

Einzelzell-basierte Methoden zur Charakterisierung Schwamm-assoziiierter Bakterien



Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der

Julius-Maximilians-Universität

Würzburg

vorgelegt von

Alexander Siegl

aus

Füssen

Würzburg, April 2009

Eingereicht am:

Mitglieder der Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Martin Müller

1. Gutachter: Prof. Dr. Ute Hentschel

2. Gutachter: Prof. Dr. Roy Gross

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

ERKLÄRUNG

gemäß § 4 Abs. 3 Ziff. 3, 5 und 8

der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie der

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, April 2009

(Alexander Siegl)

Danksagung

Mein herzlicher Dank richtet sich an folgende Personen:

Prof. Ute Hentschel für die herzliche Betreuung während dieser Doktorarbeit, sowie den steten Glauben, dass ich den richtigen Bahnsteig mit dem Zug Richtung ‚Verteidigung‘ finden werde.

Prof. Roy Gross für die freundliche und unkomplizierte Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Jörg Hacker als ehemaligem und **Prof. Matthias Frosch** als kommissarischem Leiter des Zentrums für Infektionsforschung an der Universität Würzburg für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Daniela, Hilde, Kristina, Lars, Lubo, Markus, Matthias, Paula, Sheila, Susanne, Svetlana, Tine, Usama, Volker sowie allen anderen jetzigen und ehemaligen Kollegen und Freunden des Schwammlabors sowie aus der gesamten Infektionsbiologie an der Universität Würzburg. Nicht zuletzt die sehr familiäre Atmosphäre am IMIB / ZINF sowie die richtige Mischung aus Herz, Verstand und nicht zuletzt Humor unter meinen Kollegen hat mir stets die Zeit versüßt!

Prof. Franz Brümmer (Universität Stuttgart) sowie dessen Mitarbeitern für die gute Zusammenarbeit während gemeinsamer Exkursionen nach Kroatien und das Bereitstellen von lebenden Schwämmen. **Prof. Renato Batel** sowie allen Mitarbeitern am Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj, Kroatien für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die freundliche Zusammenarbeit und Unterstützung bei Experimenten. **Draško** für den besten Kaffee der Welt.

Prof. Stephen Giovannoni (Oregon State University, Corvallis, USA) für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes während eines fünfwöchigen Forschungsaufenthaltes. Ihm sowie allen seinen Mitarbeitern, insbesondere **Kevin Vergin** und **Dr. Ulrich Stingl**, für die außerordentliche Gastfreundschaft.

Prof. Frank Oliver Glöckner (MPI Bremen) für die stetige Diskussionsbereitschaft und ein immer offenes Ohr.

Prof. Max Häggblom (Rutgers School of Environmental and Biological Sciences, New Brunswick, USA) für die freundliche Kooperation und die interessanten Diskussionen über dehalogenierende Schwammbakterien.

Dr. Berthold Fartmann (Agowa, Berlin) für seine monatelange Geduld beim schwersten Puzzle aller Zeiten (die Assemblierung der Cosmidsequenzen). Für all das Wissen, das er mir selbstlos in der besten Privatvorlesung von Welt vermittelt hat.

Christian Linden (Universität Würzburg) für die Unterstützung bei der FACS-Analyse Schwamm-assoziiierter Bakterien.

Dr. Michael Richter (Ribocon, Bremen) für seine Unterstützung bei der Annotation.

Prof. Thomas Dandekar (Universität Würzburg) und Mitarbeitern für ihre Hilfe bei der Rekonstruktion von Stoffwechselwegen, sowie **Prof. Jörn Piel** und **Thomas Hochmuth** (Universität Bonn) für ihre Unterstützung bei der Analyse von Sekundärmetabolismus-assoziierten Genen.

Dr. Roger Lasken (J. Craig Venter Institute, Rockville, USA) und **Dr. Tanja Woyke** (DOE Joint Genome Institute, Walnut Creek, USA) für fruchtbare Diskussionen über ‚whole genome amplifications‘ und das freundliche Bereitstellen hilfreicher methodischer Tipps.

Meinen **Eltern** dafür, dass sie mich immer haben machen lassen. **Familie und Freunden** für die jahrelange Unterstützung. Auch oder gerade weil dabei nicht immer Arbeit das vorrangige Thema war. Und **Claudia!**

Die Wissenschaft ist der Verstand der Welt, die Kunst ihre Seele.

(Maksim Gorkij)



Yves Klein, Relief éponge // Schwammrelief, 1960

(© VG BILD-KUNST, BONN 2009)

1. Zusammenfassung	19
Summary	21
2. Einleitung	23
2.1. Schwämme – das Phylum Porifera	23
2.1.1. Taxonomie	24
2.1.2. Morphologie und Lebensweise	25
2.2. Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme	26
2.2.1. Bakterienhaltige und bakterienfreie Schwämme	27
2.2.2. Das Schwamm-spezifische mikrobielle Konsortium	28
2.2.3. Das Candidatus Phylum <i>Poribacteria</i>	30
2.3. Primär- und Sekundärstoffwechsel Schwamm-assoziiierter Bakterien	32
2.4. Methoden zur Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Bakterien	34
2.4.1. Kultivierung	36
2.4.2. 16S rRNA-Gen basierte Studien	36
2.4.3. Metagenomik	37
2.4.4. Einzel-Zell-basierte Methoden	38
<i>„Dilution-to-extinction“</i>	39
<i>Vereinzelung von Bakterien mittels FACS</i>	39
<i>„Whole genome amplification“ und Einzel-Zell-Genomik</i>	40
2.5. Zielsetzung	41
3. Methoden	43
3.1. Sammeln und Hältern von <i>Aplysina aerophoba</i>	43
3.2. Isolierung des mikrobiellen Konsortiums aus <i>Aplysina aerophoba</i>	43
3.3. Allgemeine nukleinsäureanalytische Methoden	44
3.3.1. Isolierung genomischer DNA	44
3.3.2. Elektrophoretische Methoden	45
3.3.3. DNA-Konzentrationsmessung	46
3.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	46

