. Im Gegensatz hierzu scheint das Meer noch nicht ausgeschöpft zu sein. Schwämme können quasi als Hilfsmittel zur Aufkonzentrierung von Seewasser angesehen werden, die die Filtration von tausenden Litern Meerwasser ersparen. Insbesondere das Isolat Pol001, mit einer Sequenzhomologie von nur 97,6% zum nächsten beschriebenen Vertreter, ist in dieser Hinsicht sehr interessant. Auch die Isolate Pol013 (98,8%) und Hal001 (98,9%) stellen lohnende Ziele für zukünftige Forschungsprojekte dar.

Die Entscheidung, ob ein Streptomyccetenisolat eine neue Art darstellt, gestaltet sich schwierig. Die extrem hohe Zahl an Sekundärmetaboliten, die aus dieser Gattung gewonnen werden konnte, erweist sich als hinderlich, da die Entdeckung einer neuartigen Substanz in der Vergangenheit auch oft zum Anlass genommen wurde, eine eigene Art zu deklarieren (Kieser et al., 2000; Anderson und Wellington, 2001). Um abschätzen zu können, ob es sich bei einem Streptomycceten wirklich um eine neue Art handeln könnte, muss bedacht werden, dass mehrere Autoren Streptomycceten mit weniger als 98% Übereinstimmung in der Sequenz des 16S-rRNA Gens als zwei verschiedene Arten ansehen (Goodfellow et al., 1997; Lanoot et al., 2005). So sind z.B. die erst kürzlich beschriebene Streptomyccetenarten *S. ferralitis* (Saintpierre-Bonaccio et al., 2004), *S. koyangensis* (Lee et al., 2005), *S. jietaisiensis* (He et al., 2005), *S. sodiiphilus* (Li et al., 2005) oder *S. bangladeshensis* (Al-Bari et al., 2005) mit schon länger bekannten Streptomycceten nahe verwandt (>97% Sequenzhomologie). Weiterführende morphologische und biochemische Untersuchungen rechtfertigten jedoch die Einordnung dieser Stämme als neue Arten. Um das Isolat Pol001 als neue Streptomyccetenart zu etablieren wären zusätzliche Analysen, wie Bestimmung des Zellwandaufbaus, der Fettsäurezusammensetzung oder DNA-DNA Homologiestudien mit nahe verwandten Stämmen notwendig. Im Allgemeinen definieren DNA Homologien unter 70% zwei unterschiedliche Arten (Manfio et al., 2003; Wayne et al., 1987), jedoch kann dieser Wert im Falle von Streptomycceten auf 80% erhöht werden (Manfio et al., 2003; Labeda und Lyons, 1992; Labeda, 1993 und 1998). Auch die sogenannte „Curie-point pyrolysis mass spectrometry“, bei der die Bakterienzellen einer hohen Temperatur ausgesetzt werden und

nach thermaler Degradation ohne Sauerstoff mittels Massenspektrometrie analysiert werden, ist für die Beschreibung neuer Streptomyccetenarten von Nutzen (Sanglier et al., 1992).

6.2.2 Optimierung der Anzuchtbedingungen

Die Frage, ob sich aus dem marinen Lebensraum neuartige Wirkstoffproduzenten isolieren lassen, ist eindeutig als positiv zu bewerten. Die Wiederfindungsrate für bereits bekannte antimikrobielle Substanzen aus Bakterienkulturen wird mit weit mehr als 90% veranschlagt (Fenical et al., 1999; Zaehner und Fiedler, 1995). Allerdings existiert hierbei ein Unterschied darin, welches Habitat betrachtet wird. Während Fenical von einem Wert von 95% für Bakterien marinen Ursprungs ausgeht, liegt dieser Wert nach Zaehner und Fiedler bei Streptomycceten aus Boden bei 99,9%, woraus man eine 50fach größere Chance ableiten kann, im marinen Habitat neuartige Substanzen aufzuspüren. Der Meinung, dass die Entdeckungsrate neuer mariner Wirkstoffproduzenten höher im Vergleich zu ihren terrestrischen Verwandten ist, sind auch Salomon et al. (2004) und Bernan et al. (1997). Daher scheint der gewählte Ansatz zur Kultivierung von Streptomycceten aus marinen Schwämmen durchaus erfolgsversprechend.

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit traten Probleme bei der Identifizierung der antimikrobiellen Aktivitäten auf. Die ursprüngliche Vorgehensweise erfolgte wie in Abbildung 17 und Tabelle 13 dargestellt, durch Übersichtung mit verschiedenen Testorganismen auf Agar. Für die Extraktion der Substanzen wurden Flüssigkulturen angezogen und nach ausreichendem Wachstum bei 28 °C mit Ethylacetat extrahiert. Allerdings konnte auf diese Weise keine Substanz identifiziert werden, da die Extrakte nach Eindampfung des Lösungsmittels und Fraktionierung über HPLC keine antimikrobiellen Aktivitäten mehr zeigten. Daher wurde dazu übergegangen, die bakteriellen Isolate in großem Maßstab auf Agarmedien auszustreichen und, nach Sporulation der Stämme, die gesamte Biomasse mit Ethylacetat zu extrahieren. Es wurde so verfahren, da die Produktion von Sekundärmetaboliten in Streptomycceten oft erst mit Beginn der Sporulation einsetzt (Bibb, 2005). Den optimalen Zeitpunkt in einer Flüssigkultur zu erkennen, stellt sich problematisch dar, was vermutlich der Grund für den Verlust der antimikrobiellen Aktivitäten sein dürfte.

Es zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Produktion von antimikrobiell wirksamen Substanzen und dem verwendeten Agarmedium (Tabelle 13). Dabei war es nicht möglich, eine Mediumzusammensetzung zu ermitteln, die für alle Streptomyccetenstämme gleichermaßen geeignet war. Eine Abhängigkeit vom Anzuchtmedium ist zum Beispiel auch

für die Produktion des blauen Pigments Actinorhodin durch *S. lividans* bekannt, der diesen Farbstoff auf glukosehaltigem Medium nicht bildet. Überführt man den Stamm jedoch auf ein glycerinhaltiges Medium, wird Actinorhodin produziert (Kim et al., 2001). Etwas Ähnliches kann für das Isolats G004 beobachtet werden. Nur auf M1- und SMMS-Agar kam es hier zu starker Bildung eines rötlichen Pigments. Es ist durchaus möglich, dass weitere Isolate zur Bildung von Sekundärmetaboliten fähig sind, wenn die geeignete Nährstoffzusammensetzung oder der geeignete Testorganismus identifiziert werden könnte.

6.2.3 Wirkstoffe

Der Befund, dass die durch den Stamm Aer003 gebildete Fettsäuren Palmitinsäure und Docosansäure für dessen antimikrobielle Aktivität verantwortlich sein könnten, ist auf Grund des ubiquitären Vorkommens solcher Fettsäuren zunächst überraschend. Tatsächlich gibt es jedoch Untersuchungen, in denen die antimikrobielle Wirksamkeit von Fettsäuren, unter anderem Palmitinsäure, in recht hoher Konzentration, gegenüber Methicillin resistenten *S. aureus* Stämmen gezeigt werden konnte (Kitahara et al., 2004). Fraglich bleibt dennoch, ob die gefundenen Fettsäuren für die wachstumshemmende Wirkung des Stammes Aer003 gegenüber *S. aureus* verantwortlich sind. So wäre es denkbar, dass es in Folge der Extraktion und Aufarbeitung des Ethylacetatextrakts zu einer Zerstörung der ursprünglichen antimikrobiell wirksamen Substanz kam, und dass bei der anschließenden Überprüfung nur noch die ebenfalls vorhandenen Fettsäuren detektiert werden konnten und wurden im Anschluss strukturell untersucht. Als Alternative könnte es in Folge der Extraktion und Aufarbeitung des Ethylacetatextrakts zu einer Zerstörung der ursprünglichen antimikrobiell wirksamen Substanz gekommen sein. Dabei wurden die Fettsäuren von einem größeren Molekül, welches den eigentlichen Verursacher der antimikrobiellen Aktivität darstellt, abgespalten. Eine antimikrobiell aktive Substanz, welche eine Fettsäureseitenkette trägt, ist z.B. Teicoplanin (Kahne et al., 2005). Ob eine der beiden letztgenannten Möglichkeiten zutreffend ist, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht sagen. Sollte mit diesem Stamm weitergearbeitet werden, wären z.B. veränderte Extraktionsbedingungen mit anderen organischen Lösungsmitteln als dem verwendeten Ethylacetat empfehlenswert.

Aus einem Ethylacetatextrakt von Pol001 konnten vier verschiedene Fraktionen aufgereinigt werden, die eine wachstumshemmende Wirkung gegen *S. aureus* zeigten (Abbildung 19). Die Strukturen der vier Substanzen werden gegenwärtig von Tobias Gulder (AK Bringmann, Organische Chemie, Universität Würzburg) aufgeklärt. Aufgrund von NMR-Studien kann

jedoch ausgeschlossen werden, dass es sich um Fettsäuren handelt. Der Stamm Pol001 weist ein Biosynthesecoluster auf, welches für die Bildung einer, dem Vancomycin-ähnlichen, Substanz kodiert. Aus den NMR-Daten der gereinigten vier Substanzen lässt sich jedoch ebenfalls ableiten, dass keiner dieser Stoffe ein Vancomycinanalogon ist. Da ein Streptomyccetenstamm zur Bildung verschiedener Sekundärmetabolite befähigt sein kann, ist dies nicht überraschend. Aufgrund der Genomsequenzierungen der beiden Streptomycceten *S. coelicolor* und *S. avermitilis* ist bekannt, dass diese Stämme zwischen 20-30 Wirkstoffgenclustern tragen (Bentley et al., 2002; Ikeda et al., 2003). Diese Vielzahl an Substanzen wird jedoch nicht gleichzeitig oder unter allen Wachstumsbedingungen gleichermaßen gebildet. Daher sollten die Streptomyccetenisolate in Fermentationsstudien zukünftig weiter untersucht werden. Insbesondere die Optimierung der Kultivierungsbedingungen wäre ein lohnenswertes Unterfangen.

6.2.4 Ausblick

Der Stamm Pol001 und der nahe verwandte Stamm Pol013 sind für weiterführende Studien von Interesse. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie des 16S-rRNA Gens von Pol001 zu bereits bekannten Bakterien ist die Erstbeschreibung einer neuen Streptomyccetenart bei diesem Isolat sehr erfolgsversprechend. Da sowohl Pol001 als auch Pol013 aus *Axinella polypoides* isoliert werden konnten, bietet sich dieser mediterrane Schwamm für zusätzliche Experimente in Bezug auf mögliche schwammassoziierte Streptomycceten an.

Weiterhin geben die antimikrobielle Aktivität des Stammes Pol001 und erste Strukturaufklärungen Anlass zur Hoffnung auf neuartige chemische Verbindungen (T. Gulder, persönliche Mitteilung). Sollten sich diese nach Aufklärung ihrer Struktur weiterhin als interessant erweisen, sollten zusätzliche Aktivitätsstudien gegen verschiedene bakterielle Krankheitserreger und eukaryontische Parasiten durchgeführt werden. Dies könnte im Rahmen des Sonderforschungsbereichs 630: „Erkennung, Gewinnung und funktionale Analyse von Wirkstoffen gegen Infektionskrankheiten“ erfolgen.

6.3 Analyse des Glycopeptidbiosyntheseclusters aus *Streptomyces* sp. Pol001

Im Jahr 1999 waren mehr als 50 unterschiedliche Glycopeptide aus Bakterien bekannt (Nicolaou et al., 1999), von denen zwei, Vancomycin und Teicoplanin, klinisch eingesetzt werden (Kahne et al., 2005). Die jeweiligen Grundstrukturen dieser Substanzen sind in Abbildung 32 dargestellt. Glycopeptide bestehen aus sieben Aminosäuren, wobei Vancomycin fünf, Teicoplanin sieben aromatische Reste enthält. Alle aromatischen Aminosäuren werden während der jeweiligen Biosynthese zusätzlich zur Peptidbindung mit anderen aromatischen Aminosäuren quervernetzt. Im Vancomycin existieren drei, im Teicoplanin vier zusätzliche Verbindungen. Der Vancomycintyp wird durch die Aminosäureabfolge (1) Leucin (2) β -Hydroxytyrosin (3) Asparagin (4) 4-Hydroxyphenylglycin (5) 4-Hydroxyphenylglycin (6) β -Hydroxytyrosin (7) 3,5-Dihydroxyphenylglycin charakterisiert, wohingegen Teicoplanin die Sequenz (1) 4-Hydroxyphenylglycin (2) Tyrosin (3) 3,5-Dihydroxyphenylglycin (4) 4-Hydroxyphenylglycin (5) 4-Hydroxyphenylglycin (6) β -Hydroxytyrosin (7) 3,5-Dihydroxyphenylglycin aufweist (Kahne et al., 2005).

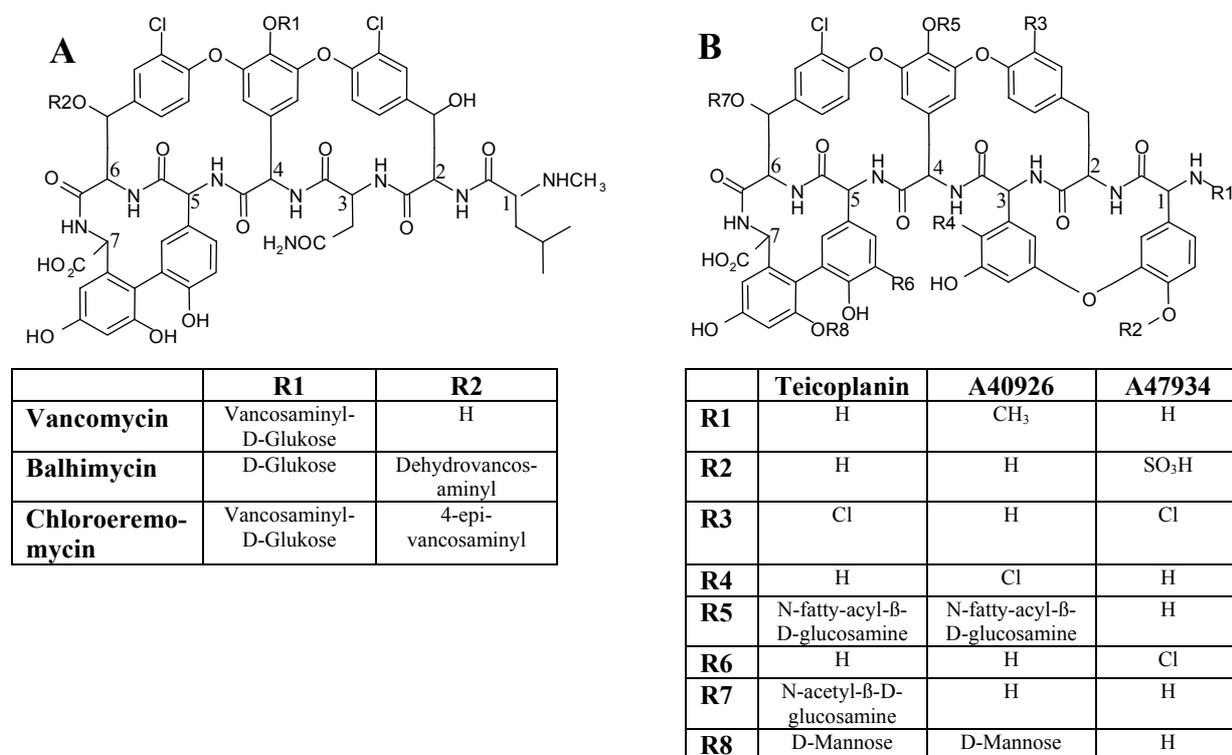


Abbildung 32 Schematische Darstellung der Strukturen von Glycopeptiden. (A) Vancomycin und Ähnliche, (B) Teicoplanin und Ähnliche. Nach Pelzer et al. (1999) und Puk et al. (2004), verändert.