3.3.5. Herstellung kompetenter Zellen	48
3.3.6. Klonierung von PCR-Produkten	48
3.3.7. Plasmid-Mini-Präparation	50
3.3.8. DNA-Sequenzierung	50
3.3.9. Sequenzauswertung	51
3.3.10. Phylogenetische Analysen	52
3.4. Mikrobielle Kultivierung mittels ‚dilution-to-extinction‘	52
3.4.1. Verdünnung des mikrobiellen Konsortiums	53
3.4.2. Herstellung von Flüssigmedien	54
3.4.3. Inokulation und Inkubation	55
3.4.4. Mikroskopische Auswertung	55
3.4.5. Phylogenetische Klassifizierung von Isolaten	56
3.5. Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS	57
3.6. ‚Whole genome amplification‘ von vereinzelt Schwammbakterien	58
3.6.1. Einzel-Zell-Lyse	59
3.6.2. Einzel-Genom-Amplifizierung	59
3.6.3. Phylogenetische Klassifizierung und funktionelles ‚screening‘	60
3.7. Cosmidklonierung eines WGA-Produkts	61
(<i>Poribacteria</i> 16S rDNA-, <i>Chloroflexi</i> 16S rDNA-, PKS-, NRPS-positiv)	
3.7.1. Enzymatische Vorbehandlungen	61
3.7.2. Klonierung in pWEB	63
3.7.3. Verpackung in T1-Phagen	64
3.7.4. Transfektion von <i>Escherichia coli</i> EPI100-T1 ^R	64
3.7.5. Archivierung der Cosmidbank	64
3.7.6. Endsequenzierung von Cosmidklonen	65
3.7.7. Cosmid-Mini-Präparation	65
3.7.8. ‚Screening‘ der Cosmidbank auf 16S rRNA- und funktionelle Gene	65
3.7.9. Komplet-Seqenzierung ausgewählter Cosmidklone	66
3.7.10. Sequenzannotation und Sequenzanalyse	67
3.8. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms	68
3.8.1. 454-Sequenzierung	68

3.8.2. Automatische Sequenzannotation	69
3.8.3. Sequenzauswertung mittels ‚JCoast‘	70
4. Ergebnisse	71
4.1. Kultivierung mittels ‚dilution-to-extinction‘	71
4.2. Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS	76
4.3. Erstellung einer Cosmidbank mit WGA-Produkten	80
<i>(Poribacteria 16S rDNA-, Chloroflexi 16S rDNA-, PKS-, NRPS-positiv)</i>	
4.3.1. ‚Whole genome amplifications‘ (WGAs)	80
4.3.2. Phylogenetische Klassifizierung der Ausgangs-DNA	81
4.3.3. Eigenschaften der Cosmidbank WGA-A4	84
4.3.4. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1i19 (<i>Chloroflexi</i> 16S rRNA Gen)	86
4.3.5. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1n22 (NRPS)	90
4.3.6. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1k6 (PKS)	96
4.3.7. PCR-Screening zur phylogenetischen Zuordnung von NRPS und PKS	100
4.4. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms	103
4.4.1. Phylogenetische Klassifizierung der Ausgangs-DNA	103
4.4.2. Maximierung der DNA-Ausbeute	105
4.4.3. Rohdaten der 454-Sequenzierung	106
4.4.4. Eckdaten der automatischen Annotation	107
4.4.5. ‚Contig‘ c00110 (<i>Poribacteria</i> 16S rDNA-positiv)	114
4.4.6. Analyse des poribakteriellen Primärmetabolismus	115
<i>Glykolyse</i>	115
<i>Pentosephosphatweg</i>	117
<i>Citratzyklus</i>	118
<i>Weitere Stoffwechselwege des Primärmetabolismus</i>	119
4.4.7. Analyse des poribakteriellen Sekundärmetabolismus	120
<i>Sup-PKS</i>	120
<i>Typ I Polyketidsynthase WcbR</i>	122

5. Diskussion	125
5.1. Kultivierung Schwamm-assoziiierter Bakterien mittels ‚dilution-to-extinction‘	125
5.2. Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS	128
5.3. Die Cosmidbank WGA-A4	131
5.3.1. Lub-NRPS und <i>Chloroflexi</i>	133
5.3.2. Sup-PKS und <i>Poribacteria</i>	138
5.4. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms	142
5.4.1. Das genomische Repertoire der <i>Poribacteria</i>	143
5.4.2. Vergleich mit dem poribakteriellen Metagenomklon 64K2	143
5.4.3. <i>Poribacteria</i> versus PVC-Superphylum	148
5.4.4. Die Assoziation der <i>Poribacteria</i> mit marinen Schwämmen	152
6. Ausblick	157
7. Literaturverzeichnis	159
8. Anhang	173
8.1. Abkürzungsverzeichnis	173
8.2. Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme, Kits	175
8.3. Lösungen, Medien, Puffer	180
8.4. Verwendete Mikroorganismen und Vektoren	184
8.5. Verwendete Oligonukleotide	185
8.6. Größenstandards für Gelelektrophoresen	187
8.7. Programme, Software, Online-Tools	187
8.8. 454-Rohdaten	190
9. Publikationen	201
10. Tagungsbeiträge	202
11. Workshops	204