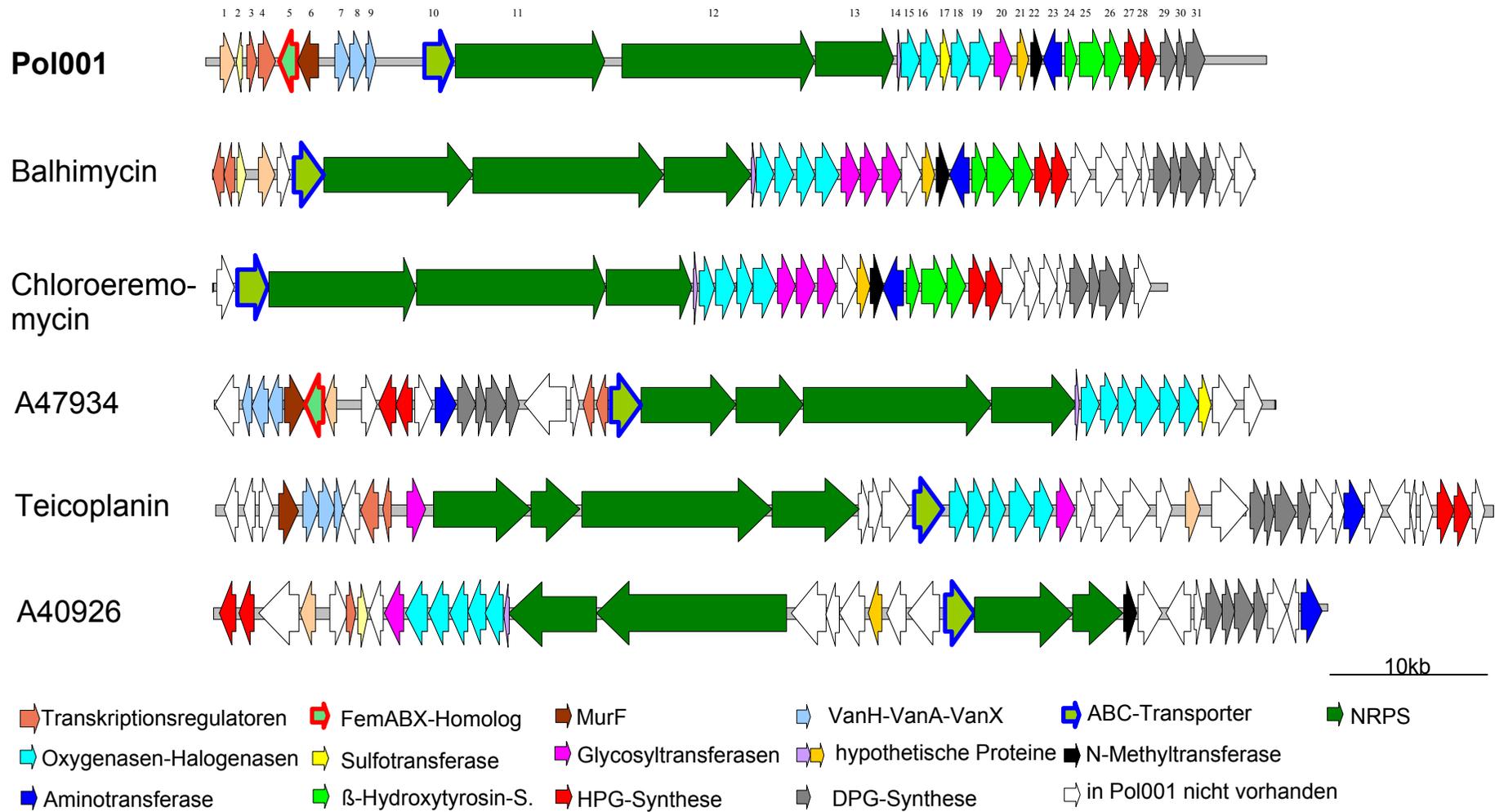


Abbildung 33 Vergleich verschiedener Glycopeptidbiosynthesecluster, nach Pelzer et al., (1999), Pootoolal et al., (2002), Sosio et al., (2003, 2004) und van Wageningen et al., (1998).

Ein Vergleich des neuen Glycopeptidbiosyntheseclusters aus dem Schwammisolat *Streptomyces* sp. Pol001 mit veröffentlichten Biosyntheseclustern ist in Abbildung 33 dargestellt. Die Orientierung der einzelnen Gene ist dem des Balhimycin-Typs am ähnlichsten. Auch der Vergleich aller kodierten Proteine auf Aminosäureebene (Tabelle 14) weist eine größere Ähnlichkeit zum Vancomycintyp (*A. orientalis* und *A. balhimycina*) als zum Teicoplanintyp (*A. teichomyceticus*, *S. toyocaensis*, *Nonomurea* sp ATCC 39727) auf. Im Folgenden wird auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen dem Pol001-Cluster und dem Vancomycintyp eingegangen.

6.3.1 Heptapeptidrückgrat

Glycopeptid-Grundgerüste enthalten neben proteinogenen Aminosäuren, wie Leucin, Asparagin oder Tyrosin, auch nicht proteinogene Aminosäuren, wie 4-Hydroxyphenylglycin, 3,5-Dihydroxyphenylglycin oder β -Hydroxytyrosin. Die Gene für deren Biosynthese sind in den jeweiligen Biosyntheseclustern kodiert. Eine schematische Darstellung der Biosynthese von 4-Hydroxyphenylglycin, für dessen Bildung die Proteine Pdh, HmaS, Hmo und Hpgt, verantwortlich sind, ist in Abbildung 34 gegeben. Die Prephenatdehydrogenase Pdh bildet aus Prephenat unter CO₂-Abspaltung 4-Hydroxyphenylpyruvat, welches wiederum durch HmaS zu 4-Hydroxymandelat umgesetzt wird. Durch die Oxidase Hmo kommt es zur Bildung von 4-Hydroxybenzoylformat aus welchem durch die pyridoxalphosphatabhängige Transaminase HpgT 4-Hydroxyphenylpyruvat gebildet wird. Die hierbei übertragene Aminogruppe stammt aus Tyrosin, welches dabei in 4-Hydroxyphenylpyruvat übergeht. Homologe zu den soeben besprochenen vier Enzymen lassen sich in allen bekannten Glycopeptidbiosyntheseclustern finden (Abbildung 33, rote und dunkelblauer Pfeil). Überraschenderweise konnte jedoch in dem Biosynthesecluster aus Pol001 kein ORF nachgewiesen werden, der für eine Prephenatdehydrogenase (Pdh) kodiert. Homologe zu Pdh sind normalerweise mit dem Shikimatstoffwechsel assoziiert (Li et al., 2004). Daher kommt es auch im Primärstoffwechsel zur Bildung von 4-Hydroxyphenylpyruvat, welches als Vorstufe für 4-Hydroxyphenylglycin verwendet werden könnte. Zusätzlich kommt es im Verlauf der Transaminierungsreaktion durch HpgT (Abbildung 34) ebenfalls zur Bildung von 4-Hydroxyphenylpyruvat, sodass die Bildung von 4-Hydroxyphenylglycin prinzipiell auch ohne ein im Biosynthesecluster kodiertes Pdh möglich sein sollte.

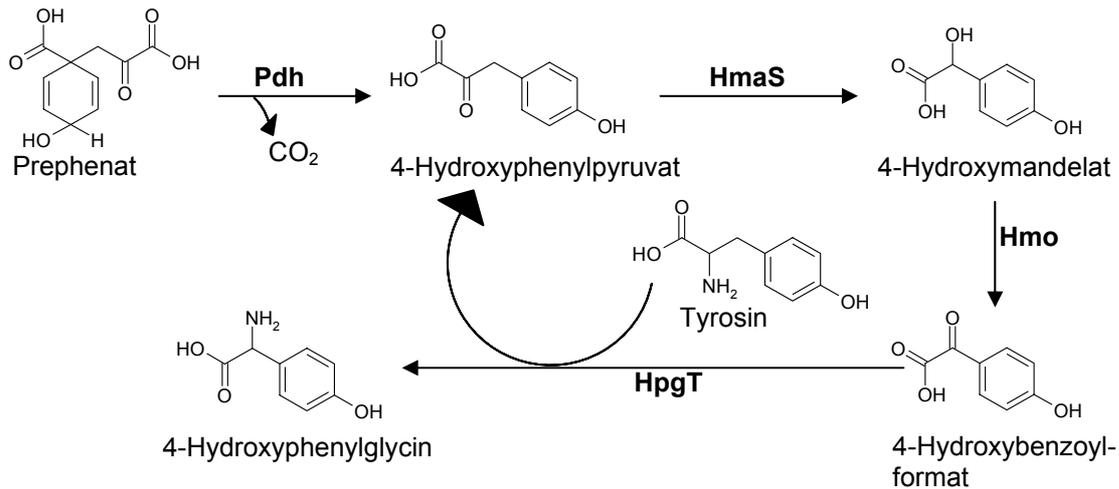


Abbildung 34 Biosynthese von 4-Hydroxyphenylglycin (Nach Li et al., 2004).

Die Bildung der nicht proteinogenen Aminosäure 3,5-Dihydroxyphenylglycin ist schematisch in Abbildung 35 gezeigt.

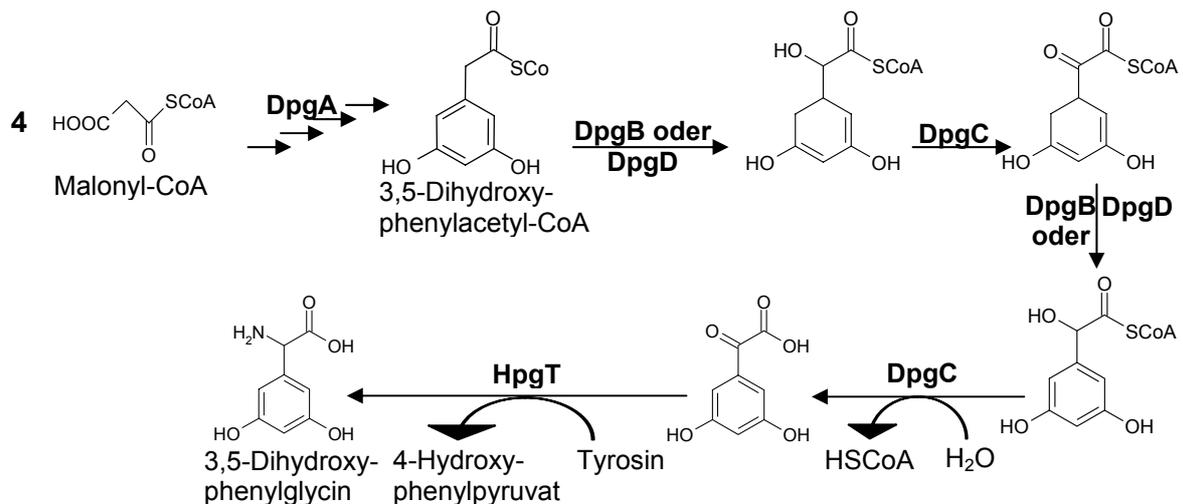


Abbildung 35 Biosynthese von 3,5-Dihydroxyphenylpyruvat (Nach Pfeifer et al., 2001).

Die Polyketidsynthase DpgA bildet aus vier Molekülen Malonyl-CoA ein Molekül 3,5-Dihydroxyphenylacetyl-CoA. Unklar ist, ob die folgende Einführung der Hydroxylgruppe an der α -Position des Moleküls durch DpgB oder DpgD erfolgt (Pfeifer et al., 2001). Die Oxidation dieser Hydroxylgruppe erfolgt wahrscheinlich durch eine Dehydrogenaseaktivität von DpgC, worauf es wiederum entweder durch DpgB oder DpgD zur Wiederherstellung der aromatischen Ringstruktur kommt. Die dabei erneut gebildete Hydroxylgruppe an der α -Position wird erneut durch DpgC oxidiert und anschließend transaminiert. Diese Transaminierung wird sehr wahrscheinlich durch die gleiche Aminotransferase durchgeführt,

die bei der Biosynthese von 4-Hydroxyphenylpyruvat (Abbildung 34) eine Rolle spielt. Das dabei aus Tyrosin gebildete 4-Hydroxyphenylpyruvat (Pfeifer et al., 2001) kann als Edukt für die Bildung von 4-Hydroxyphenylglycin eingesetzt werden, was die Abwesenheit von pdh im Biosynthesecluster aus Pol001 abpuffern könnte. Die 3,5-Dihydroxyphenylglycinbiosynthese-Gene kommen in allen bekannten Glycopeptidbiosyntheseclustern vor (Abbildung 33, graue und dunkelblauer Pfeil). Ein Homolog des Gens *dpgD* fehlt im Biosynthesecluster von Pol001, was die Frage nach der Funktionalität dieses Clusters aufwirft. Die Funktion der einzelnen *dpg*-Gene aus *A. balhimycina* wurde in der Doktorarbeit von Pfeifer (2002) genauer untersucht. Aus den dabei durchgeführten Überexpressionsstudien wurde geschlossen, dass sowohl *DpgB*, als auch *DpgD* Hilfsfunktionen erfüllen, und die 3,5-Dihydroxyphenylglycinsynthese daher wahrscheinlich auch ohne *DpgD* ablaufen kann (persönliche Mitteilung, Claudia Kittel, AK Wohlleben, Universität Tübingen).

Für die Bildung von β -Hydroxytyrosin sind zwei unterschiedliche Wege bekannt. Bei den Substanzen Chloroeremomycin und Balhimycin konnten die Gene *bhp* (kodiert für eine Hydrolase), *bpsD* (kodiert für eine NRPS) und *oxyD* (kodiert für eine Oxygenase) identifiziert werden. Dabei wird ein Mechanismus diskutiert, welcher von einer Bindung eines Tyrosins an das Protein *BpsD* ausgeht. Dieses gebundene Tyrosin wird von *OxyD* hydroxyliert und das entstandene Hydroxytyrosin durch *Bhp* freigesetzt (Puk et al., 2004). Im Gegensatz dazu erfolgt die Bildung von β -Hydroxytyrosin bei der Biosynthese von Teicoplanin, Substanz A40926 und Substanz A47934 durch die Aktivität nur einer „non-heme iron“ Dioxygenase. Im Biosynthesecluster von Pol001 konnten Homologe zu den drei Proteinen *Bhp*, *BpsD* und *OxyD* aus dem Balhimycin- und dem Chloroeremomycinbiosynthesecluster nachgewiesen werden (Abbildung 33, hellgrüne Pfeile).

Aus der Anwesenheit dieser Gene folgt, dass diese drei nicht proteinogenen Aminosäuren Bestandteil des Heptapeptidrückgrats des durch Stamm Pol001 gebildeten Glycopeptids sind. Zusätzliche Beweise hierfür lieferte die Analyse der sieben Adenylierungsdomänen der NRPS-Systeme. Der Einbau von 4-Hydroxyphenylglycin an Position 4 ist ebenso wahrscheinlich wie der von 3,5-Dihydroxyphenylglycin an Position 7. Auch der Einbau von β -Hydroxytyrosin an Position 6 wird durch diese Analysen stark gestützt. Alle drei nichtproteinogenen Aminosäuren werden an den jeweiligen Positionen sowohl mithilfe der Methode von Stachelhaus (1999) als auch der von Rausch (2005) vorhergesagt. Ob ein Tyrosin- oder aber ein β -Hydroxytyrosinrest an Position 2 des Heptapeptids eingebaut wird,

ist unsicher. Unstrittig ist, dass es sich um einen aromatischen Aminosäurerest handeln muss. Die Positionen 1 und 3 des Heptapeptids sind weniger eindeutig zu benennen. Adenylierungsdomäne 1 zeigte in Bezug auf die Bindungstasche (Tabelle 15) (Stachelhaus et al., 1999) keine ausreichend große Homologie ($\geq 70\%$) zu anderen NRP-Synthetasen. Die Methode von Rausch und Mitarbeitern (2005) liefert jedoch eine Aussage zu dieser Domäne (Tabelle 16) insofern als es hier zum Einbau einer aliphatischen Aminosäure kommt, was wiederum die Ähnlichkeit zum Vancomycin erhöht, welches an dieser Position ein Leucin besitzen. Glycopeptide vom Teicoplanintyp enthalten an dieser Stelle eine aromatische Aminosäure. Unklar ist ebenfalls Position 3 des Heptapeptids. Für die Bindungstasche nach Stachelhaus (1999) konnte lediglich ein Wert von 70% Homologie zu einer Adenylierungsdomäne mit Spezifität für Alanin ausgemacht werden, während die Berechnungsmethode von Rausch und Mitarbeitern (2005) hier keinerlei Erkenntnisse lieferte. Auf Grund dieser geringen Homologie lässt sich die Aminosäure an Position 3 nur begrenzt voraussagen.

6.3.2 Quervernetzungen

Glycopeptide vom Vancomycintyp enthalten drei Quervernetzungen zwischen ihren aromatischen Aminosäuren 2 und 4, 4 und 6 und 5 und 7. Glycopeptide vom Teicoplanintyp dagegen enthalten eine zusätzliche Quervernetzung zwischen den aromatischen Aminosäuren 1 und 3. Verantwortlich für die Knüpfung dieser Vernetzungen sind verschiedene Oxygenasen, die in sämtlichen Glycopeptidbiosyntheseclustern vorkommen. Die Biosynthesecluster für Balhimycin und Chloroeremomycin enthalten jeweils drei Gene für Oxygenasen, die Biosynthesecluster von Teicoplanin, Substanz A40926 und Substanz A47934 deren vier. Im Biosynthesecluster von Stamm Pol001 konnten drei homologe Gene lokalisiert werden, die Ähnlichkeiten mit Oxygenasen zeigen, die für die Knüpfung der Verbindungen zwischen den Resten 2 und 4, 4 und 6 und 5 und 7 verantwortlich sind. Dies kann als ein weiterer Hinweis auf eine Substanz vom Vancomycin- und nicht vom Teicoplanintyp angesehen werden.

6.3.3 Glycosylierungsmuster

Lediglich das Gen für ein homologes Protein von BgtfB aus *A. balhimycina* konnte im Biosynthesecluster aus Pol001 identifiziert werden. Während im Balhimycingencluster drei verschiedenen Glycosyltransferasen vorliegen, konnte im Pol001 Biosynthesecluster lediglich ein solches Gen identifiziert werden. Die Tatsache, dass Balhimycin selbst nur zwei

Glycosylierungen besitzt wird damit erklärt, dass der Produzent verschiedene andere Balhimycine in geringen Mengen bildet, die teilweise drei Glycosylierungen aufweisen. BgtfB scheint im Balhimycingencluster für die Übertragung eines Glukoserestes auf 4-Hydroxyphenylglycin (AS 4) (Abbildung 32) verantwortlich zu sein (Pelzer et al., 1999). Im Gencluster von Pol001 könnte das homologe Enzym die gleiche Funktion übernehmen. Es konnten keine homologen Proteine zu den Glycosyltransferasen BgtfA und BgtfC aus *A. balhimycina* identifiziert werden. Zusätzlich fehlen sämtliche Homologe zu den Genen *dvaA*, *dvaB*, *dvaC*, *dvaD* und *dvaE*, die im Balhimycingencluster für die Biosynthese des zweiten Zuckers, Dehydrovancosamin, verantwortlich sind. Zwischen dem Homolog zu *bgtfB* und ORF19 (hypothetisches Protein) existiert in Pol001 jedoch ein etwa 100 bp langer Bereich, der auf Aminosäureebene *DvaC* ähnelt. Auf Grund dieser Fakten wird geschlossen, dass das Pol001-Glycopeptid lediglich einen Glukoserest an Aminosäureposition 4 des Heptapeptidrückgrats trägt.