12. Forschungsaufenthalte **204**

13. Lebenslauf **205**

1. Zusammenfassung

Schwämme (Phylum Porifera) sind der älteste rezente Tierstamm der Erde. Insbesondere marine Vertreter dieser sessilen Invertebraten sind oftmals mit einem mikrobiellen Konsortium assoziiert, welches hochgradig wirtsspezifisch und phylogenetisch divers ist. Die Biomasse dieser Mikroflora kann dabei rund die Hälfte der Masse eines Schwamms ausmachen. Die Komplexität des Konsortiums sowie der Mangel an kultivierbaren Vertretern der Schwamm-spezifischen Klade erschwert dabei eine gezielte funktionelle Charakterisierung. Von besonderem Interesse hierbei ist das exklusiv in marinen Schwämmen vorzufindende Candidatus Phylum *Poribacteria*, für das bislang kein kultivierter Vertreter vorliegt. Die metabolisch aktiven und hochabundanten Poribakterien liegen in der extrazellulären Matrix des Schwammes vor und zeichnen sich durch das Vorhandensein einer Nukleoid-ähnlichen intrazellulären Struktur aus.

Ziel dieser Promotionsarbeit war es, neue Einzelzell-basierte Methoden auf das Gebiet der funktionellen Charakterisierung von Bakterien anzuwenden, welche spezifisch mit dem mediterranen Schwamm *Aplysina aerophoba* assoziiert sind. Dabei wurden sowohl kultivierungs-abhängige, als auch kultivierungs-unabhängige Versuchsansätze verfolgt. Das Hauptaugenmerk dieser Studien lag dabei auf dem Candidatus Phylum *Poribacteria*. Während auf dem ‚dilution-to-extinction‘-Prinzip beruhende Hochdurchsatz-Kultivierungen nicht zum Erhalt einer Schwammsymbionten-Reinkultur führten, konnten durch eine Kombination aus FACS-Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Bakterien und anschließenden Einzel-Genom-Amplifizierungen (‚whole genome amplifications‘) umfassende Einblicke in die metabolischen Kapazitäten von Schwammsymbionten gewonnen werden. Ferner gelang durch die Anwendung dieser neuen kultivierungs-unabhängigen Methode eine spezifische Verknüpfung von Phylogenie und Funktion Schwamm-assoziiierter, nicht-kultivierbarer Bakterien. So konnte im Rahmen dieser Dissertation eine neue nicht-ribosomale Peptidsynthetase (NRPS) einem Vertreter einer Schwamm-spezifischen *Chloroflexi*-Klade zugewiesen werden. Ferner gelang die Zuordnung einer exklusiv in marinen Schwämmen vorgefundenen Polyketidsynthase (Sup-PKS) zu den *Poribacteria*. Die Klonierung von hochmolekularer, Einzel-Genom-amplifizierter DNA in Cosmide gewährte zudem Einblicke in den genomischen Kontext dieser, mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziierten Gene.

Die Pyrosequenzierung eines amplifizierten, von einem einzelnen Poribakterium abstammenden Genoms führte zudem zum Erhalt von rund zwei Megabasen an genetischer Information über diese Schwammsymbionten. Dadurch wurden detaillierte Informationen über den poribakteriellen Primär- und Sekundärstoffwechsel gewonnen. Die Auswertung der automatisch annotierten 454-Daten erlaubte die Rekonstruktion von Stoffwechselwegen, so z.B. der Glykolyse oder des Citratzyklus und bestätigte das Vorhandensein eines Sup-PKS-Gens im poribakteriellen Genom. Ferner konnten Gemeinsamkeiten mit den Schwesterphyla *Planctomycetes*, *Chlamydiae* und *Verrucomicrobia* gefunden werden. Zudem zeigte die vergleichende Analyse mit einem poribakteriellen Referenzklon aus einer bestehenden Metagenombank die genomische Mikroheterogenität innerhalb dieses Phylums. Nicht zuletzt konnte die Auswertung der poribakteriellen 454-Sequenzierung eine Reihe von möglichen Symbiose-Determinanten aufdecken, die beispielsweise am Austausch von Metaboliten zwischen den Interaktionspartnern beteiligt sind.

Die Ergebnisse dieser Dissertationsarbeit stellen die Basis für eine gezielte und detaillierte funktionelle Beschreibung einzelner Bakterien innerhalb komplexer mikrobieller Konsortien dar, wie sie in marinen Schwämmen vorzufinden sind. Dieser Studie gewährte erstmalig umfassende Einblicke in das genomische Potential der nicht-kultivierten, Schwamm-assoziierten *Poribacteria*. Weiterführende Einzelzell-basierte Experimente werden in Zukunft dazu beitragen, das Bild von der Interaktion zwischen Bakterien und eukaryontischen Wirten zu komplettieren.