6.3.4 Weitere Modifizierungen

Der Nachweis des Glycopeptidbiosyntheseclusters in Pol001 war durch die Präsenz einer FADH₂-abhängigen Halogenase möglich, die mit Hilfe von PCR und degenerierten Primern identifiziert werden konnte. Homologe dieses Enzyms existieren in allen heute bekannten Glycopeptidgenclustern. Balhimycin enthält jeweils eine Chlorierung an den aromatischen Ringen der Aminosäuren 2 und 6. In wieweit die Halogenase aus Pol001 für ein ähnliches Chlorierungsmuster verantwortlich ist, lässt sich aus dem Vergleich der Aminosäuresequenzen nicht ableiten.

Es konnten zwei weitere ORFs identifiziert werden, deren Homologe Modifikationen an Heptapeptidrückgraten von verschiedenen Glycopeptiden vornehmen. Dabei handelt es sich um ein Homolog einer N-Methyltransferase, die bei der Biosynthese von Balhimycin und von A40926 eine Methylgruppe auf die Aminogruppe der Aminosäure an Position 1, Leucin oder 4-Hydroxyphenylglycin, überträgt. Zudem konnte ein Sulfotransferasegen gefunden werden. Ein homologes Gen gibt es lediglich im Biosynthesecluster von A47934, wo das korrespondierende Enzym für die Übertragung einer Sulfatgruppe auf die Aminosäure an Position 1, 4-Hydroxyphenylglycin, verantwortlich ist. Welche Position des vorhergesagten Glycopeptids durch die Sulfotransferase aus Pol001 sulfatiert wird, kann gegenwärtig nicht gesagt werden, da mehrere freie Hydroxygruppen in Frage kommen. Nicolaou und Mitarbeiter (1999) geben lediglich drei verschiedenen Glycopeptide an, die Schwefel als

Bestandteil aufweisen. Dies sind A47934 mit der oben erwähnten Sulfatgruppe an Aminosäure 1, UK68597 mit einer Sulfatgruppe an Aminosäure 7 und die Symnonicine A, B und C, die Methionin als Aminosäure an Position 3 besitzen. Da die Symnonicine also keine Sulfatgruppe besitzen und UK68597 von der Struktur her dem Teicoplanintyp zuzuordnen ist, stellt das vorhergesagte Glycopeptid aus Stamm Pol001 die erste sulfatierte Substanz des Vancomycintyps dar.

6.3.5 Resistenzgene

Glycopeptide binden bei der Zellwandbiosynthese an den C-terminalen D-Alanyl-D-Alanin (D-Ala-D-Ala) Rest von Peptidoglycanvorläufern. Enzyme, wie Transglycosylasen und Transpeptidasen, können dann an diesen Vorläufer nicht mehr binden und die Zellwandsynthese bleibt unvollständig. In den fünf bekannten Glycopeptidbiosyntheseclustern konnten zwei unterschiedliche Resistenzmechanismen gegen die jeweils gebildeten Substanzen ausgemacht werden. Im Balhimycingencluster und im Gencluster der Substanz A47934 existieren Homologe zu VanY-Carboxypeptidasen, die für die Entfernung der terminalen Alaninreste von dem sich bildenden Peptidoglycan verantwortlich sind, was wiederum die Möglichkeit der Bindung der Glycopeptide herabsetzt. Die Biosynthesecluster von Teicoplanin und Substanz A40926 dagegen tragen Determinanten für einen komplizierteren Resistenzmechanismus, der aus den Proteinen VanH, VanA und VanX besteht. VanH ist eine Dehydrogenase, die Pyruvat zu D-Lactat umsetzt. VanA fungiert als Ligase, die D-Alanin und D-Lactat zum Dipeptid D-Ala-D-Lac verknüpft. VanX schließlich hydrolysiert Dipeptide der Form D-Ala-D-Ala, die aus der normalen Zellwandsynthese stammen (Serina et al., 2004). Ein Homolog zum Protein MurF aus den Biosyntheseclustern von Teicoplanin und Substanz 40926, welches bei der normalen Zellwandsynthese für die Übertragung des Dipeptids D-Ala-D-Ala auf den Peptidoglycanvorläufer verantwortlich ist, übernimmt diese Funktion für das Dipeptid D-Ala-D-Lac. Glycopeptide können an so veränderte Peptidoglycanvorläufer in nur sehr abgeschwächter Form binden. Die Steuerung der Expression dieser Resistenzgene übernimmt ein Zwei-Komponenten System, welches aus den Proteinen VanRst und VanSst besteht. Das Biosynthesecluster aus Pol001 enthält sowohl ein homologes Gen der Carboxypeptidase VanY, als auch homologe Gene zu vanX, vanA, vanH und murF und den Transkriptionsregulatoren VanRst und VanSst. Die Frage, ob die Anwesenheit beider Gruppen von Resistenzgenen im Cluster von Pol001 eine Besonderheit darstellt, oder ob eine ähnliche Zusammensetzung auch bei anderen Glycopeptidbiosynthesen

vorhanden ist, die jeweiligen Resistenzgene aber außerhalb des publizierten Sequenzbereichs liegen, kann anhand der vorliegenden Daten nicht beantwortet werden.

6.3.6 Strukturvorschlag

Es ist nunmehr möglich, eine Struktur für das durch Stamm Pol001 gebildete Glycopeptid vorherzusagen. Bei dieser Substanz würde es sich um das erste Glycopeptid vom Vancomycin-Typ handeln, welches eine Sulfatgruppe als Substituent tragen würde. Durch das Wissen um das analysierte Biosynthesecluster, kann nun gezielt nach einer derartigen Substanz in Fermentationsbrühen des Stammes Pol001 gesucht werden.

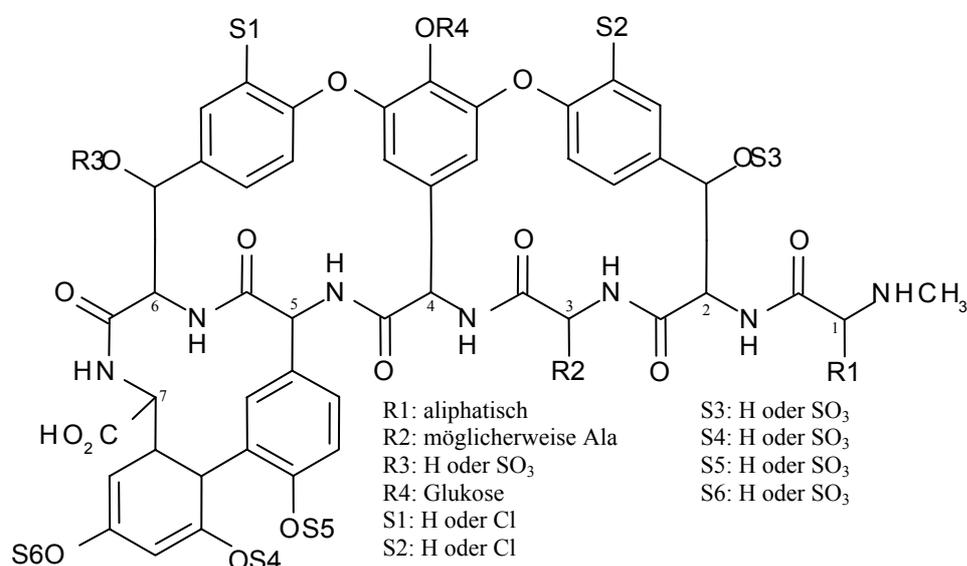


Abbildung 36 Voraussichtliche Struktur des Glycopeptids aus Pol001. Die Aminosäurereste des Heptapeptidrückgrats sind durch Ziffern von 1 bis 7 gekennzeichnet.

6.3.7 Ausblick

Bei der Suche nach dem vorhergesagten Glycopeptid kann versucht werden, die Anzuchtmedien mit Vorstufen der Substanz zu versetzen. Vor allem die nicht proteinogenen Aminosäuren 4-Hydroxytyrosin und 3,5-Dihydroxyphenylglycin sollten hierbei in Betracht gezogen werden. Im Pol001-Biosynthesecluster fehlt jeweils ein Gen für die Bildung dieser Vorstufen, die in allen anderen Glycopeptidbiosyntheseclustern vorhanden sind, was nicht bedeuten muss, dass eine Bildung des Glycopeptids unmöglich ist. Es könnten sich jedoch Auswirkungen auf die Geschwindigkeit, und somit die Produktmenge ergeben. Parallel zu solchen Fermentationsstudien scheint es ratsam, die Transkription des Biosyntheseclusters unter verschiedenen Wachstumsbedingungen zu untersuchen, da ein Nachweis der mRNA mit weniger Aufwand verbunden wäre als die Suche nach dem Glycopeptid mittels HPLC. Auch

die Möglichkeit von kombinatorischen Biosynthesen sollten in Betracht gezogen werden. Solche Studien können in Kooperation mit Prof. W. Wohlleben (Universität Tübingen) erfolgen, dessen Arbeitsgruppe über eine Sammlung von verschiedenen Mutanten des Balhimycin-Produzenten *A. balhimycina* verfügt. Vor allem der Einbau des Sulfotransferasegens aus Stamm Pol001 in das Biosynthesecluster von Balhimycin und die Aussicht eines sulfatierten Balhimycinanalogons scheint hier verfolgenswert.

6.4 Mikrobielle FADH₂-abhängige Halogenasen aus marinen Schwämmen

Gegenwärtig sind mehr als 3500 von Lebewesen produzierte halogenierte Substanzen bekannt (van Pée und Unversucht, 2003). Viele dieser Metabolite besitzen antibiotische Wirkungen. Im Vergleich zu nicht halogenierten Analoga hat sich ein Einfluss der Halogenierung, verstärkender oder abschwächender Art, auf die biologische Aktivität gezeigt (van Pée und Ligon, 2000). Es stellt sich daher die Frage, welche Enzyme für den Einbau der jeweiligen Halogene verantwortlich sind. Haloperoxidasen wurden lange Zeit als diese Enzyme angesehen. Wie schon aus ihrem Namen abzuleiten, benötigen diese Proteine Wasserstoffperoxid und Halidionen (Cl⁻, Br⁻ oder I⁻) für den Reaktionsmechanismus. Dieselben Substrate benötigen so genannte Perhydrolasen, die ebenfalls als für Halogenierungen verantwortliche Enzyme diskutiert werden. Beide besitzen jedoch weder Substratspezifität noch Regioselektivität, weshalb es unwahrscheinlich erscheint, dass sie in der Biosynthese von Sekundärmetaboliten eine Rolle spielen (van Pée und Unversucht, 2003). Dagegen besitzt die erst vor 10 Jahren entdeckte Enzymklasse der FADH₂-abhängigen Halogenasen genau diese Eigenschaften. Zusätzlich konnten FADH₂-abhängige Halogenasen wiederholt in Biosyntheseclustern halogenerter Sekundärmetabolite aus Bakterien identifiziert werden. Einen ersten Hinweis hierfür erbrachte die Sequenzierung der für die 7-Chlortetrazyklinbildung notwendigen Gene (Dairi et al., 1995). Seitdem war es möglich, Homologe zu diesem Gen beispielsweise in den Biosyntheseclustern von Pyoluteorin (Nowak-Thompson et al, 1999), Complestatin (Chiu et al, 2001), Rebeccamycin (Sánchez et al, 2002), Clorobiocin (Pojer et al, 2002), Ansamitocin (Yu et al, 2002), Balhimycin (Pelzer et al, 1999), Substanz A47934 (Pootoolal et al, 2002) und den Anabaenopeptiliden (Rouhiainen et al, 2000) zu identifizieren. Einige Substanzen, an deren Biosynthese FADH₂-abhängige Halogenasen beteiligt sind, sind in Abbildung 37 dargestellt. Laut van Pée (2001) ergab der Vergleich der Aminosäuresequenzen verschiedener FADH₂-abhängiger Halogenasen, dass

diese sich, gemäß ihres zu halogenierenden Substrats, in zwei Gruppen einteilen lassen: eine von ihnen führt Halogenierungen von Tryptophan- oder Indolderivaten durch, wie z. B. bei den Substanzen Rebeccamycin oder dem Sechsringsystem von Pyrrolnitrin (Abbildung 37), der andere Typ ist für die Halogenierung von Phenol- oder Pyrrolderivaten verantwortlich, wie z. B. bei den Metaboliten Pyoluteorin, Balhimycin oder dem Fünfringsystem von Pyrrolnitrin (Abbildung 37). Interessanterweise kommen im nur vier Gene umfassenden Biosynthesecluster von Pyrrolnitrin beide Gruppen mit jeweils einem Exemplar vor.

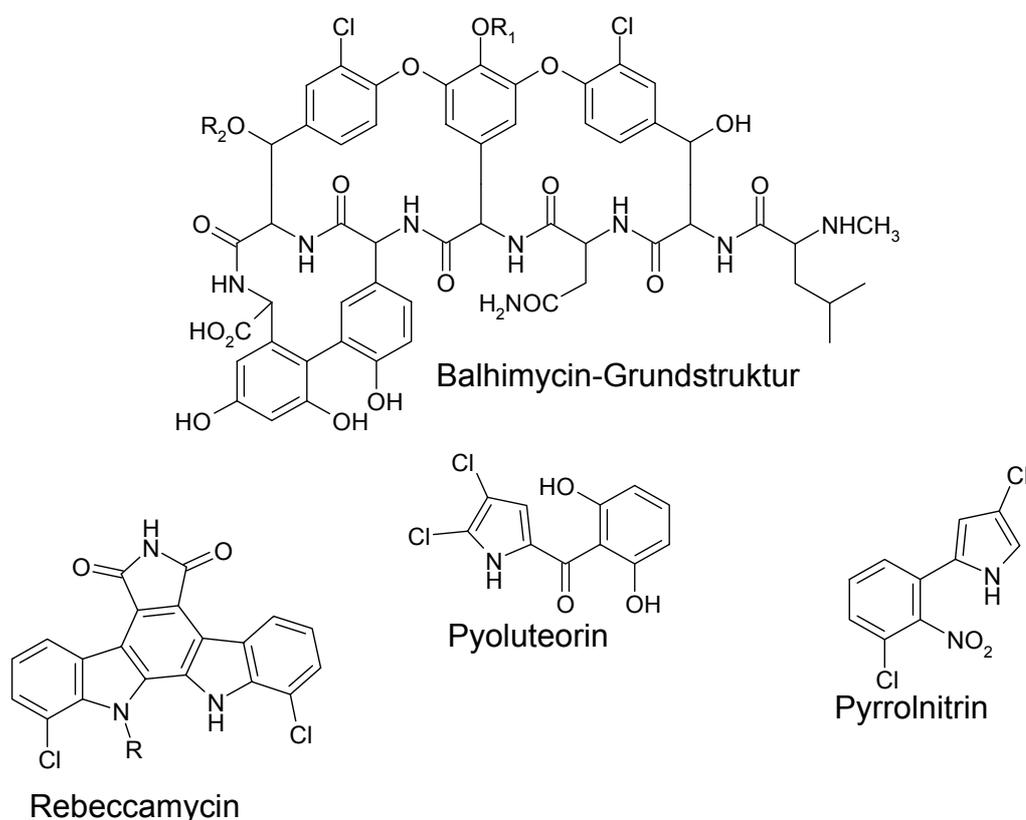


Abbildung 37 Strukturformeln verschiedener halogener Sekundärmetabolite bakteriellen Ursprungs (nach van Pée, 2001 und Hammer et al., 1997, verändert).

6.4.1 Biotechnologisches Potential

Prinzipiell stellen neuartige Halogenasen ein viel versprechendes Werkzeug für die Synthese halogener organischer Moleküle dar. Aufgrund ihrer Substrat- und ihrer Regioselektivität ist ihr Einsatz bei der Produktion von schwer synthetisierbaren Substanzen denkbar (van Pee und Holzer, 1999; van Pée und Unversucht, 2003). Jedoch ist bis zum jetzigen Zeitpunkt (April 2006) lediglich für vier Halogenasen, deren Substrat bekannt war, ein *in vitro* Funktionsbeweis mit aufgereinigtem Protein gelungen. Bei den in dieser Arbeit gefundenen

putativen Halogenasen ist das Substrat jedoch nicht bekannt, lediglich die Halogenierung des Sechsrings von Tryptophan kann vermutlich ausgeschlossen werden. Eine denkbare Anwendung dieser Enzyme könnte in kombinatorischen Biosynthesen bestehen. Bei dieser Methode werden DNA-Fragmente aus Biosyntheseclustern unterschiedlicher Sekundärmetabolite miteinander verknüpft, um Hybride zu erhalten. Durch den Austausch von NRPS-Modulen im Daptomycin Biosynthesecluster ist es z. B. gelungen, neuartige Derivate mit veränderter Polypeptidkette dieser Substanz zu erzeugen (Baltz et al., 2005). Auch mit Halogenasen führte diese Vorgehensweise schon zum Erfolg. So konnten durch den Austausch der normalerweise im Rebeccamycingencluster vorkommenden Tryptophan-7- gegen eine Tryptophan-6- oder eine Tryptophan-5-Halogenase Indolcarbazole mit neuartigem Halogenierungsmuster erzeugt werden (Sánchez et al., 2004).