Summary

Sponges (phylum Porifera) represent the evolutionarily oldest of all extant animal phyla. Especially marine members of these sessile invertebrates are well known to be permanently associated with microbial consortia, which are highly host-specific and phylogenetically diverse. About half of the sponge's biomass can be made up of this microflora. However, the complexity of the consortia as well as the lack of cultured representatives impedes a directed functional characterization of sponge-specific bacterial phylotypes. Of special interest in this context is the candidate phylum *Poribacteria*, whose members have so far been exclusively detected in marine sponges. As indicated by the annex 'candidate', no cultured representative exists for the *Poribacteria*. The metabolically active and abundant *Poribacteria* are located in the sponge extracellular matrix and are characterized by the presence of a nucleoid-like organelle.

The aim of this dissertation was the application of novel single cell based methods to the field of sponge microbiology for functional characterization of bacteria specifically associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. For that purpose, cultivation-dependent as well as cultivation-independent approaches were pursued. Particular attention was paid to the candidate phylum *Poribacteria*. While high-throughput cultivation experiments based on the 'dilution-to-extinction' principle did not yield a sponge symbiont in pure culture, extensive insights into the metabolic properties of sponge-associated bacteria were gained by dissecting the microbial consortia using FACS-sorting with subsequent 'whole genome amplifications'. In addition, this approach enabled a specific linkage between phylogeny and function of sponge-specific, non-culturable bacteria. Within the scope of this PhD thesis a novel non ribosomal peptide synthetase (NRPS) could be assigned to a member of a sponge-specific clade within the phylum *Chloroflexi*. Moreover, an exclusively in marine sponges existing class of polyketide synthases (Sup-PKS) was shown to be encoded by the *Poribacteria*. Cosmide-cloning of amplified genomic DNA derived from FACS-sorted sponge microbes provided insights into genes associated with secondary metabolism and adjacent genomic context.

Pyrosequencing of a single amplified genome derived from a member of the *Poribacteria* resulted in almost two megabases of genetic information about this sponge symbiont. Data analysis provided detailed insights into the poribacterial primary and secondary metabolism. Analysis of the automatically annotated 454-data enabled the reconstruction of metabolic

pathways like glycolysis and citric acid cycle. Furthermore, the presence of the Sup-PKS gene in the poribacterial genome was confirmed. Moreover, common features with the sister phyla *Planctomycetes*, *Chlamydiae* and *Verrucomicrobia* were traced within the poribacterial data set. Additionally, the comparative study with a poribacterial reference clone from an existing metagenomic library revealed genomic microheterogeneity within the phylum *Poribacteria*. Last but not least the interpretation of the 454-sequencing approach did expose a set of putative determinants such as metabolite exchange factors required for establishment and maintenance of the symbiosis with the sponge host.

The results of this dissertation provide a basis for a directed and detailed functional characterization of single bacteria within complex microbial consortia like they exist in marine sponges. This study provided a comprehensive picture of the genomic potential of the uncultured sponge-associated *Poribacteria*. Continued single cell based experiments will lead to a better knowledge of the mechanisms of interaction between bacteria and eukaryotic hosts.

2. Einleitung

2.1. Schwämme – das Phylum Porifera

Schwämme (Stamm Porifera) stellen den ältesten rezenten Tierstamm der Erde dar, wurden jedoch aufgrund ihres ungegliederten Körperbaus erst im Jahr 1766 durch Peter Simon Pallas eindeutig dem Reich Animalia zugeordnet. Fossile Überreste dieser Metazoen konnten auf ein Alter von bis zu 580 Mio. Jahren zurückdatiert werden (Li *et al.* 1998). Love und Kollegen (2009) konnten sogar den für Hornkieselschwämme charakteristischen Biomarker 24-Isopropylcholestan in 635-750 Mio. Jahre alten Sedimentschichten nachweisen und damit belegen, dass diese Schwämme bereits lange vor der Metazoen-Radiation während des Kambriums vor 520-530 Mio. Jahren die Erde besiedelten. Heute bevölkern Schwämme mit mehr als 7.000 beschriebenen und auf bis zu 15.000 geschätzten Arten (Hooper und van Soest 2002) alle aquatischen Gebiete der Welt. Marine Vertreter können dabei in allen gemäßigten, subtropischen und tropischen Meeren und Ozeanen, aber auch in polaren Gewässern und sogar in der Tiefsee vorgefunden werden. Ferner sind Süßwasserarten beschrieben worden, deren Habitate fließende Gewässer sowie Seen darstellen.