6.4.2 Verwendung des Primerpaars HALOforD-HALOrevE

Das Primerpaar HALOforD-HALOrevE erwies sich für die spezifische Amplifikation von FADH₂-abhängigen Halogenasegenen als geeignet. Sowohl der Nachweis dieses Enzymtyps in bakteriellen Reinkulturen (*Pseudomonas* sp.; *Amycolatopsis orientalis*), als auch in komplexen mikrobiologischen Konsortien mariner Schwämme war möglich. Diese beiden Primer bilden somit eine Erweiterung des Repertoires an Möglichkeiten, Halogenasegene aufzuspüren. Weitere solche Möglichkeiten sind z.B. Southern Blot Analysen, in denen größere Genfragmente bekannter Halogenasen als Sonden eingesetzt werden können, oder ein, ebenfalls spezifisch für Halogenasegene, von Pirae und Vining (2002) beschriebenes Primerpaar. Die Amplifikation einer Vielzahl an Genfragmenten aus verschiedenen Schwämmen mit Hilfe der Primer HALOforD und HALOrevE weist auf ein großes Halogenierungspotential innerhalb der bakteriellen Konsortien dieser Schwämme hin. Die Tatsache, dass durch die phylogenetischen Analysen (Abbildungen 23 und 24) mindestens ein schwammspezifischer Halogenasetyp identifiziert werden konnte, macht eine spezifische Funktion dieses Enzymtyps innerhalb der Bakterien-Schwamm-Interaktion denkbar. Da jedoch keine Korrelation zwischen Halogenasegenen aus bestimmten Schwämmen und eventuell in diesen Schwämmen identifizierten halogenierten Sekundärmetaboliten gefunden werden konnte, bleibt diese Funktion unbekannt.

6.4.3 Halogenasen als Anker für Biosynthesecluster

Angesichts der metagenomischen Analysen von Halogenasen aus dem mikrobiellen Konsortium von *Aplysina aerophoba* bleibt die Frage offen, ob dieser Enzymtyp wirklich mit

Biosyntheseclustern von Sekundärmetaboliten assoziiert ist, wie dies zu Beginn der vorliegenden Arbeit angenommen wurde. Weder die komplette Sequenzierung eines 40000 Basen großen Bereichs im Umfeld der Halogenase auf Fosmid 3K12, noch die Analyse kleinerer Sequenzbereiche um drei weitere Halogenasen auf den Fosmiden 26C24, 29G1 und 42I22, konnten Hinweise auf die Einbettung in ein Biosynthesecluster liefern. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass bei den drei letztgenannten die bekannte Sequenz lediglich jeweils ca. nur 7000 Basen groß ist, was für eine endgültige Aussage möglicherweise zu wenig ist. Bei Fosmid 3K12 liegt die Halogenase nahe am Rand des klonierten Inserts, sodass über den anschließenden Bereich keine endgültigen Aussagen getroffen werden kann. Allerdings ergab hier auch die Ansequenzierung eines in der Metagenombank Apae02 gefundenen „Contigs“ (Klon 71K1) keinen Hinweis auf ein eventuell vorhandenes Biosynthesecluster. Auch die teilweise Sequenzierung des Fosmids 23K13, welches ein Contig von 3K12 auf der entgegengesetzten Seite darstellt, lieferte keine weiteren Hinweise auf Sekundärstoffwechselgene. Darüber hinaus existiert auf Fosmid 3K12 ein Bereich von ca. 15000 Basen (Abbildung 25, A), für den es keinerlei Hinweise auf die Funktionen der kodierten Proteine gibt.

Im Falle des Streptomyccetenisolates Pol001 stellte sich die verwendete Strategie der Nutzung von Halogenasen als Anker für Biosynthesecluster als erfolgreich dar. Die genaue Analyse dieses Clusters ist unter Punkt 5.3 und Punkt 6.3 dargestellt. Eine ähnliche Strategie wurde in einer Doktorarbeit an der Universität Oldenburg verfolgt (Martens, 2005). Neben der Untersuchung von bakteriellen Isolat aus dem Wattenmeer auf PKS- und NRPS-Systeme mittels PCR führte der Autor auch eine Suche nach FADH₂-abhängigen Halogenasen durch. Allerdings gelang ihm der Nachweis nur bei einem proteobakteriellen Stamm. Das sequenzierte Fragment zeigte Ähnlichkeit zu Tryptophan-halogenierenden Enzymen. Interessant wäre hier, ob ein Einsatz der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Primer zu einer höheren Anzahl Halogenase-positiver Isolate in dieser Stammsammlung führen würde. Es ist vorstellbar, dass die von Martens verwendeten Primer eher spezifisch für Tryptophanhalogenasen sind, während die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide diesen Enzymtyp nicht erkennen.

Abschließend erweist sich das PCR-Screening nach Halogenasegenen als Anker für bakterielle Sekundärmetabolit-Gencluster als erfolgsversprechend. In Metagenombanken aus

Schwämmen dagegen liegen offenbar neuartige, Schwamm-spezifische Halogenasen vor, die keine Hinweise auf Sekundärmetabolit-Biosynthesecluster liefern.

6.4.4 Mögliche Ursprungsorganismen

Da für eine Bestimmung des Ursprungsorganismus eines bestimmten DNA-Bereichs die Anwesenheit eines 16S-rRNA Gens auf diesem nötig ist, kann über die Herkunft der Halogenasen keine Aussage gemacht werden. Einige Bakteriengruppen wären jedoch in Betracht zu ziehen. So konnten Gene von FADH₂-abhängigen Halogenasen bis heute lediglich in einer begrenzten Zahl bakterieller Gruppen nachgewiesen werden. Dies sind α - (Nierman et al., 2001), β - (Holden et al., 2004), γ - (Paulsen et al., 2005) und δ -Proteobakterien (Rendulic et al., 2004), Cyanobakterien (Rouhiainen et al., 2000), verschiedenen Gattungen der Ordnung Actinomycetales (Ishikawa et al., 2004; Onaka et al., 2003; Bentley et al., 2002; Li et al., 2004; Sanchez et al., 2002) und die Familie Planctomycetaceae (Glöckner et al., 2003). Der überwiegende Teil der auf Fosmid 3K12 kodierten Proteine zeigte höchste Homologien entweder zu proteobakteriellen oder zu aktinobakteriellen Sequenzen (Abbildung 25, B). Sowohl Proteobakterien, als auch Aktinobakterien konnten bei phylogenetischen Untersuchungen im mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* nachgewiesen werden (Hentschel et al., 2002). Organismen aus diesen Gruppen wären also durchaus als Ursprung des chromosomalen Fragments auf Fosmid 3K12 denkbar. Allerdings repräsentieren die Proteobakterien und die Aktinobakterien zusammen mehr als die Hälfte der momentan (April 2006) komplett sequenzierten bakteriellen Genome (NCBI Database). Zum anderen konnten im mikrobiellen Konsortium von *A. aerophoba* mehrere bakterielle Phyla nachgewiesen werden, für die nur eine sehr begrenzte Anzahl an Reinkulturisolaten und zwangsläufig auch nur eine geringer Satz an Sequenzinformation vorliegt. Diese Phyla sind die *Chloroflexi*, *Acidobacteria*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, *Spirochaetes* und das von Fieseler erst kürzlich beschriebene Candidatus Phylum *Poribacteria* (Fieseler, 2005). All diese Gruppen können als Ursprungsorganismen der gefundenen DNA Abschnitte als wahrscheinlich angesehen werden.

6.4.5 Mögliche Funktionen

Es ist bei Enzymen wie Chitinasen (Cottrell et al., 1999), Lipasen (Henne et al., 2000) oder Amylasen (Rondon et al., 2000) aus Metagenombanken vergleichsweise einfach, einen Funktionsbeweis zu erbringen. Die Suche nach derartigen Proteinen kann direkt durch einen veränderten Phänotypus erfolgen. Auch das Substrat ist in diesen Fällen leicht zugänglich und

ersichtlich. Anders sieht es bei FADH₂-abhängigen Halogenasen aus. Es war während der vorliegenden Arbeit möglich, die Halogenase des Fosmidklons 42I22 in *E. coli* Zellen heterolog zu exprimieren (siehe Punkt 5.4.10). Hierbei konnte auch lösliches Protein gewonnen werden, welches für Funktionsanalysen nutzbar ist. Aufgrund des nicht voraussagbaren Substrats ist jedoch ein *in vitro* Funktionsbeweis über diesen Ansatz bisher nicht gelungen. Tatsächlich war es bis heute erst bei wenigen Vertretern dieses Enzymtyps möglich, einen Funktionsbeweis zu erbringen. Dies sind die Enzyme PltA aus dem Pyoluteorin Biosynthesecluster (Dorrestein et al., 2005), RebH aus dem Rebeccamycin Biosynthesecluster (Yeh et al., 2005), HalB aus dem Pentachlorpseudilinproduzenten *Actinoplanes* sp. ATCC 33002 (Wynands und van Pee, 2004) und PrnA aus *Pseudomonas fluorescens* (Keller et al., 2000).

Als Alternative zum *in vitro* Funktionsbeweis wird versucht, eine Mutante des Balhimycinproduzenten *Amycolatopsis balhimycina* mit der Halogenase des Fosmids 3K12 zu rekompimentieren. In dieser Mutante wurde das Gen *bhaA*, eine Halogenase aus dem Biosynthesecluster für Balhimycin, zerstört, sodass dieser Stamm nicht mehr zur Bildung des angesprochenen Glycopeptids fähig ist. Die Studie zielt auf eine Wiederherstellung dieses Biosynthesewegs und die eventuelle Produktion von Sekundärmetaboliten, mit vom Balhimycin abweichendem Halogenierungsmuster, ab. Durchgeführt werden diese Versuche in Kooperation mit Frau Claudia Kittel (AG Wohlleben, Institut für Mikrobiologie, Universität Tübingen).

Ungeachtet des fehlenden Funktionsbeweises sprechen alle Sequenzdaten für die Zuordnung der gefundenen Gene zu den Halogenasen. Besonders hervorgehoben werden soll hierbei der Nachweis zweier konservierter Aminosäuredomänen in allen vier Halogenasen aus Apae02. Nowak-Thompson und Mitarbeiter (1999) konnten nachweisen, dass es nicht ausreichend ist, wenn ein neu entdecktes Protein gute Homologie zu bereits bekannten Halogenasen zeigt, um daraus seine halogenierende Aktivität abzuleiten. Das Enzym PltD aus dem Biosynthesecluster von Pyoluteorin zeigt eine derartige Homologie, ist aber nicht für die Chlorierung des Pyoluteorins verantwortlich. PltD fehlt ein wichtiges Aminosäuremotiv, welches für FADH₂-abhängige Halogenasen essentiell ist. Dieses sogenannte GxGxxG-Motiv ist nahe am N-Terminus des jeweiligen Enzyms lokalisiert und für die Bindung des Nukleotidkofaktors verantwortlich (Wynands et al., 2004; Scrutton et al., 1990). Ebenfalls essentiell für Halogenaseaktivität ist das WxWxI-Motiv. Den zwei Tryptophanresten aus

diesem Motiv wird eine Rolle bei der Bindung des Halidions zugewiesen (van Pée und Unversucht, 2003). Zusammen mit den ermittelten Sequenzhomologien ist der Nachweis dieser Domänen ein deutlicher Hinweis auf die halogenierende Funktion der gefundenen Proteine. Was den *in vitro* Funktionsbeweis zusätzlich erschwert, ist die Unkenntnis der jeweiligen Ursprungsorganismen der entdeckten Enzyme, was die Auswahl eines geeigneten Expressionssystems schwierig gestaltet.

6.4.6 Mögliche Beteiligung an der Bildung von Schwamm-Metaboliten

Die chemische Struktur der Isoxazolinalkaloide aus *Aplysina* Schwämmen ist neben der Anwesenheit mehrerer Bromierungen bemerkenswert, da sie mindestens eine Peptidbindung enthalten (Abbildung 38). Die Knüpfung solcher Bindungen kann durch Nicht-Ribosomale-Peptid-Synthetasen (NRPS) erfolgen, die bisher nur von Bakterien und Pilzen bekannt sind (Moffitt und Neilan, 2000). Da auch FADH₂-abhängige Halogenasen lediglich aus Bakterien bekannt sind, lag der Schluss nahe, dass Bakterien aus *A. aerophoba* für die Bildung der Schwamm-spezifischen Isoxazolinalkaloide verantwortlich, oder zumindest daran beteiligt sind. Daher wurde in der Metagenombank von *A. aerophoba* nach Klonen gesucht, die sowohl NRPS- als auch Halogenasegene trugen. Der Nachweis eines solchen Klons war jedoch nicht möglich. Obwohl Biosynthesegene in Bakterien meistens in „Clustern“ auftreten, existieren auch Beispiele, bei denen diese Gene nicht zusammen vorliegen. Die Biosynthese von Clavam-Metaboliten z.B. in *S. clavuligerus* wird durch drei Gruppen von Enzymen codiert, die getrennt auf dem Chromosom des Bakteriums liegen (Tahlan et al., 2004). Die Frage, ob eine solche „Trans-Stellung“ auch bei den gefundenen Halogenasen aus *A. aerophoba* der Fall ist, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden.

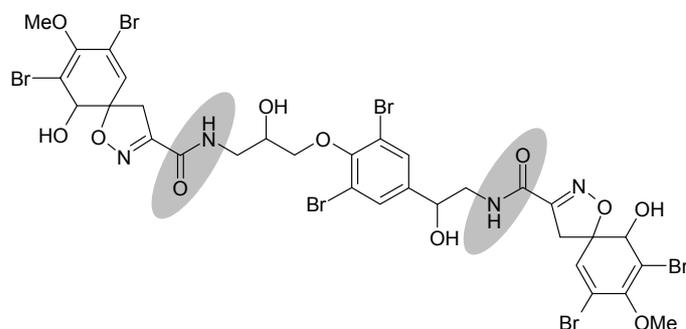


Abbildung 38 Strukturformel von Isofistularin 3. Die beiden Peptidbindungen sind grau unterlegt.

6.4.7 Ausblick

Angesichts des mangelnden Substrats und des fehlenden Expressionssystems für die neuen Halogenasen aus der Metagenombank Apae02 von *A. aerophoba*, scheinen weiterführende Funktionsstudien in Bezug auf diese vier Proteine schwierig. Bei der Suche nach dem Ursprungsorganismus könnten weitere Sequenzierungen von „contigs“ von Klonen der Metagenombank Apae02 nützlich sein. Auf diese Weise müsste ein „genome walking“ durchgeführt werden, bis beispielsweise das Gen einer ribosomalen RNA gefunden würde, die einen direkten Rückschluss auf den Ursprungsorganismus zulassen würde.

Sollte die Rekplementation der *A. balhimycina* Mutante nicht erfolgreich sein, so sind weitere ähnliche Experimente mit anderen Halogenase-tragenden Biosyntheseclustern denkbar, um ein größeres Spektrum an Substraten abzudecken. Dieses könnte auch, beispielsweise in Kooperation mit der chemischen Industrie, durch Funktionsassays anhand von großen Substratbanken erweitert werden.

7. Literatur

Ahlert, J., Shepard, E., Lomovskaya, N., Zazopoulos, E., Staffa, A., Bachmann, B. O., Huang, K., Fonstein, L., Czisny, A., Whitwam, R. E., Farnet, C. M. und Thorson, J. S. (2002). The calicheamicin gene cluster and its iterative type I enediyne PKS. *Science* **297**, 1173-1176.

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

Alain, K., Olagnon, M., Desbruyeres, D., Page, A., Barbier, G., Juniper, S. K., Querellou, J. und Cambon-Bonavita, M. – A. (2002). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretion of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis*. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 463-476.

Al-Bari, M. A., Bhuiyan, M. S., Flores, M. E., Petrosyan, P., Garcia-Varela, M. und Islam, M. A. (2005). *Streptomyces bangladeshensis* sp. nov., isolated from soil, which produces bis-(2-ethylhexyl)phthalate. *Int Syst Evol Microbiol* **55**, 1973-1977.

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

Anderson, A. S. und Wellington, M. H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int Syst Evol Microbiol* **51**, 797-814.

Apweiler R. und 27 weitere Autoren (2001). The InterPro database, an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Nucleic Acids Res* **29**, 37-40.

August, P. R., Tang, L., Yoon, Y. J., Ning, S., Muller, R., Yu, T. W., Taylor, M., Hoffmann, D., Kim, C. G., Zhang, X., Hutchinson, C. R. und Floss, H. G. (1998). Biosynthesis of the ansamycin antibiotic rifamycin: deductions from the molecular analysis of the rif biosynthetic gene cluster of *Amycolatopsis mediterranei* S699. *Chem Biol* **5**, 69-79.

Baltz, R. H., Brian, P., Miao, V. und Wrigley, S. K. (2005). Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **28**, 1-9.

Bano, N. und Hollibaugh, J. T. (2002). Phylogenetic composition of bacterioplankton assemblages from the Arctic Ocean. *Appl Environ Microbiol* **68**, 505-518.

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. und DeLong, E. F. (2000). Construction and analysis of bacterial artificial chromosome libraries from a marine microbial assemblage. *Environ Microbiol* **2**, 516-529.

Bentley, S. D. und 42 weitere Autoren (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141 – 147.

Bentley, S. D. und Parkhill, J. (2004). Comparative genomic structure of prokaryotes. *Annu Rev Genet* **38**, 771-791.