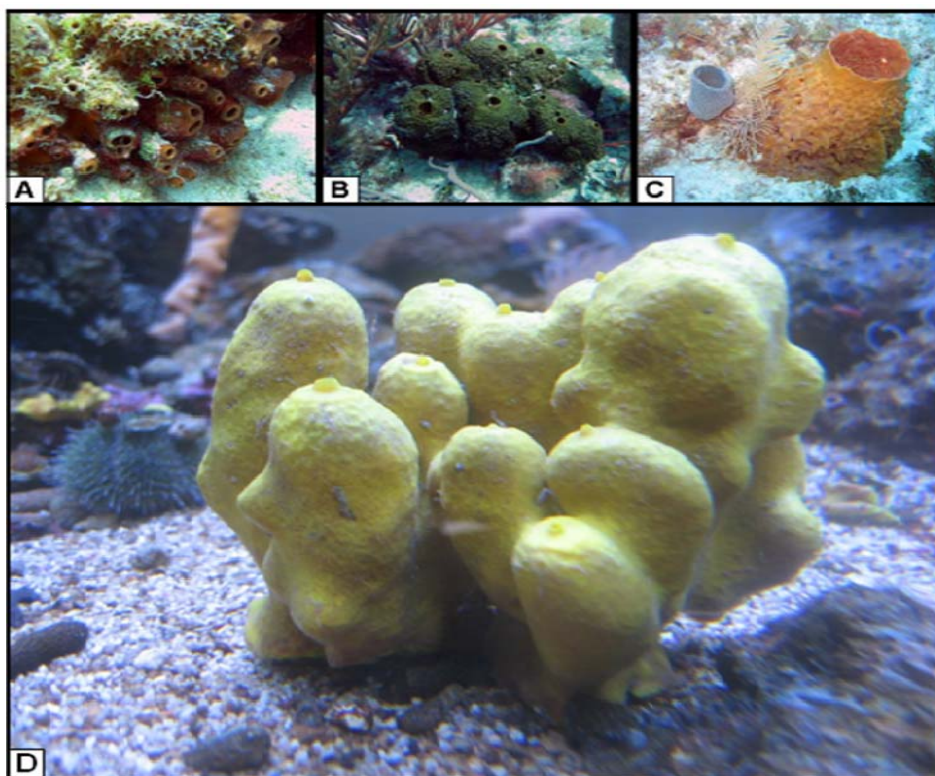


Abb. 2-1: Vertreter mariner Schwämme. *Ectyoplasia ferox* (A), *Smenospongia aurea* (B), *Niphates digitalis* (C, links), *Xestospongia muta* (C, rechts) und *Aplysina aerophoba* (D). Unterwasserfotografien A-C: S. Schmitt, D: A. Siegl.

Die größte Diversität von marinen Schwämmen ist in flachen Küstenregionen der Subtropen und Tropen vorzufinden, wo sie neben Korallen eine wichtige Riff-bildende Funktion einnehmen. Schwämme zeichnen sich durch ein breit gefächertes Repertoire an Größe, Farbe und Form aus (Abb. 2-1). Inkrustierende Arten von nur wenigen Millimetern Dicke stehen aufrechten Wuchsformen von bis zu zwei Metern Höhe gegenüber. Vertreter der Porifera können dabei schlauch-, becher- oder trichterförmige Gestalten der unterschiedlichsten Färbungen annehmen. Ebenfalls hochvariabel sind Anzahl und Morphologie der Schlotte.

2.1.1. Taxonomie

Schwämme wurden im ‚Zoological Record‘ erst ab dem Jahr 1876 als eigenständige Gruppe Spongozoa gelistet, zuvor wurden sie unter anderem den Protozoa zugeordnet. Noch heute wird die Klassifizierung von Schwämmen durch das Fehlen von geeigneten taxonomischen Merkmalen erschwert. Die Systematik der Porifera beruht in erster Linie auf Beurteilungen von Skelettnadeln (Spiculae), Zellmorphologie und Embryologie, sowie auf der Analyse molekularer Daten. Der Stamm Porifera umfasst heute drei klar definierte Klassen, die Calcarea („Kalkschwämme“), die Demospongiae („Horn- und Kieselschwämme“) und die Hexactinellida („Glasschwämme“) (Abb. 2-2).

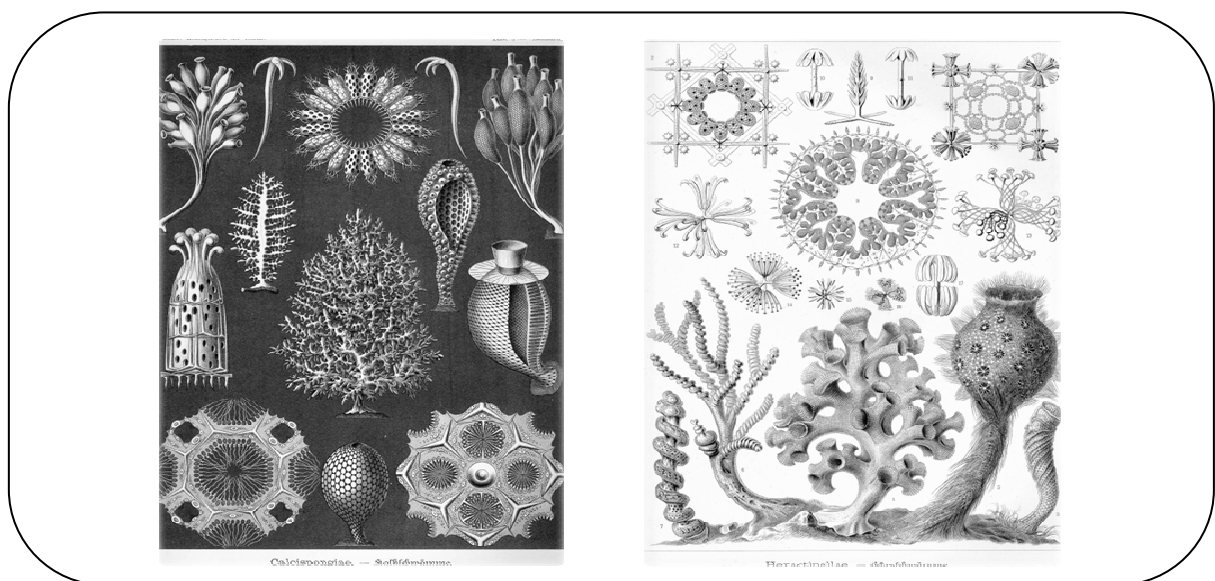


Abb. 2-2: Illustrationstafeln der Kalkschwämme (links) und der Glasschwämme (rechts) aus Ernst Haeckels ‚Kunstformen der Natur‘ von 1899.