- Bernan, V. S., Greenstein, M. und Maiese, W. M. (1997).** Marine microorganisms as a source of new natural products, p. 57-90. *In: Neidleman, S. und Laskin, A. (ed.) Advances in Applied Microbiology*, 43. Elsevier Academic Press
- Bibb, M. J. (2005).** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Curr Opin Microbiol* **8**, 208-215.
- Bignell, D. R. D., Tahlan, K., Colvin, K. R., Jensen, S. E. und Leskiw, B. K. (2005).** Expression of *ccaRc* encoding the positive activator of cephamycin C and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*, is dependent on *bldG*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 1529-1541.
- Blanc, V., Salah-Bey, K., Folcher, M. und Thompson, C. J. (1995).** Molecular characterization and transcriptional analysis of a multidrug resistance gene cloned from the pristinamycin-producing organism, *Streptomyces pristinaespiralis*. *Mol Microbiol* **17**, 989-999.
- Blunt, J. W., Copp, B. R., Munro, M. H. G., Northcote, P. T. und Prinsep, M. R. (2004).** Marine natural products. *Nat Prod Rep* **21**, 1-49.
- Bowman, J. P. und McCuaig, R. D. (2003).** Biodiversity, community structural shifts, and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl Environ Microbiol* **69**, 2463-2483.
- Bowman, J. P. und Nowak, B. (2004).** Salmonid gill bacteria and their relationship to amoebic gill disease. *J Fish Dis* **27**, 483-492.
- Bowman, J. P., Rea, S. M., McCammon, S. A. und McMeekin, T. A. (2000).** Diversity and community structure within anoxic sediment from marine salinity meromictic lakes and a coastal meromictic marine basin, Vestfold Hils, Eastern Antarctica. *Environ Microbiol* **2**, 227-237.
- Brady, S. F. und Clardy, J. (2000).** Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *J Am Chem Soc* **122**, 12903-12904.
- Brusca, R. C. und Brusca, G. J. (1990).** Phylum Porifera: The sponges, *In: Sinauer A. D. (ed.), Invertebrates*. Sinauer Press, MA, U.S.A.
- Cheng, Y. Q., Tang, G. L. und Shen, B. (2002).** Identification and localization of the gene cluster encoding biosynthesis of the antitumor macrolactam leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J Bacteriol* **184**, 7013-7024.
- Chin, K. – J., Liesack, W. und Janssen, P. H. (2001).** *Opiritatus terrae* gen. nov., to accommodate novel strains of the division “*Verrucomicrobia*” isolated from rice paddy soil. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 1965-1968.
- Chiu, H. - T., Hubbard, B. K., Shah, A. N., Eide, J., Fredenburg, R. A., Walsh, C. T. und Khosla, C. (2001).** Molecular cloning and sequence analysis of the complestatin biosynthetic gene cluster. *Proc Natl Acad Sci* **98**, 8548-8553.

- Cohen-Bazire, G., Sistro, W. R. und Stanier, R. Y. (1957).** Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* **49(1)**, 25-68.
- Cottrell, M. T., Moore, J. A. und Kirchman, D. L. (1999).** Chitinases from uncultured marine microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **65**, 2553-2557.
- Courtois, S., Cappellano, C. M., Ball, M., Francou, F. X., Normand, P., Helynck, G., Martinez, A., Kolvek, S. J., Hopke, J., Osburne, M. S., August, P. R., Nalin, R., Guerineau, M., Jeannin, P., Simonet, P. und Pernodet, J.-L. (2003).** Recombinant environmental libraries provide access to microbial diversity for drug discovery from natural products. *Appl Environ Microbiol* **69**, 49-55.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. und Elofsson, A. (1997).** Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the Dense Alignment Surface method. *Prot Eng* **10**, 673-676.
- Dairi, T., Nakano, T., Aisaka, K., Katsumata, R. und Hasegawa, M. (1995).** Cloning and nucleotide sequence of the gene responsible for chlorination of tetracycline. *Biosci Biotech Biochem* **59**, 1099-1106.
- Da Silva, A. C. R. und 64 weitere Autoren (2002).** Comparison of the genomes of two *Xanthomonas* pathogens with differing host specificities. *Nature* **417**, 459-463.
- Dennis, J. und Zylstra, G. J. (2004).** Complete sequence and genetic organization of pDTG1, the 83 kilobase naphthalene degradation plasmid from *Pseudomonas putida* strain NCIB 9816-4. *J Mol Biol* **341**, 753-768.
- Derrien, M., Vaughan, E. E., Plugge, C. M. und de Vos, W. M. (2004).** *Akkermansia muciniphila* gen. nov., sp. nov., a human intestinal mucin-degrading bacterium. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 1469-1476.
- Diaz-Torres, M. L., McNab, R., Spratt, D. A., Villedieu, A., Hunt, N., Wilson, M. und Mullany, P. (2003).** Novel tetracycline resistance determinant from the oral metagenome. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 1430-1432.
- Dieckmann, R., Graeber, I., Kaesler, I., Szewzyk, U. und von Dohren, H. (2005).** Rapid screening and dereplication of bacterial isolates from marine sponges of the sula ridge by intact-cell-MALDI-TOF mass spectrometry (ICM-MS). *Appl Microbiol Biotechnol* **67**, 539-548.
- Di Gregorio, S., Zocca, C., Sidler, S., Toffanin, A., Lizzari, D. und Vallini, G. (2004).** Identification of two new sets of genes for dibenzothiophene transformation in *Burkholderia* sp. DBT1. *Biodegradation* **15**, 111-123.
- Dojka, M. A., Hugenholtz, P., Haack, S. K. und Pace, N. R. (1998).** Microbial diversity in a hydrocarbon- and chlorinated-solvent-contaminated aquifer undergoing intrinsic bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3869-3877.
- Dorrestein, P. C., Yeh, E., Garneau-Tsodikova, S., Kelleher, N. L. und Walsh, C. T. (2005).** Dichlorination of a pyrrolyl-S-carrier protein by FADH₂-dependent halogenase PltA during pyoluteorin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 13843-13848.

- El Sayed, K. A., Hamann, M. T., Hashish, N. E., Shier, W. T., Kelly, M und Khan, A. A. (2001).** Antimalarial, antiviral, and antitoxoplasmosis norsesterterpene peroxide acids from the Red Sea sponge *Diacarnus erythraeanus*. *J Nat Prod* **64**, 522-524.
- Enroth, H., Wreiber, K., Rigo, R., Risberg, D., Uribe, A. und Engstrand, L. (1999).** *In Vitro* Aging of *Helicobacter pylori*: Changes in Morphology, Intracellular Composition and Surface Properties. *Helicobacter* **4**, 7-16.
- Faulkner, D. J. (2000).** Marine pharmacology. *Antonie Van Leeuwenhoek* **77**, 135-145.
- Faulkner, D. J., Harper, M. H., Haygood, M. G., Salomon, C. E. und Schmidt, E. W. (2000).** Symbiotic bacteria in sponges: sources of bioactive substances. *In: Drugs from the sea*, Fusetani, N. ed. (Basel, Karger).
- Fenical, W., Baden, D., Burg, M., de Goyet, C. V., Grimes, J. D., Katz, M., und andere (1999).** Marine-derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. *In: From monsoons to microbes*. Fenical, W. (ed.) Washington, DC: National Academies Press, 71-86.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Martins Dos Santos, V. A., Yakimov, M. M., Timmis, K. N. und Golyshin, P. N. (2005a).** Microbial enzymes mined from the Urania deep-sea hypersaline anoxic basin. *Chem Biol* **12**, 895-904.
- Ferrer, M., Golyshina, O. V., Chernikova, T. N., Khachane, A. N., Reyes-Duarte, D., Santos, V. A., Strompl, C., Elborough, K., Jarvis, G., Neef, A., Yakimov, M. M., Timmis, K. N. und Golyshin, P. N. (2005b).** Novel hydrolase diversity retrieved from a metagenome library of bovine rumen microflora. *Environ Microbiol* **7**, 1996-2010.
- Fieseler, L., Horn, M., Wagner, M. und Hentschel, U. (2004).** Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3724-3732.
- Fieseler, L. (2005).** Entdeckung des neuen Candidatus Phylums *Poribacteria*. Dissertation der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Fieseler, L., Quaiser, A., Schleper, C. und Hentschel, U. (2006).** Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum *Poribacteria* by environmental genomics. *Environ Microbiol* **8**, 612-624.
- Friedrich, A. B., Fischer, I., Proksch, P., Hacker, J. und Hentschel, U. (2001).** Temporal variation of the microbial community associated with the mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol* **38**, 105-113.
- Friedrich, A. B., Merkert, H., Fendert, T., Hacker, J., Proksch, P. und Hentschel, U. (1999).** Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formaly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar Biol* **134**, 461-470.
- Fürstner, A. (2003).** Chemistry and biology of roseophilin and the prodigiosin alkaloids: A survey of the last 2500 years. *Angew Chem Int Ed Engl* **42**, 3582-3603.

- Gillespie, D. E., Brady, S. F., Bettermann, A. D., Cianciotto, N. P., Liles, M. R., Rondon, M. R., Clardy, J., Goodman, R. M. und Handelsman, J. (2002).** Isolation of antibiotics turbomycin A and B from a metagenomic library of soil microbial DNA. *Appl Environ Microbiol* **68**, 4301-4306.
- 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. und Reinhardt, R. (2003).** Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8298-8303.
- Goel, A. K., Rajagopal, L., Nagesh, N. und Sonti, R. V. (2002).** Genetic locus encoding functions involved in biosynthesis and outer membrane localization of xanthomonadin in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *J Bacteriol* **184**, 3539-3548.
- Goodfellow, M. und Haynes, J. A. (1984).** Actinomycetes in marine sediments. In: Biological, biochemical, and biomedical aspects of actinomycetes. Ortiz-Ortiz, L., Bojalil, L. F. und Yakoleff, V. (eds). New York, USA: Academic Press, pp. 453-472.
- Goodfellow, M., Manfio, G. P. und Chun, J. (1997).** Towards a practical species concept for cultivable bacteria. In: Claridge, M. F., Dawah, H. A. und Wilson, M. R. (eds.), Species: The Units of Biodiversity. Chapman & Hall, London.
- Hammer, P. E., Hill, D. S., Lam, S. T., van Pée, K. - H. und Ligon, J. M. (1997).** Four genes from *Pseudomonas fluorescens* that encode the biosynthesis of pyrrolnitrin. *Appl Environ Microbiol* **63**, 2147-2154.
- Hammer, P. E., Burd, W., Hill, D. S., Ligon, J. M. und van Pee, K. H. (1999).** Conservation of the pyrrolnitrin biosynthetic gene cluster among six pyrrolnitrin-producing strains. *FEMS Microbiol Lett* **180**, 39-44.
- Hallam, S. J., Putnam, N., Preston, C. M., Detter, J. C., Rokhsar, D., Richardson, P. M. und DeLong, E. F. (2004).** Reverse methanogenesis: testing the hypothesis with environmental genomics. *Science* **305**, 1457-1462.
- Harned, R. L. (1954).** The production of prodigiosin by submerged growth of *Serratia marcescens*. *Appl Microbiol* **2**, 365-368.
- Harris, J. K., Kelley, S. T. und Pace, N. R. (2004).** New perspective on uncultured bacterial phylogenetic division OP11. *Appl Environ Microbiol* **70**, 845-849.
- He, L., Li, W., Huang, Y., Wang, L., Liu, Z., Lanoot, B., Vancanneyt, M. und Swings, J. (2005).** *Streptomyces jietaisiensis* sp. nov., isolated from soil in northern China. *Int Syst Evol Microbiol* **55**, 1939-1944.
- Hedlund, B. P., Gosink, J. J. und Staley, J. T. (1996).** Phylogeny of Prosthecobacter, the fusiform caulobacters: members of a recently discovered division of the bacteria. *Int J Syst Bacteriol* **46**, 960-966.
- Hedlund, B. P., Gosink, J. J. und Staley, J. T. (1997).** Verrucomicrobia div. nov., a new division of the Bacteria containing three new species of *Prosthecobacter*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**, 29-38.

- Henikoff, S., Henikoff, J. G., Alford, W. J. und Pietrokovski, S. (1995).** Automated construction and graphical presentation of protein blocks from unaligned sequences. *Gene* **163**, GC 17-26.
- Henne, A., Schmitz, R. A., Bomeke, M., Gottschalk, G. und Daniel, R. (2000).** Screening of environmental DNA libraries for the presence of genes conferring lipolytic activity on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3113-3116.
- Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A. B., Wagner, M., Hacker, J. und 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., und 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.
- Hentschel, U., Usher, K. M. und Taylor, M. W. (2006).** Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* **55**, 167-177.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D. C. J., Cullum, J. A. und Oliver, S. G. (1989).** Dispersed Growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol* **31**, 272-277.
- Holden, M. T. und 47 weitere Autoren (2004).** Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 14240-14245.
- Hooper, J. N. A. und van Soest, R. W. M. (2002).** *Systema Porifera*. A guide to the classification of sponges. Volume 1. Kluwer Academic, Plenum Publishers.
- Hopwood, D. A. (1967).** Genetic analysis and genome structure in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol Rev* **31**, 373-403.
- Hsu, S. C. und Lockwood, J. L. (1975).** Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl Microbiol* **29**, 422-426.
- Hugenholtz, P., Goebel, B. M. und Pace, N. R. (1998).** Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* **180**, 4765-4774.
- Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Shinose, M., Kikuchi, H., Shiba, T., Sakaki, Y., Hattori, M. und Omura, S. (2003).** Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat Biotechnol* **21**, 526-531.
- Illarionov, B. A., Blinov, V. M., Donchenko, A. P., Protopopova, M. V., Kardinov, V. A., Mertvetsov, N. P. und Gitelson, J. I. (1990).** Isolation of bioluminescent functions from *Photobacterium leiognathi*: analysis of luxA, luxB, luxG and neighboring genes. *Gene* **86**, 89-94.
- Imamura, N., Nishijima, M., Adachi, K. und Sano, H. (1993).** Novel antimycin antibiotics, urauchimycins A and B, produced by marine actinomycete. *J Antibiot (Tokyo)* **46**, 241-246.

- Ishikawa, J., Yamashita, A., Mikami, Y., Hoshino, Y., Kurita, H., Hotta, K., Shiba, T. und Hattori, M. (2004).** The complete genomic sequence of *Nocardia farcinica* IFM 10152. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 14925-14930.
- Jenkins, C., Samudrala, R., Anderson, I., Hedlund, B. P., Petroni, G., Michailova, N., Pinel, N., Overbeek, R., Rosati, G. und Staley, J. T. (2002).** Genes for the cytoskeletal protein tubulin in the bacterial genus *Prostheco bacter*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 17049-17054.
- Jeong, H., Yim, J. H., Lee, C., Choi, S. H., Park, Y. K., Yoon, S. H., Hur, C. G., Kang, H. Y., Kim, D., Lee, H. H., Park, K. H., Park, S. H., Park, H. S., Lee, H. K., Oh, T. K. und Kim, J. F. (2005).** Genomic blueprint of *Hahella chejuensis*, a marine microbe producing an algicidal agent. *Nucleic Acids Res* **33**, 7066-7073.
- Jiang C.-Y., Dai, X., Wang, B.-J., Zhou, Y.-G. und Liu, S.-J. (2006).** *Roseomonas lacus* sp. nov., isolated from freshwater lake sediment. *Int J Syst Bacteriol* **56**, 25-28.
- Joseph, S. J., Hugenholtz, P., Sangwan, P., Osborne, C. A. und Janssen, P. H. (2003).** Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7210-7215.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W. und Walsh, C. (2005).** Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev* **105**, 425-448.
- Keller, S., Wage, T., Hohaus, K., Holzer, M., Eichhorn, E. und van Pee, K. – H. (2000).** Purification and partial characterization of tryptophan 7-halogenase (PrnA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Angew Chem Int Ed Engl* **39**, 2300-2302.
- Kernan, M. R. und Faulkner, D. J. (1987).** Halichondramide, an antifungal macrolide from the sponge *Halichondria* sp.. *Tetrahedron Lett* **28**, 2809-2812.
- Kieser, T., Bibb, M. J., Buttner, M. J., Chater, K. F. und Hopwood, D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. Crowes, Norwich, England.
- Kim, B. S., Lonsdale, J., Seong, C.-N. und Goodfellow, M. (2003).** *Streptacidiphilus* gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family *Streptomycetaceae* (Waksman and Henrici (1943)^{AL}) emend. Rainey et al., 1997. *Ant v Leeuwenhoek* **83**, 107-116.
- Kim, E. – S., Hong, H.-J., Choi, C.-Y., und Cohen, S. N. (2001).** Modulation of actinorhodin biosynthesis in *Streptomyces lividans* by glucose repression of afsR2 gene transcription. *J Bacteriol* **183**, 2198-2203.
- Kitahara, T., Koyama, N., Matsuda, J., Aoyama, Y., Hirakata, Y., Kamihira, S., Kohno, S., Nakashima, M. und Sasaki, H. (2004).** Antimicrobial activity of saturated fatty acids and fatty amines against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Biol Pharm Bull* **27**, 1321-1326.
- Kobayashi, M., Aoki, S., Gato, K., Katsuyoshi, M., Kurosu, M. und Kitigawa, I. (1995).** Trisindoline, a new antibiotic indole trimer, produced by a bacterium of *Vibrio* sp. separated from the marine sponge *Hyrtios altum*. *Chem Pharm Bull* **42**, 2449-2451.

- Knoche, K. und Kephart, D. (1999).** Cloning blunt-end *Pfu* DNA polymerase-generated PCR fragments into pGEM[®] T vector systems. *Promega Notes* **71**, 10-14.
- König, G. M., Wright, A. D. und Linden, A. (1998).** Antiplasmodial and cytotoxic metabolites from the Maltese sponge *Agelas oroides*. *Planta Med* **64**, 443-447.
- Labeda, D. P. (1993).** DNA relatedness among strains of the *Streptomyces lavendulae* phenotypic cluster group. *Int J Syst Bacteriol* **43**, 822-825.
- Labeda, D. P. (1998).** DNA relatedness among the *Streptomyces fulvissimus* and *Streptomyces griseoviridis* phenotypic cluster groups. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 829-832.
- Labeda, D. P. und Lyons, A. J. (1992).** DNA relatedness among strains of the sweet potato pathogen *Streptomyces ipomoea* (Person and Martin 1940) Waksman and Henrici 1948. *Appl Environ Microbiol* **58**, 532-535.
- Lafi, F. F., Garson, M. J. und Fuerst, J. A. (2005).** Culturable bacterial symbionts isolated from two distinct sponge species (*Pseudoceratina clavata* and *Rhabdastrella globostellata*) from the great barrier reef display similar phylogenetic diversity. *Microb Ecol* **50**, 213-220.
- 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 and Sons, New York, N.Y.
- Lanoot, B., Vancanneyt, M., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Cnockaert, M. C., Dawyndt, P., Zhiheng, L., Huang, Y. und Swings, J. (2005).** Grouping of streptomycetes using 16S-ITS RFLP fingerprinting. *Res Microbiol* **156**, 755-762.
- Laatsch, H. (2006).** Marine bacterial metabolites. In: Frontiers in marine biotechnology. Proksch, P. und Müller, W. E. G. (eds). Norfolk, England: Horizon Bioscience, pp. 225-288.
- Lang, S., Beil, W., Tokuda, H., Wicke, C. und Lurtz, V. (2004).** Improved production of bioactive glucosylmannosyl-glycerolipid by sponge-associated *Microbacterium* species. *Mar Biotechnol (NY)* **6**, 152-156.
- Lazaro, J. E., Nitcheu, J., Predicala, R. Z., Mangalindan, G. C., Nessler, F., Marzin, D., Concepcion, G. P. und Diquet, B. (2002).** Heptyl prodigiosin, a bacterial metabolite, is antimalarial in vivo and non-mutagenic in vitro. *J Nat Toxins* **11**, 367-377.
- LeCleir G. R., Buchan, A. und Hollibaugh, J. T. (2004).** Chitinase gene sequences retrieved from diverse aquatic habitats reveal environment-specific distributions. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6977-6983.
- Lee, S. Y., Bollinger, J., Bezdicek, D. und Ogram, A. (1996).** Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterium strain by a competitive quantitative PCR method. *Appl Environ Microbiol* **62**, 3787-3793.
- Lee, C. K., Kamitani, Y., Nihira, T. und Yamada, Y. (1999).** Identification and in vivo functional analysis of a virginiamycin S resistance gene (*varS*) from *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol* **181**, 3293-3297.

- Lee, J. Y., Lee, J. Y., Jung, H. W. und Hwang, B. K. (2005).** *Streptomyces koyangensis* sp. nov., a novel actinomycete that produces 4-phenyl-3-butenoic acid. *Int Syst Evol Microbiol* **55**, 257-262.
- Lee, H. S., Shin, H. J., Jang, K. H., Kim, T. S., Oh, K. B. und Shin, J. (2005a).** Cyclic peptides of the nocardamine class from a marine-derived bacterium of the genus *Streptomyces*. *J Nat Prod* **68**, 623-625.
- Li, A. und Piel, J. (2002).** A gene cluster from a marine *Streptomyces* encoding the biosynthesis of the aromatic spiroketal polyketide griseorhodin A. *Chem Biol* **9**, 1017-1026.
- Li, T. L., Huang, F., Haydock, S. F., Mironenko, T., Leadlay, P. F. und Spencer, J. B. (2004).** Biosynthetic gene cluster of the glycopeptide antibiotic teicoplanin: characterization of two glycosyltransferases and the key acyltransferase. *Chem Biol* **11**, 107-119.
- Li, W. J., Zhang, Y. G., Zhang, Y. Q., Tang, S. K., Xu, P., Xu, L. H. und Jiang, C. L. (2005).** *Streptomyces sodiiphilus* sp. nov., a novel alkaliphilic actinomycete. *Int Syst Evol Microbiol* **55**, 1329-1333.
- Lim, H. K., Chung, E. J., Kim, J. C., Choi, G. J., Jang, K. S., Chung, Y. R., Cho, K. Y. und Lee, S. W. (2005).** Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and idigo production on *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 7768-7777.
- Liu, R., Cui, C. B., Duan, L., Gu, Q. Q. und Zhu, W. M. (2005).** Potent in vitro anticancer activity of metacycloprodigiosin and undecylprodigiosin from a sponge-derived actinomycete *Saccharopolyspora* sp. nov.. *Arch Pharm Res* **28**, 1341-1344.
- Liu, W., Christenson, S. D., Standage, S. und Shen, B. (2002).** Biosynthesis of the enediyene antitumor antibiotic C-1027. *Science* **297**, 1170-1173.
- Lyman, J. und Fleming, R. H. (1940).** Composition of seawater. *J Mar Res (Sears Foundation)* **3**, 134-146.
- MacKenzie, S. L. (1987).** Gas chromatographic analysis of amino acids as the N-heptafluorobutyryl isobutyl esters. *J Assoc Off Anal Chem* **70**, 151-160.
- Manfio, G. P., Atalan, E., Zakrzewska-Czerwinska, J., Mordarski, M., Rodriguez, C., Collins, M. D. und Goodfellow, M. (2003).** Classification of novel soil streptomycetes as *Streptomyces aureus* sp. nov., *Streptomyces laceyi* sp. nov. and *Streptomyces sanglieri* sp. nov.. *Antonie van Leeuwenhoek* **83**, 245-255.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. und Sambrook, J. (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Second ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
- Mao, Y., Varoglu, M. und Sherman, D. H. (1999).** Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the antitumor antibiotic mitomycin C from *Streptomyces lavendulae* NRRL 2564. *Chem Biol* **181**, 251-263.
- Marahiel, M. A., Krause, M. und Skarpeid, H. J. (1985).** Cloning of the tyrocidine synthetase 1 gene from *Bacillus brevis* and its expression in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* **201**, 231-236.

- Martens, T. (2005).** Untersuchungen auf Sekundärstoffproduktion und physiologische Charakterisierung von marinen heterotrophen Bakterien aus dem deutschen Wattenmeer. Dissertation, Fakultät für Mathematik und Naturwissenschaften der Carl-von-Ossietzky-Universität Oldenburg.
- Mincer, T. J., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. und Fenical, W. (2002).** Widespread and persistent populations of a major new actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol* **68**, 5005-5011.
- Mitova, M., Popov, S. und De Rosa, S. (2004).** Cyclic peptides from a *Ruegeria* strain of bacteria associated with the sponge *Suberites domuncula*. *J Nat Prod* **67**, 1178-1181.
- Mochizuki, S., Hiratsu, K., Suwa, M., Ishii, T., Sugino, F., Yamada, K. und Kinashi, H. (2003).** The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism. *Mol Microbiol* **48**, 1501-1510.
- Moffitt, M. C. und Neilan, B. A. (2000).** The expansion of mechanistic and organismic diversity associated with non-ribosomal peptides. *FEMS Microb Lett* **191**, 159-167.
- Molnar, I., Schupp, T., Ono, M., Zirkle, R., Milnamow, M., Nowak-Thompson, B., Engel, N., Toupet, C., Stratmann, A., Cyr, D. D., Gorchach, J., Mayo, J. M., Hu, A., Goff, S., Schmid, J. und J. M. (2000).** The biosynthetic gene cluster for the microtubule-stabilizing agents epothilones A and B from *Sorangium cellulosum* So ce90. *Chem Biol* **7**, 97-109.
- Montalvo, N. F., Mohamed, N. M., Enticknap, J. J. und Hill, R. T. (2005).** Novel actinobacteria from marine sponges. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**, 29-36.
- Moore, B. S., Kalaitzis, J. A. und Xiang, L. (2005).** Exploiting marine actinomycete biosynthetic pathways for drug discovery. *Antonie Van Leeuwenhoek* **87**, 49-57.
- Moran, M. A., Rutherford, L. T. und Hodson, R. E. (1995).** Evidence for indigenous *Streptomyces* populations in a marine environment determined with a 16S rRNA probe. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3695-3700.
- Müller, W. E. G. (1998).** Origin of metazoa: Sponges as living fossils. *Naturwissenschaften* **85**, 11-25.
- Nicolaou, K. C., Boddy, C. N. C., Bräse, S. und Winssinger, N. (1999).** Chemistry, biology, and medicine of the glycopeptide antibiotics. *Angew Chem Int Ed* **38**, 2096-2152.
- Nierman, W., C. und 35 weitere Autoren (2001).** Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**, 4136-4141.
- Nowak-Thompson, B., Chaney, N., Wing, J. S., Gould, S. J. und Loper, J. E. (1999).** Characterization of the pyoluteorin biosynthetic gene cluster of *Pseudomonas fluorescens* PF-5. *J Bacteriol* **181**, 2166-2174.
- Oclarit, J. M., Ohta, S., Kaminura, K., Yamaoka, Y., Iizuka, T., Miyashiro, S. und Ikegami, S. (1994).** A novel antimicrobial substance from a strain of the bacterium *Vibrio* sp. *Nat Prod Lett* **47**, 257-260.

- Onaka, H., Taniguchi, S., Igarashi, Y. und Furumai, T. (2003).** Characterization of the biosynthetic gene cluster rebeccamycin from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. *Biosci Biotechnol Biochem* **67**, 127-138.
- Oppenheimer, C. H. und Zobell, C. E. (1952).** The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J Mar Res* **11**, 10-18.
- O'Sullivan, L. A., Fuller, K. E., Thomas, E. M., Turley, C. M., Fry, J. C. und Weightman, A. J. (2004).** Distribution and culturability of the uncultivated 'AGG58 cluster' of the *Bacteroidetes* phylum in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol* **47**, 359-370.
- Otsuka, M., Ichinose, K., Fujii, I. und Ebizuka, Y. (2004).** Cloning, sequencing, and functional analysis of an iterative type I polyketide synthase gene cluster for biosynthesis of the antitumor chlorinated polyenone neocarzilin in "*Streptomyces carzinostaticus*". *Antimicrob Agents Chemother* **48**, 3468-3476.
- Pabel, C. T., Vater, J., Wilde, C., Franke, P., Hofemeister, J., Adler, B., Bringmann, G., Hacker, J. und Hentschel, U. (2003).** Antimicrobial activities and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *Bacillus* isolates from the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Mar Biotechnol (NY)* **5**, 424-434.
- Page, R. (1996).** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**, 357-358.
- Pandey, R., Chander, R. und Sainis, K. B. (2003).** A novel prodigiosin-like immunosuppressant from an alkalophilic *Micrococcus* sp.. *Int Immunopharmacol* **3**, 159-167.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T. und Saier M. H. Jr. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 1-34.
- Paulsen, I. T. und 28 weitere Autoren (2005).** Complete genome sequence of the plant commensal *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. *Nat Biotechnol* **23**, 873-878.
- Pedulla, M. L. und 19 weitere Autoren (2003).** Origins of highly mosaic mycobacteriophage genomes. *Cell* **113**, 171-182.
- Pelzer, S., Süssmuth, R., Heckmann, D., Recktenwald, J., Huber, P., Jung, G und Wohlleben, W. (1999).** Identification and analysis of the balhimycin biosynthetic gene cluster and its use for manipulating glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. *Antimicrob Agents Chemother* **43**, 1565-1573.
- Perry, N. B., Blunt, J. W., Munro, M. H. G. und Thompson, A. M. (1990).** Antitumoral and tumor agents from a New Zealand sponge, *Mycale* sp. 2. Structures and solution conformations of mycalides A and B. *J Org Chem* **55**, 223-227.
- Petroni, G., Spring, S., Schleifer, K. – H., Verni, F. und Rosati, G. (2000).** Defensive extrusive ectosymbionts of *Euplotidium* (Ciliophora) that contain microtubule-like structures are bacteria related to *Verrucomicrobia*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 1813-1817.

Pettit, R. K., Fakoury, B. R., Knight, J. C., Weber, C. A., Pettit, G. R., Cage, G. D. und Pon, S. (2004). Antibacterial activity of the marine sponge constituent cribrastatin 6. *J Med Microbiol* **53**, 61-65.

Pfeifer, V., Graeme, J. N., Ries, J., Recktenwald, J., Schefer, A. B., Shawky, R. M., Schröder, J., Wohlleben, W. und Pelzer, S. (2001). A polyketide synthase in glycopeptide biosynthesis. *J Biol Chem* **276**, 38370-38377.

Pfeifer, V. (2002). Die Biosynthese von (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycin, einer Vorstufe des Glykopeptidantibiotikums Balhimycin aus *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908. Dissertation der Universität Tübingen.

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., Wen, G., Butzke, D., Platzer, M., Fusetani, N. und Matsunaga, S. (2004). Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 16222-16227.

Pirae, M. und Vining, L. C. (2002). Use of degenerate primers and touchdown PCR to amplify a halogenase gene fragment from *Streptomyces venezuelae* ISP5230. *J Ind Microbiol Biotechnol* **29**, 1-5.

Pirae, M., White, R. L. und Vining, L. C. (2004). Biosynthesis of the dichloroacetyl component of chloramphenicol in *Streptomyces venezuelae* ISP5230: genes required for halogenation. *Microbiology* **150**, 85-94.

Pojer, F., Li, S. M. und Heide, L. (2002). Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* **148**, 3901-3911.

Pootoolal, J., Thomas, M. G., Marshall, G., Neu, J. M., Hubbard, B. K., Walsh, C. T. und Wright, G. D. (2002). Assembling the glycopeptide antibiotic scaffold: The biosynthesis of A47934 from *Streptomyces toyocaensis* NRRL15009. *Proc Natl Acad Sci* **99**, 8962-8967.

Pospiech, A. und Neumann, B. (1995). A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. *Trends Genet* **11**, 217-218.

Powell, S. M., Bowman, J. P., Snape, I. und Stark, J. S. (2003). Microbial community variation in pristine and polluted coastal Antarctic sediments. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 135-145.

Prangishvili, D., Garrett, R. A. und Koonin, E. V. (2006). Evolutionary genomics of archaeal viruses: unique viral genomes in the third domain of life. *Virus Res* **117**, 52-67.

Puk, O., Huber, P., Bischoff, D., Recktenwald, J., Jung, G., Süßmuth, R. D., van Pee, K. H., Wohlleben, W. und Pelzer, S. (2002). Glycopeptide biosynthesis in *Amycolatopsis mediterranei* DSM5908: function of a halogenase and a haloperoxidase/ perhydrolase. *Chem Biol* **9**, 225-235.

- Puk, O., Bischoff, D., Kittel, C., Pelzer, S., Weist, S., Stegmann, E., Süßmuth, R. D. und Wohlleben, W. (2004).** Biosynthesis of chloro- β -hydroxytyrosine, a nonproteinogenic amino acid of the peptidic backbone of glycopeptide antibiotics. *J Bacteriol* **186**, 6093-6100.
- Ramm, W., Schatton, W., Wagner-Dobler, I., Wray, V., Nimtz, M., Tokuda, H., Enjyo, F., Nishino, H., Beil, W., Heckmann, R., Lurtz, V., und Lang, S. (2004).** Diglucosyl-glycerolipids from the marine sponge-associated *Bacillus pumilus* strain AAS3: their production, enzymatic modification and properties. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**, 497-504.
- Rausch, C., Weber, T., Kohlbacher, O., Wohlleben, W. und Huson, D. H. (2005).** Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVM). *Nucleic Acids Res* **33**, 5799-5808.
- Rendulic, S., Jagtap, P., Rosinus, A., Eppinger, M., Baar, C., Lanz, C., Keller, H., Lambert, C., Evans, K. J., Goesmann, A., Meyer, F., Sockett, R. E. und Schuster, S. C. (2004).** A predator unmasked: life cycle of *Bdellovibrio bacteriovorus* from a genomic perspective. *Science* **303**, 689-692.
- Retief, J. D. (2000).** Phylogenetic analysis using PHYLIP. *Methods Mol Biol* **132**, 243-258.
- Ribes, H. M., Coma, R. und Gili, J. M. (1999).** Natural diet and grazing rate of the temperate sponge *Dysidea avara* (*Demospongiae*, *Dendroceratida*) throughout an annual cycle. *Mar Ecol Prog Ser* **176**, 179-190.
- Rocha, E. P. C. und Danchin, A. (2002).** Base composition bias might result from competition for metabolic resources. *Trends Genet* **18**, 291-294.
- 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. und Goodman, R. M. (2000).** Clonig the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* **66**, 2541-2547.
- Rosati, G., Lenzi, P. und Verni, F. (1993).** 'Epixenosomes': Peculiar epibionts of the protozoan ciliate *Euplotidium itoi*: Do their cytoplasmic tubules consist of tubulin? *Micron* **24**, 465-471.
- Rose, T. M., Schultz, E. R., Henikoff, J. G., Pietrokovski, S., McCallum, C. M. und Henikoff, S. (1998).** Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucleic Acids Res* **26**, 1628-1635.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R. und Sivonen, K. (2000).** Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol* **37**, 156-167.
- Saintpierre-Bonaccio, D., Amir, H., Pineau, R., Lemriss, S. und Goodfellow, M. (2004).** *Streptomyces ferralitis* sp. nov., a novel streptomycete isolated from a New-Caledonian ultramafic soil. *Int Syst Evol Microbiol* **54**, 2061-2065.
- Sakai, T., Ishizuka, K. und Kato, I. (2003).** Isolation and characterization of a fucoidan-degrading marine bacterium. *Mar Biotechnol (NY)* **5**, 409-416.