Die ausschließlich marinen Vertreter der Kalkschwämme verdanken ihren Namen dem Vorhandensein von kalkhaltigen Skelettnadeln. Mehr als 95 % aller lebenden Schwammarten sind der Klasse der Demospongiae zuzuordnen. Im Gegensatz zu den Kalkschwämmen besitzt diese Klasse, zu der auch sämtliche Süßwasserspezies gehören, keine Kalknadeln, sondern Kieselnadeln und ein Hornskelett. Vertreter der Hexactinellida besitzen ebenfalls Nadeln aus Kieselsäure, weisen jedoch als einzige Klasse kein äußeres Epithel (Pinacoderm) auf und können in Tiefen von bis zu 6.000 Metern vorgefunden werden.

2.1.2. Morphologie und Lebensweise

Schwämme sind sessile Organismen, die meist fest mit dem Substrat verankert sind und sich durch das Fehlen von Organen, Blutgefäßen und Nervensystemen auszeichnen. Ihr ungegliederter Körper besteht aus verschiedenen Epithelschichten, in die unterschiedliche Zelltypen eingelagert sind. Zur Stabilisierung dient ein Skelett aus Nadeln oder ein Gerüst aus Sponginfasern. Begrenzt wird der Schwammkörper durch eine Schicht aus Pinacocyten, welche das Pinocoderm bilden. Das Innere des Schwamms (Mesohyl) wird von totipotenten Zellen (Archaeocyten) bestimmt, welche auch zu amöboiden Zelltypen unterschiedlicher Funktion differenzieren können. Die Schwammoberfläche wird von einer Vielzahl an Poren (Ostia) durchbrochen, durch die Wasser in den Zentralraum eindringt. Der Wasserstrom wird durch Kragengeißelzellen (Choanocyten) erzeugt, welche in Kragengeißelkammern angeordnet sind, und verlässt den Schwamm durch eine oder mehrere Ausstromöffnungen (Oscula; Abb. 2-3 A).

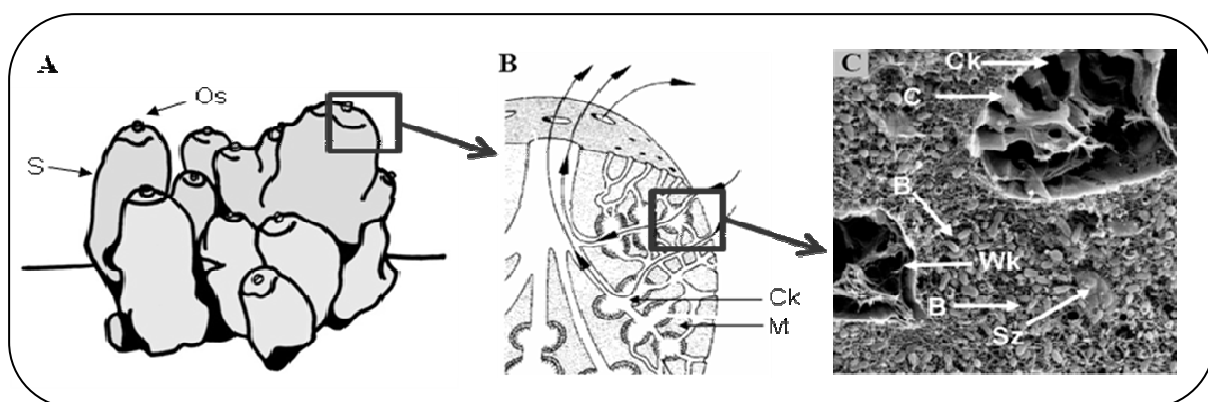


Abb. 2-3: Schematische Darstellung der Morphologie eines Schwamms des Leucon-Typs (A und B). Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme des Mesohyls von *A. aerophoba* (C). Os: Osculum, S: Schlot, Ck: Choanocytenkammer, M: Mesohyl, C: Choanocyt, B: Bakterien, Sz: Schwammzellen, Wk: Wasserkanal. Teilabbildungen B und C modifiziert nach Brusca und Brusca (1990) sowie Hentschel *et al.* (2003).

Durch den Schlag der Choanocyten-Geißeln wird nicht nur die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff gewährleistet, sondern auch die Ernährung sichergestellt. Aufgrund der Organisation der Kragengeißelkammern wird bei Schwämmen zwischen drei verschiedenen Bauplantypen unterschieden. Der einfache Ascon-Typ besitzt eine große, zentrale Geißelkammer, wohingegen beim Sycon-Typ ein Zentralraum von mehreren Geißelkammern umgeben ist. Der bei Schwämmen vorherrschende Typ des Leucon-Bauplans ist von einem weitverzweigten Kanalsystem mit ins Mesohyl eingelagerten Geißelkammern durchzogen, wahrscheinlich um auch bei größeren Arten die Versorgung zu gewährleisten (Abb. 2-3 B und C). Das Mesohyl selbst besteht zum Großteil aus extrazellulärer Matrix.

Durch die festsitzende Lebensweise sind Schwämme auf eine filtrierende Nahrungsaufnahme angewiesen. Mikroalgen, Bakterien und organische Schwebstoffe werden aus dem kontinuierlichen Wasserstrom über die Pinacocyten abgefangen und später via Phagozytose durch Archaeocyten des Mesohyls verdaut. Die Filtrierleistung mariner Schwämme, welche mehrere tausend Liter pro Tag erreichen kann (Reiswig 1974), unterstreicht deren wichtige Bedeutung für marine Ökosysteme. Das Wasser, welches durch das Osculum austritt, ist dabei nahezu steril (Wehrl *et al.* 2007). Die sessile Lebensweise bestimmt ferner das Abwehrverhalten von Schwämmen gegenüber Fraßfeinden, Konkurrenz, Infektion und Überwucherung. In diesem Zusammenhang konnte bereits eine Vielzahl von bioaktiven Substanzen mit großem biotechnologischen Potential in Schwämmen identifiziert werden (Blunt *et al.* 2008). Schwämme weisen sowohl sexuelle Fortpflanzung mittels Larven, als auch asexuelle Vermehrung über Knospung auf. Ferner zeichnen sie sich durch eine mögliche Ausprägung von Dauerstadien (Gemmulae) aus.

2.2. Mikrobielle Konsortien mariner Schwämme

Mikroskopische Studien zu Beginn der 1970er Jahre konnten erstmalig zeigen, dass eine Vielzahl mariner Schwämme mit Mikroorganismen assoziiert ist (Vacelet 1970, 1971, 1975). Der Großteil dieser Organismen liegt dabei frei in der extrazellulären Matrix des Mesohyls vor (Abb. 2-3 C), allerdings konnten auch vereinzelt intrazelluläre und sogar intranukleäre Mikroorganismen beobachtet werden (Vacelet 1970, Wilkinson 1978, Friedrich *et al.* 1999). Molekulare Methoden haben in den letzten Jahren dazu beigetragen, die phylogenetische Identität dieser Mikroorganismen, welche Eubakterien, Archaeen und Eukaryonten beinhalten, zu klären. Die Erforschung der Interaktionen zwischen Mikroorganismen und

marinen Schwämmen ist wesentlicher Bestandteil heutiger Schwamm-Mikrobiologie. Dabei sind Szenarien mit ein- oder wechselseitigem Nutzen bzw. Schaden der Interaktionspartner denkbar: Mikroorganismen können als Futterpartikel dienen, Pathogene repräsentieren, als ‚Mittesser‘ vorliegen oder aber als Symbionten eine feste Interaktion mit dem Wirt eingehen.

2.2.1. Bakterienhaltige und bakterienfreie Schwämme

Generell sind im Hinblick auf die Menge und die Zusammensetzung von mikrobiellen Konsortien zwei Gruppen von Schwämmen zu unterscheiden. Die sog. ‚Bakterienchwämme‘ (auch ‚bacteriosponges‘ oder ‚high microbial abundance [HMA] sponges‘ genannt) beherbergen große Mengen Mikroorganismen in ihrem Mesohyl (Abb. 2-4 A) (Hill 2004, Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007).

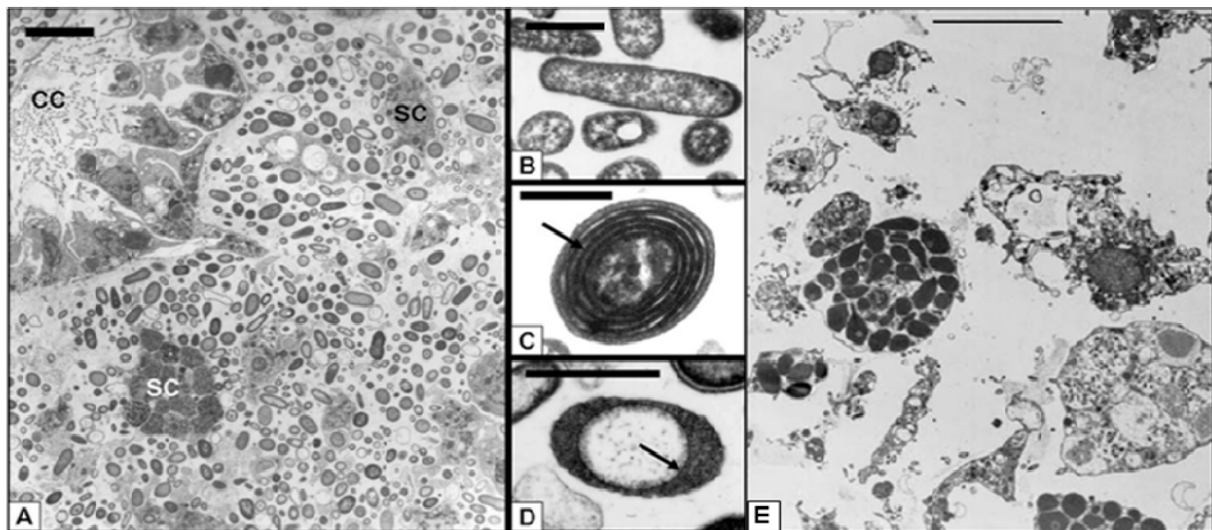


Abb. 2-4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme des bakterienhaltigen Schwamms *Aplysina aerophoba* (A), eines stäbchenförmigen Proteobakteriums (B), eines Cyanobakteriums mit Thylakoidmembranen (Pfeil; C), eines Morphotyps mit Nucleoid-ähnlicher Struktur (Pfeil; D) sowie des bakterienfreien Schwamms *Axinella polypoides* (E). CC: Choanocytenkammer, SC: Schwammzelle. Skalierungen: 5 μm (A), 1 μm (B, D), 0,5 μm (C), 10 μm (E). Teilabbildungen A-D aus Siegl *et al.* (2008), Teilabbildung E aus Wehrl (2006).