Salomon, C. E., Magarvey, N. A. und Sherman, D. H. (2004). 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. und Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sánchez, C., Butovich, I. A., Brana, A. F., Rohr, J., Mendez, C. und Salas, J. A. (2002). The biosynthetic gene cluster for the antitumor rebeccamycin: characterization and generation of indolocarbazole derivatives. *Chem Biol* **9**, 519-531.

Sánchez, C., Zhu, L., Brana, A. F., Salas, A. P., Rohr, J., Mendez, C. und Salas, J. A. (2004). Combinatorial biosynthesis of antitumor indolocarbazole compounds. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 461-466.

Sanglier, J. J., Whitehead, D., Saddler, G. S., Ferguson, E. V. und Goodfellow, M. (1992). Pyrolysis mass-spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. *Gene* **115**, 235-242.

Sangwan, P., Chen, X., Hugenholtz, P. und Janssen, P. H. (2004). *Chthoniobacter flavus* gen. nov., sp. nov., the first pure-culture representative of subdivision two, *Spartobacteria* classis nov., of the phylum *Verrucomicrobia*. *Appl Environ Microbiol* **70**, 5875-5881.

Sangwan, P., Kovac, S., Davis, K. E., Sait, M. und Janssen, P. H. (2005). Detection and cultivation of soil verrucomicrobia. *Appl Environ Microbiol* **71**, 8402-8410.

Santavy, D. L., Willenz, P. und Colwell, R. R. (1990). Phenotypic study of bacteria associated with the caribbean sclerosponge, *Ceratoporella nicholsoni*. *Appl Environ Microbiol* **56**, 1750-1762.

Scheuermayer, M., Gulder, T. M., Bringmann, G. und Hentschel, U. (im Druck). *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum *Verrucomicrobia*, isolated from a sponge (*Porifera*). *Int J Syst Evol Microbiol*.

Scheuermayer, M., Pimentel-Elardo, S., Fieseler, L., Grozdanov, L. und Hentschel, U. (2006). Microorganisms of sponges: Phylogenetic diversity and biotechnological potential. In: *frontiers in marine biotechnology*, P. Proksch and W. E. G. Mueller (Eds.), Horizon Scientific Press, UK, pp. 289-312.

Schirmer, A., Gadkari, R., Reeves, C. D., Ibrahim, F., DeLong, E. F. und Hutchinson, C. R. (2005). Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4840-4849.

Schleifer, K. H. (1985). Analysis of the chemical composition and primary structure of murein. *Methods Microbiol* **18**, 123-156.

Schleper, C., Swanson, R. V., Mathur, E. J. und 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.
- Schlesner, H. (1987).** *Verrucomicrobium spinosum* gen. nov., sp. nov.: a fimbriated prosthecate bacterium. *Syst Appl Microbiol* **10**, 54-56.
- Schlesner, H. (1994).** The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp. and other *Planctomycetales* from various aquatic habitats using dilute media. *Syst Appl Microbiol* **17**, 135-145.
- Schlesner, H., Jenkins, C. und Staley, J. T. (2001).** The phylum *Verrucomicrobia*: A phylogenetically heterogeneous bacterial group. In: Schlesner et al., eds., *The Prokaryotes: An evolving resource for the microbiological community*, 3rd edition, release 3.19, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>.
- Scrutton, N. S., Berry, A. und Perham, R. N. (1990).** Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. *Nature* **343**, 43-48.
- Serina, S., Radice, F., Maffioli, S., Donadio, S. und Sosio, M. (2004).** Glycopeptide resistance determinants from the teicoplanin producer *Actinoplanes teichomyceticus*. *FEMS Microbiol Lett* **240**, 69-74.
- Sevcikova, B. und Kormanec, J. (2004).** Differential production of two antibiotics of *Streptomyces coelicolor* A3(2), actinorhodin and undecylprodigiosin, upon salt stress conditions. *Arch Microbiol* **181**, 384-389.
- Shepherd, J. M. und Lloyd-Jones, G. (1998).** Novel carbazole degradation genes of *Sphingomonas* CB3. Sequence analysis, transcription, and molecular ecology. *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 129-135.
- Shieh, W. Y., Chen, Y. W., Chaw, S. M. und Chiu, H. H. (2003).** *Vibrio ruber* sp. nov., a red, facultatively anaerobic, marine bacterium isolated from sea water. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 479-484.
- Shieh, W. Y. und Jean, W. D. (1998).** *Alterococcus agarolyticus*, gen. nov., sp. nov., a halophilic thermophilic bacterium capable of agar degradation. *Can J Microbiol* **44**, 637-645.
- Shigemori, H., Bae, M. A., Yazawa, K., Sasaki, T. und Kobayashi, J. (1992).** Alteramide A, a new tetracyclic alkaloid from a bacterium *Alteromonas* associated with a marine sponge *Halichondria okadai*. *J Org Chem* **57**, 4317-4320.
- Sittig M. und Schlesner, H. (1993).** Chemotaxonomic investigation of various prosthecate and/ or budding bacteria. *System Appl Microbiol* **16**, 92-103.
- Sosio, M., Stinchi, S., Beltrametti, F., Lazzarini, A. und Donadio, S. (2003).** The gene cluster for the biosynthesis of the glycopeptide antibiotic A40926 by nonomurea species. *Chem Biol* **10**, 541-549.

- Sosio, M., Kloosterman, H., Bianchi, A., de Vreugd, P., Dijkhuizen, L. und Donadio, S. (2004).** Organization of the teicoplanin gene cluster in *Actinoplanes teichomyceticus*. *Microbiology* **150**, 95-102.
- Stachelhaus, T., Mootz, H. D. und Marahiel, M. A. (1999).** The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol* **6**, 493-505.
- Staley, J. T., Bont, J. A. und Jonge, K. (1976).** *Prostheco bacter fusiformis* nov. gen. et sp., the fusiform caulobacter. *Antonie Van Leeuwenhoek* **42**, 333-342.
- Stevenson, B. S., Eichorst, S. A., Wertz, J. T., Schmidt, T. M. und Breznak, J. A. (2004).** New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes. *Appl Environ Microbiol* **70**, 4748-4755.
- Stierle, A. C., Cardellina, J. H. und Singleton, F. L. (1988).** A marine *Micrococcus* produces metabolites ascribed to the sponge *Tedania ignis*. *Experientia* **44**, 1021.
- Streit, W. R. und Schmitz, R. A. (2004).** Metagenomics - the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol* **7**, 492-498.
- Tahlan, K., Park, H. U. und Jensen, S. E. (2004).** Three unlinked gene clusters are involved in clavam metabolite biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol* **50**, 803-810.
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., Dahllöf, I., Kjelleberg, S. und Steinberg, P. D. (2004).** Host specificity in marine sponge-associated bacteria, and potential implications for marine microbial diversity. *Environ Microbiol* **6**, 121-130.
- Taylor, M. W., Schupp, P. J., de Nys, R., Kjelleberg, S. und Steinberg, P. D. (2005).** Biogeography of bacteria associated with the marine sponge *Cymbastela concentrica*. *Environ Microbiol* **7**, 419-433.
- Teeyapant, R., Woerdenbag, H. J., Kreis, P., Hacker, J., Wray, V., Witte, L. und Proksch, P. (1993).** Antibiotic and cytotoxic activity of brominated compounds from the marine sponge *Verongia aerophoba*. *Z Naturforsch (C)* **48**, 939-945.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997).** The CLUSTAL_X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Thoms, C. (2004).** Alkaloide in Schwämmen der Gattung *Aplysina* - chemische Ökologie und assoziierte Bakterien. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- 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. und Banfield, J. F. (2004).** Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* **428**, 37-43.

- Unson, M. D., Holland, N. D. und Faulkner, D. J. (1994).** A brominated secondary metabolite synthesized by a cyanobacterial symbiont of a marine sponge and accumulation of the crystalline 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 Microscop Biol Cell* **23**, 271-288.
- Vacelet, J. und Donadey, C. (1977).** Electron microscope study of the association between some sponges and bacteria. *J Exp Mar Ecol* **30**, 301-314.
- Vandekerckhove, T. T. M., Willems, A., Gillis, M. und Coomans, A. (2000).** Occurrence of novel verrucomicrobial species, endosymbiotic and associated with parthenogenesis in *Xiphinema americanum*-group species (Nematoda, Longidoridae). *J Syst Evol Microbiol* **50**, 2197-2205.
- Van Pée, K. - H. und Ligon, J. M. (2000).** Biosynthesis of pyrrolnitrin and other phenyl pyrrole derivatives by bacteria. *Nat Prod Rep* **17**, 157-164.
- Van Pée, K. - H. (2001).** Microbial biosynthesis of halometabolites. *Arch Microbiol* **175**, 250-258.
- Van Pée, K. - H. und Unversucht, S. (2003).** Biological dehalogenation and halogenation reactions. *Chemosphere* **52**, 299-312.
- Van Wageningen, A. M., Kirkpatrick, P. N., Williams, D. H., Harris, B. R., Kershaw, J. K., Lennard, N. J., Jones, M., Jones, S. J. und Solenberg, P. J. (1998).** Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. *Chem Biol* **5**, 155-162.
- Venter, J. C. und 22 weitere Autoren (2004).** Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* **304**, 66-74.
- Vogel, S. (1977).** Current-induced flow through living sponges in nature. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 2069-2071.
- Waksman, S. A. und Henrici, A. T. (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol* **46**, 337-341.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J. und Colwell, R. R. (1987).** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* **37**, 463-464.
- Webster, N. und Hill, R. T. (2001).** The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an α -proteobacterium. *Mar Biol* **138**, 843-851.
- Webster, N. S., Wilson, K. J., Blackall, L. L. und Hill, R. T. (2001).** Phylogenetic diversity of bacteria associated with the marine sponge *Rhopaloeides odorabile*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 434-444.
- Webster, N. S., Negri, A. P., Munro, M. M. und Battershill, C. N. (2004).** Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environ Microbiol* **6**, 288-300.

- Wehrl, M., Steinert, M. und Hentschel, R. (im Druck). Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb Ecol*
- Wexler, M., Bond, P. L., Richardson, D. J. und Johnston, A. W. (2005). A wide host-range metagenomic library from a waste water treatment plant yields a novel alcohol/aldehyde dehydrogenase. *Environ Microbiol* **7**, 1917-1926.
- Wilkinson, C. R., Garrone, R. und Vacelet, J. J. (1984). Marine sponges discriminate between food bacteria and bacterial symbionts: electron microscopy radioautography and in situ evidence. *Proc Royal Soc London B* **220**, 519-528.
- Wu, J. J., Schuch, R. und Piggot, P. J. (1992). Characterization of a *Bacillus subtilis* sporulation operon that includes genes for an RNA polymerase sigma factor and for a putative DD-carboxypeptidase. *J Bacteriol* **174**, 4885-4892.
- Wynands, I. und van Pee, K. H. (2004). A novel halogenase gene from the pentachloropseudilin producer *Actinoplanes* sp. ATCC33002 and detection of in vitro halogenase activity. *FEMS Microbiol Lett* **237**, 363-367.
- Yeh, E., Garneau, S. und Walsh, C. T. (2005). Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 3960-3965.
- Yu, T. W., Bai, L., Clade, D., Hoffmann, D., Toelzer, S., Trinh, K. Q., Xu, J., Moss, S. J., Leistner, E. und Floss, H. G. (2002). The biosynthetic gene cluster of the maytansinoid antitumor agent ansamitocin from *Actinosynnema pretiosum*. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 7968-7973.
- Yun, J., Kang, S., Park, S., Yoon, H., Kim, M. J., Heu, S. und Ryu, S. (2004). Characterization of a novel amylolytic enzyme encoded by a gene from a soil-derived metagenomic library. *Appl Environ Microbiol* **70**, 7229-7235.
- Zaehner, H. und Fiedler, H. P. (1995). The need for new antibiotics: possible ways forward, p. 67-84. In: N. J. Russel (ed.), Fifty years of antimicrobials: past perspectives and future trends. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Zhang, Z., Wang, Y. und Ruan, J. (1997). A proposal to revive the genus *Kitasatospora* (Omura, Takahashi, Iwai and Tanaka 1982). *Int J Syst Bacteriol* **47**, 1048-1054.
- Zehner, S., Kotzsch, A., Bister, B., Süßmuth, R. D., Mendez, C., Salas, J. A. und van Pee, K. H. (2005). A regioselective tryptophan 5-halogenase is involved in pyrroindomycin biosynthesis in *Streptomyces rugosporus* LL-42D005. *Chem Biol* **12**, 445-452.
- Zerbe, K., Pylypenko, O., Vitali, F., Zhang, W., Rousset, S., Heck, M., Vrijbloed, J. W., Bischoff, D., Bister, B., Süßmuth, R. D., Pelzer, S., Wohlleben, W., Robinson, J. A. und Schlichting, I. (2002). Crystal structure of OxyB, a cytochrome P450 implicated in an oxidative phenol coupling reaction during vancomycin biosynthesis. *J Biol Chem* **277**, 47476-47485.
- Zheng, L., Yan, X., Xu, J., Chen, H. und Lin, W. (2005). *Hymeniacidon perleve* associated bioactive bacterium *Pseudomonas* sp. NJ6-3-1. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **41**, 35-39.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
ASW	artifizielles Seewasser
ATP	Adenosintriphosphat
b/ bp	Base(n), -paare(e)
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CMFASW	kalzium- und magnesiumfreies Seewasser
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
h	Stunde
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
H ₂ O _{dd}	zweifach destilliertes Wasser
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
l	Liter
m	Meter
M	molar
min	Minute
mol	Mol
NMR	“Nuclear-Mass-Resonance”

OD	Optische Dichte
ORF	“open reading frame”
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PFGE	“Pulsfeld Gelelektrophorese
rDNA	ribosomale DNA
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtempertatur
SDS	„Sodium dodecylsulfat“
sec	Sekunde
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt

8.2 Sequenzierprimer

Tabelle 24 Während der Sequenzierung des Glycopeptid-Biosyntheseclusters aus *Streptomyces* sp. Pol001 verwendete Oligonukleotide.

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
D15for1	GGCCAGCTGGTCTTCGTC	60
D15for2	GCAGGTGTTCTGAAGAAAGGA	59
D15for2n	AAGGGGCTGGAAGTACCT	60
D15for3	GCTGATGAACTGCACCTGA	59
D15for4	ACCAGTCGGCACTCATGG	60
D15for5	TGGAGCGGCTGGTCAC	60
D15for5n	CACCGAGCCCGATGTG	60
D15for6	GGTGGCCATGGACAGGT	60
D15for7	GTACGCCAGGCAGTCGAG	60
D15for7n	CCGGGTCCTGCTCACC	60
D15for8	AGCCCGGCAGGAACT	60
D15for8n	GACCGAGACGACCCTGTG	60
D15for8n2	ACCTACGGACCGACCGAGA	60
D15for9	GAACCTGGCCCTGGTCCT	60
D15for10	TCCACCAGCACATTCAAGAC	59
D15for11	GTTGATGGACACAGCGGATT	60
D15for12	GTCCTGGACGACTCCGAAC	60
D15forlaufP4	GATCGACCGGAACGAACAC	60
D15forlaufP4w1	CATGGACAGCGGATAGTGC	59
D15forlaufP4w2	GTAGGCCGCCAGCACCT	60
D15forlaufP4w3	GCCGGTCAACATCTCCAG	59
D15forlaufP4w3n	GAAGTCCGATGGCGTGTG	60
D15forlaufP4w4	CAGCACCTCGTGGACACC	60
D15forlaufP4w5	CGGTCCGACACGATCAG	59
D15forlaufP4w5n	GGCCTCGACCCTCTCG	60
D15forlaufP4w5n2	ACCCACACCGCCCTGAT	60
D15forlaufP4w6	CCTTCCCGGTGAACTCC	58
D15forlaufP4w6n	CTCGGCCTCGGTACGC	60
D15forlaufP4w7	GTAGAGCTCGCCGGTCAC	59
D15rev1	CTCGTCGCGTCTCACAC	60
D15rev2	CCGTGAAGTCTGCTCCTT	59
D15rev3	AGGAGGTGAGATCTGAGGA	58
D15rev4	GGCCGGGAGGAGGTC	60

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
D15rev4n	GAAGGGCCGGGAGGA	60
D15rev4n2	GAGCGTCCGCACGAG	58
D15rev5	CTTCGCCCTCCCGTA	60
D15rev6	CAGGGCGAACTCGGACAT	60
D15rev7	ACCGCGGTCTCCATGTC	60
D15rev8	GCGTCCTCGAAGGTGGT	59
D15rev9	CCCATGGTCATCAGTACGC	59
D15rev10	TTCAGACCCGCATTGCAT	60
D15rev11	CTCAACGGATGCCATGAAC	59
D15rev12	GAGGACGTCTCCGCCACT	60
D15/L12w1	CGTATACTGGACGCCCAACT	59
D15mitrechts1	ACCGATGAGGTCTTGTATCG	57
D15mitrechts1n	GCAGCCTCCATCATGTCTG	60
D15mitrechts2	AACTCCTGGTAGGCGGACTC	59
D15mitrechts3	CAGCATCCCCTCAAGCAC	60
D15mitrechts4	GCCGACCTCTCATCGTTC	59
D15mitrechts5	GGTCACGATCTGCTCGATGT	60
D15mitrechts6	CCCTGGTGATGTCGAACC	59
D15mitrechts7	ACGCCAGAACTTGTTTCC	59
D15mitlinks1	TGCTTCGTGGACCCAATATAC	59
D15mitlinks1n	TCCTACCAGCAGACGACTTTC	58
D15mitlinks2	CAGTTCTCCTCCCGGTTTTTC	60
D15mitlinks3	CTGGCCAAGGTCGGTGT	60
D15mitlinks3n	GTGGGGTTGCGGGAAC	60
D15mitlinks4	AGTTGGAGGCGTTCTTGGAT	60
D15mitlinks4n	GATCCTGCCGGACGAA	59
D15mitlinks4n2	GCAGCCGACGGACCTC	60
D15mitlinks4n3	CGGCTACACCGATCATCC	59
D15mitlinks5	ACACAGAGCCGGCGAAC	60
D15mitlinks5n	TGTCCCCGTGTGAACCAC	60
D15mitlinks6	CCGATTCCTTGATGCCATT	60
D15mitlinks6n	ATCGCCGAAAAGAAGACATC	58
D15mitlinks7	GGCTACAGCGAAAAGACCTG	59
D15mitlinks8	AGGGGGATATGAGCGACTTC	59
N11for1	CAGTTGCGACAGCACGAC	60
N11for2	CATGCCGGTCCACGAC	60

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
N11for3	CCGATCCCACGAGCAG	59
N11for3n	AAGGTCACCGCCAGCTC	59
N11for3n2	GATCGACCGGAACGAACAC	60
N11for4	GGTAGTTCTCGAACACCACGA	59
N11for5	AGGGTCCAGGCGAGATAGTC	59
N11for6	ATGTGATGCGACGTGAAGAC	59
N11rev1	GTTGAAGGCGGCGTGAT	60
N11rev2	TGGTGAGTGCCCACGAG	60
N11rev3	ACGACGGTCGGCAGTG	60
N11rev3n	CCTGCAACGCGGACTT	59
N11rev4	CAATGACCGGCGAAGC	59
N11rev4n	CGACGACTTCGGCGATCT	60
N11rev4n2	GGCAGGGGCGGTAC	60
N11rev4n3	CCTGGACGGCGTAGTCAT	59
N11rev4n4	CGAAGGCGACGAAGAGG	60
N11rev5	AGTTCGCGGCATCAGGTC	60
N11revlauf17P4	GTTGGTCGTCCACCTGAAG	58
N11revlauf17w	GGACACGCCTGGTACAGCTA	60
N11revlauf17w2	ATCCGGACGTTTCGTACGTT	59
N11revlauf17w3	AGCGTTTCAGTGGCTTCTTC	58
N11revlauf17w4	GCAGGAGGAAGACCCACAC	60
N11revlauf17w5	GATGTGTTTGGCGATCTCGT	60
N11revlauf17w6	CGGAATCCAGGCACGTC	60
N11revlauf17w7	CGTTATGCAAGATCCGTTCC	59
N11revlauf17w8	CCGTATGTTTCGCTCGAC	59
N11revlauf17w9	GTATGCACGCCTGTTCTTGG	60
N11revlaufD15	GTTGGTCGTCCACCTGAAG	58
P4for1	ACCTGGCAAATCGGATAGTG	59
P4for2	TCTGGTCCCGTAAAGTCTGC	59
P4for3	GGGCGTGGGGAAGAGC	60
P4for3n	CCGGGCACCAGGATG	60
P4for4	CCAGCCCACCAGACG	60
P4for5	CAACAGCCCGCACCAG	60
P4for5n	GGGCGTGGGGAAGAGC	60
P4for5n2	GTATCCGCTGAACAGCCAAC	60
P4for5n3	ACATCGTGCGGTTCCATAAT	59

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
P4for6	GACCCCTTGGACGATTGAC	59
P4for7	GAACCACGGGCAGGAAAC	60
P4for8	CCGATCGACCGTTACTACCT	58
P4for9	GTATCGCAGCCGAGGAACT	59
P4for9n	GATTACTGGCGGCCACTTC	59
P4for10	CGCCTGCCAGGACGAG	60
P4for11	GCCGAGTGCTCACCTACTTT	58
P4forlaufI7	TGTGCGATAGATGGTCTTGG	59
P4forlaufI7w1	GAGGTCCAGACGGATCACTT	58
P4forlaufI7w1n	GATATCACAGCCGGCATAGG	59
P4forlaufI7w2	GTCGAGGCAGTTGATGAGAC	58
P4forlaufI7w3	ACCACTCCGACAGTCAGGTC	59
P4forlaufI7w4	TCGCATCCATAGACGGTGAT	60
P4forlaufI7w4n	GTCGAGACAGCCCGTGAG	60
P4forlaufI7w4n2	AAGAGAAGTGCCTCGTCCTG	59
P4forlaufI7w4n3	ATACCGCTTCCGTCGTGAG	60
P4rev1	GAAGGGTTGTGCGGAGTC	59
P4rev2	TTCCAGAGGTTTCGCATCAC	60
P4rev3	CCTACGACGACCAGGGTTT	59
P4rev4	CGACCCGCTCGAAGG	60
P4rev5	GGTGCTCCTTTTCCGAGAGT	60
P4rev6	ACACAGCACCTTCTCGGTCT	59
P4rev7	GCTCGATCGGCTTCCAC	60
P4rev8	ATCAGCACGCCATCGAC	59
P4rev8n	GTCGCGTGATCAGCA	60
P4rev9	CGGTCGCGTTCCATTC	59
P4rev9n	AACATCCCGACCACGGACT	60
P4rev10	TGCACGATGCTGTTTCAGAGT	60
P4rev11	GCTGACATAGCGGAAGCAG	59
P4rev12	GCGGGCATCATGTACTCC	59
I7for1	GCACCGGCACTCACG	59
I7for2	ACGTACATGTTCCGCACGAT	60
I7for3	GGGACGTGCTGGACGA	60
I7for3n	CGACCGTGCCGAGACC	60
I7for4	ATTGTGGTCGCTCACAGCTA	58
I7for4n	AGCTGCGGCGAGACG	60

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
I7for4n2	GAGCGAGGGGTGCTGAG	60
I7for5	GGTACGCCATACTGGTGCTG	60
I7for5n	TGGTCGCTCACAGCTACG	59
I7for5n2	ATCGTCACGGCGGAAG	59
I7for6	AGGTGCCCTCGACGTATCT	59
I7for7	GTATGTGGATCCCCAGGACA	59
I7for8	GGTGGTGTGCCTGCTCTG	60
I7for9	ACACCTCCTACGCCCTGAC	59
I7for10	CGGGGAGTGGGTGGT	60
I7for11	CGCCTCCCTGCTGGAT	60
I7for12	GTCCCGGCGCTGATCTAT	60
I7for13	CTGGTCATCTCGGCGAAC	60
I7rev1	GATCCCGGGCAGCTC	58
I7rev2	ATTCCGTCACGTCCACCA	60
I7rev3	GTCCTGGACGATCACGTTG	59
I7rev4	GGCACCGTCCATGACC	59
I7rev5	ACCACCCACTGGGCAAAC	60
I7rev6	GGTGGTCGGACAAAACAGAC	59
I7rev7	CTCGGCCAACGACACCT	60
I7rev8	CAGCACAGTGGCCAATCC	60
I7rev8n	CAAGGACACGCCCAGAAT	59
I7rev9	GGCCGACCTCTGGATCTC	60
I7revlaufP4	CACACCTTCACCGAGCTG	58
I7revlaufP4w1	GAGGTACCGGCACAGACG	59
I7revlaufP4w1n	GATTCCGAACGGCAACAG	59
I7revlaufP4w2	GAAGTGCATGGCAATCG	59
I7revlaufP4w3	GGAACCAGGAAGGGGAGTT	59
I7revlaufP4w4	CACATCCAGTGTGATCTCC	58
I7revlaufP4w5	GGTTGCGTTCGGTGAA	57
L12for1	TGGACCACATCCTCAACAAG	59
L12for2	ACGTCATCGACCGGGTTC	60
L12for3	GTCACCGTGGCTGTCCTC	60
L12for3n	GGTCTCGCTGGGATTCCT	59
L12for3n2	GTCACCGTGGCTGTCCTC	60
L12for4	GACAAACCCGATCAGCTCTC	59
L12for5	CACATCCACACCGAGCAC	59

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
L12rev1	CCTACCGCGTGATCAAGGT	60
L12rev2	CCCGTCAACCGGGACTAT	60
L12rev3	ACCGACCGCCTGATGAT	59
L12rev4	GTTGCCCTCCTACCTGGTTC	60
L12rev5	CTTCTGGTCCGTGTTCTCG	58
L12rev6	GACACCGTCGTGGAGGAG	60
L12rev7	GACACCGTTGATGCGAAAT	59
L12rev8	GCTCGGGATCGATCACTTC	60
L12rev9	GCGAGATCTGGGATTCCTC	60
L12rev10	ACACCGCACGCGAGTT	60
L12rev11	GTTTCATGGCATCCGTTGAG	59
L12rev11n	TTGAAACCCCGGGAATGT	60
L12rev12	CTGAACGCGCTCAACGTG	60
L12rev12n	ATGCAATGCGGGTCTGAAC	60
S180.1links	GTCCAGCTCGACCGACTC	59
S180.1rechts	GGTTGACGAGGGCGTATCT	59
S180.3links	GCCGAGCGAAAACCTCTT	59
S180.3rechts	TCACCACACCCTGATCGAC	60
S180.5+6links	ACGAGCAAGGTGTCGAAGAC	59
S180.5+6rechts	CGTACGTCCCGGTGGAT	59
A1for	GACCTGGTGGTSRCGCTG	59
A2rev	RCCGTCSGCGGTCCACTG	60
B1for	TCTGGCCKCTGTCCRCCRC	55
B2rev	CARCGCCASGCGCCCTG	60
B3for	TGTTCTCAACACCGTBC	55
B4rev	SGASGTGTACATCACGTA	45
B5for	GTCGACGCGGTSTCSTG	58
B6rev	TCTGGTAGACGTCSACGC	51
GlyMod1Afor	CCGCCCCACGGGTNGCNTTTYRT	60
GlyMod1Cfor	GCGGACCTGGCCTACGTNATGTAYAC	60
GlyMod1Frev	TGGGCGGGCACACRTCNCNCC	60
GlyMod1Hrev	GCGCGCGGACAGGTANARRTCNCC	60
NRPS1anflinks	GGCCAACAACCTCCTCGTG	59
NRPS1anflinks2	GGAGTTCGGGTTCGTACAGC	60
NRPS1anflinks3	GGCCATCAGCGTCATCAT	60
NRPS1anfrechts	GACGGTGAGTTGCTGTTCG	60

Tabelle 24 Fortsetzung

Oligonukleotid	Sequenz 5' - 3'	Annealingtemp. [°C]
NRPS1mitlinks	CGTCCACCACGATCACAG	59
NRPS2anfinks	GCCGTACATGATCGTGTGGT	60
NRPS2anfinks2	ATGCCGCGCAGAAGAATC	60
NRPS2anfrechts	ATCTCTACGGCCCCGACTGAG	60
NRPS2anfrechts2	ACCTGATCGGATACGTGGTC	59
NRPS2anfrechts3	ACAAGAGGCCCTGACGACAC	60
NRPS2mitlinks	GATCGTGCTCTCGCTGAAC	59
NRPS2mitlinks2	CGAGCTCATCGAGGTCTCC	60
NRPS2mitrechts	GTCCGACTTCGACCTCGTC	60
NRPS2mitrechts2	GGAGCGGTTCGATGTGAC	59
NRPS2mitrechts3	GCGCGGTCTTCGACAC	60
NRPS2mitrechts3n	CGGCGTTGATGGAGCAT	60
NRPS2mitrechts3n2	GACCTGCAGAGGCGTCAAT	60
NRPS2mitrechts4	CTGTCCTACGCCGACCTC	59
I7for060206links	CGATCTGCTCCGGAGTTTC	60
S188.11	GAACGCCGCGGTCAGTA	60

8.3 Veröffentlichungen

Scheuermayer, M., Pimentel-Elardo, S., Fieseler, L., Grozdanov, L. und Hentschel, U. (2006). Microorganisms of sponges: Phylogenetic diversity and biotechnological potential. *In: frontiers in marine biotechnology*, P. Proksch and W. E. G. Mueller (Eds.), Horizon Scientific Press, UK, pp 289-312.

Scheuermayer, M., Gulder, T. M., Bringmann, G. und Hentschel, U. *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum *Verrucomicrobia*, isolated from a sponge (*Porifera*). *Int J Syst Evol Microbiol*, im Druck.

Scheuermayer, M., Fieseler, L. und Hentschel U. Novel FADH₂-dependent halogenase genes from sponge associated microbial consortia. Manuskript in Vorbereitung.

8.4 Tagungsbeiträge

Metagenomic Library Construction Reveals Novel FADH₂-Dependent Halogenase Genes From Marine Sponge-Associated Microbial Consortia. M. Scheuermayer, L. Fieseler, K.-H. van Pée und U. Hentschel. XI Symposium on Marine Natural Products, September 2004, Sorrent, Italien. Poster.

Metagenomic Library Construction Reveals Novel FADH₂-Dependent Halogenase Genes From Marine Sponge-Associated Microbial Consortia. M. Scheuermayer, L. Fieseler, K.-H. van Pée und U. Hentschel. Joint Meeting des SFB630 "Identification, extraction and functional analysis of agents against infectious diseases" und des SFB544, November 2004, Würzburg, Deutschland. Poster.

Metagenomic Library Construction Reveals Novel FADH₂-Dependent Halogenase Genes From Marine Sponge-Associated Microbial Consortia. M. Scheuermayer, L. Fieseler, K.-H. van Pée und U. Hentschel. 17. Irseer Naturstofftage der Dechema, Februar 2005, Irsee, Deutschland. Poster.

***Rubromonas marinus*, the first marine representative of subdivision one of the *Verrucomicrobia*, isolated from a sponge.** M. Scheuermayer und U. Hentschel. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), März 2006, Jena, Deutschland. Poster.

Novel FADH₂-dependent halogenase genes form sponge associated microbiota by ways of metagenomic library construction. M. Scheuermayer und U. Hentschel. Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), März 2006, Jena, Deutschland. Vortrag.

8.5 Expeditionen

Aufenthalt am Ruder Boscovic Institut, Rovinj, Kroatien, im August 2002.

Aufenthalt am Laboratoire Arago, Banyuls-sur-Mer, Frankreich, im April 2003.

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Matthias Scheuermayer
Geburtsdatum	14.03.1976
Geburtsort	Lichtenfels

Schulbildung

Sep. 1982 – Juli 1986	Grundschule, Lichtenfels
Sep. 1986 – Juni 1995	Meranier-Gymnasium, Lichtenfels
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

Juli 1995 – April 1996	Stationierung in Mellrichstadt und Donauwörth
------------------------	---

Diplomstudium

Okt. 1996 – Jan. 2002	Studium der Biologie an der Universität Würzburg Schwerpunkte: Biochemie, Pharmazeutische Biologie und Pflanzenphysiologie
Jan. 2001 – Jan. 2002	Diplomarbeit: „Analyse der Replikator-Protein-Interaktion im Chromosom der Maus“ am Institut für Biochemie der Universität Würzburg bei Prof. Dr. F. Grummt

Promotionsstudium

seit April 2002	Dissertation zum Thema: „Phylogenie, Sekundärmetabolismus und biotechnologisches Potential mariner, Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen“ am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg bei Erstbetreuerin PD Dr. Ute Hentschel.
-----------------	---

8.7 Danksagung

Mein Dank für das Gelingen dieser Arbeit richtet sich an folgende Personen:

Meiner Betreuerin PD Dr. Ute Hentschel für ihr stetes Interesse und für die Tatsache, dass sie immer Zeit für ein Gespräch auch abseits der Arbeit für ihre Mitarbeiter hat. Besonders möchte ich ihr dafür danken, dass sie mich auch mit einem „Nicht-Schwamm-Hintergrund“ als Doktorand aufgenommen hat. Prof Dr. Joachim Reidl möchte ich für die Übernahme des Zweitgutachtens danken. Prof Dr. Jörg Hacker möchte ich für die Möglichkeit danken, an „seinem“ Institut arbeiten zu können.

Für gute Kooperationen möchte ich Tobias Gulder und Prof Dr. Gerhard Bringmann vom Institut für Organische Chemie der Universität Würzburg, Claudia Kittel und Prof Dr. Wolfgang Wohlleben vom Institut für Mikrobiologie der Universität Tübingen und Prof Dr. Karl-Heinz van Pee vom Institut für Chemie der Technischen Universität Dresden danken.

Den Würzburger „Schwammologen“ möchte ich für die schöne Zeit im Labor danken. Lars für seine Begeisterungsfähigkeit, Tine für Hilfe in allen Lebenslagen, Susanne für die Phylogenie, Frau 1KB für Hilfe wenn ich sie nicht verdient habe, Markus für Mamas Kuchen, Lubo für den bulgarischen Humor und Alexander für Hilfe, die ich ihm nie zurückgezahlt habe. Allen anderen „Schwämmen“ danke ich natürlich ebenso.

Die restlichen Anwohner des Röntgenrings 10 und 11 sollen natürlich nicht vergessen werden. Danke für die gute Atmosphäre und Hilfe, wenn sie nötig war. Besonders möchte ich Barbara, Claudia, Martin, Stefan und Suse für alles das danken, was über die Arbeit hinausging.

Stefan, Kristina, Astrid, Kerstin, Frank und Julie möchte ich für ihre langjährige Freundschaft danken.

Meiner Familie danke ich für ihre Unterstützung und für die Möglichkeit, eine solch lange Zeit zur „Schule“ zu gehen.

Zu guter Letzt danke ich Petra für ihre Liebe und dafür, dass sie meine Macken jeden Tag aufs Neue erträgt.