So können Mikroorganismen rund die Hälfte der Masse eines marinen, bakterienhaltigen Schwamms ausmachen (Vacelet 1975, Willenz und Hartman 1989), was Zellzahlen von bis zu 10^8 - 10^9 pro Gramm Frischgewicht entspricht (Friedrich *et al.* 2001, Webster und Hill 2001, Hentschel *et al.* 2006). Somit kann die mikrobielle Zelldichte in Schwämmen die von Meerwasser um bis zu drei Zehnerpotenzen übersteigen. Elektronenmikroskopische Studien konnten bereits eine Vielzahl bakterieller Morphotypen identifizieren (Abb. 2-4 B-D)

(Vacelet 1975, Wilkinson 1978, Friedrich *et al.* 1999). Dem gegenüber steht eine Gruppe von Schwämmen, deren Mesohyl nur wenige bis keine Bakterien enthält (Hentschel *et al.* 2006, Wehrl 2006, Schmitt *et al.* 2007 a), und daher als bakterienfrei bezeichnet wurde (auch ‚non-bacteriosponges‘ oder ‚low microbial abundance [LMA] sponges‘ genannt [Abb. 2-4 E]) (Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007). Sowohl die Quantität, als auch Zusammensetzung der Mikroorganismen von bakterienfreien Schwämmen entsprechen in etwa der von Meerwasser (Hagstrom *et al.* 2002, Hentschel *et al.* 2006, Schiller 2006). Ferner unterscheiden sich LMA-Schwämme von HMA-Schwämmen durch ihr poröseres Mesohyl und deutlich höhere Pumpraten (Weisz *et al.* 2008). Bakterien Schwämme sind zudem tendenziell größer als ihre bakterienfreien Verwandten (Wehrl 2006).

2.2.2. Das Schwamm-spezifische mikrobielle Konsortium

Schwamm-assoziierte Mikroorganismen von Bakterien Schwämmen können nicht nur hochabundant vorliegen, sondern auch eine enorme Komplexität bezüglich ihrer phylogenetischen Zusammensetzung aufweisen, wie vor allem kultivierungs-unabhängige 16S rRNA Gen-basierte Studien nahelegten (Hentschel *et al.* 2002). Erschwert werden Studien des mikrobiellen Schwammkonsortiums durch die Tatsache, dass sich mehr als 99 % aller Umweltbakterien, und somit auch Schwamm-assoziierte Bakterien, nicht unter Standard-Laborbedingungen kultivieren lassen (Amann *et al.* 1995, Rappé und Giovannoni 2003). Neben einer Vielzahl eukaryontischer Mikroorganismen und Vertretern beider archaealer Abstammungslinien konnten bislang Vertreter von 16 bakteriellen Phyla in Schwämmen unterschiedlicher Herkunft nachgewiesen werden (Abb. 2-5) (Hentschel *et al.* 2006, Taylor *et al.* 2007 sowie in diesen Reviews zitierte Referenzen).

Mindestens 12 bakterielle Phyla enthalten monophyletische, Schwamm-spezifische Cluster (Abb. 2-5) (Taylor *et al.* 2007 sowie darin zitierte Referenzen). Diese Schwamm-spezifischen Cluster (Hentschel *et al.* 2002) wurden als Gruppierungen definiert, die aus mindestens drei 16S rRNA-Gensequenzen bestehen, welche untereinander näher verwandt sind als zu Umweltsequenzen und aus unterschiedlichen Schwammarten bzw. geografischen Regionen stammen. Zusätzlich muss die Clusterbildung, unabhängig vom verwendeten Algorithmus zur Stammbaum-Berechnung, gewährleistet sein. Bakterielle Phylotypen, auf die diese Voraussetzungen zutreffen, werden im Folgenden als ‚Symbionten‘ bezeichnet. Dabei soll der Begriff Symbiose in diesem Fall lediglich ein Zusammenleben unterschiedlicher

Lebensformen markieren. Ein etwaiger gegenseitiger Nutzen beider Interaktionspartner ist dabei im Einzelfall zu untersuchen und zu bewerten. Schwamm-spezifische Cluster konnten für die folgenden bakteriellen Phyla nachgewiesen werden: *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Nitrospira*, das Candidatus Phylum *Poribacteria*, *Proteobacteria* [*Alpha*-, *Beta*/*Gamma*-, *Delta*-], *Spirochaetes*, *Verrucomicrobia*, sowie eine sog. ‚uncertain affiliation‘. Diese nicht näher klassifizierte Gruppe an Sequenzen stammt aus verschiedenen Schwammarten und ist moderat verwandt mit dem sog. Planktomyceten-Verrucomicrobien-Chlamydien- (PVC-) Superphylum (Wagner und Horn 2006, Taylor *et al.* 2007).

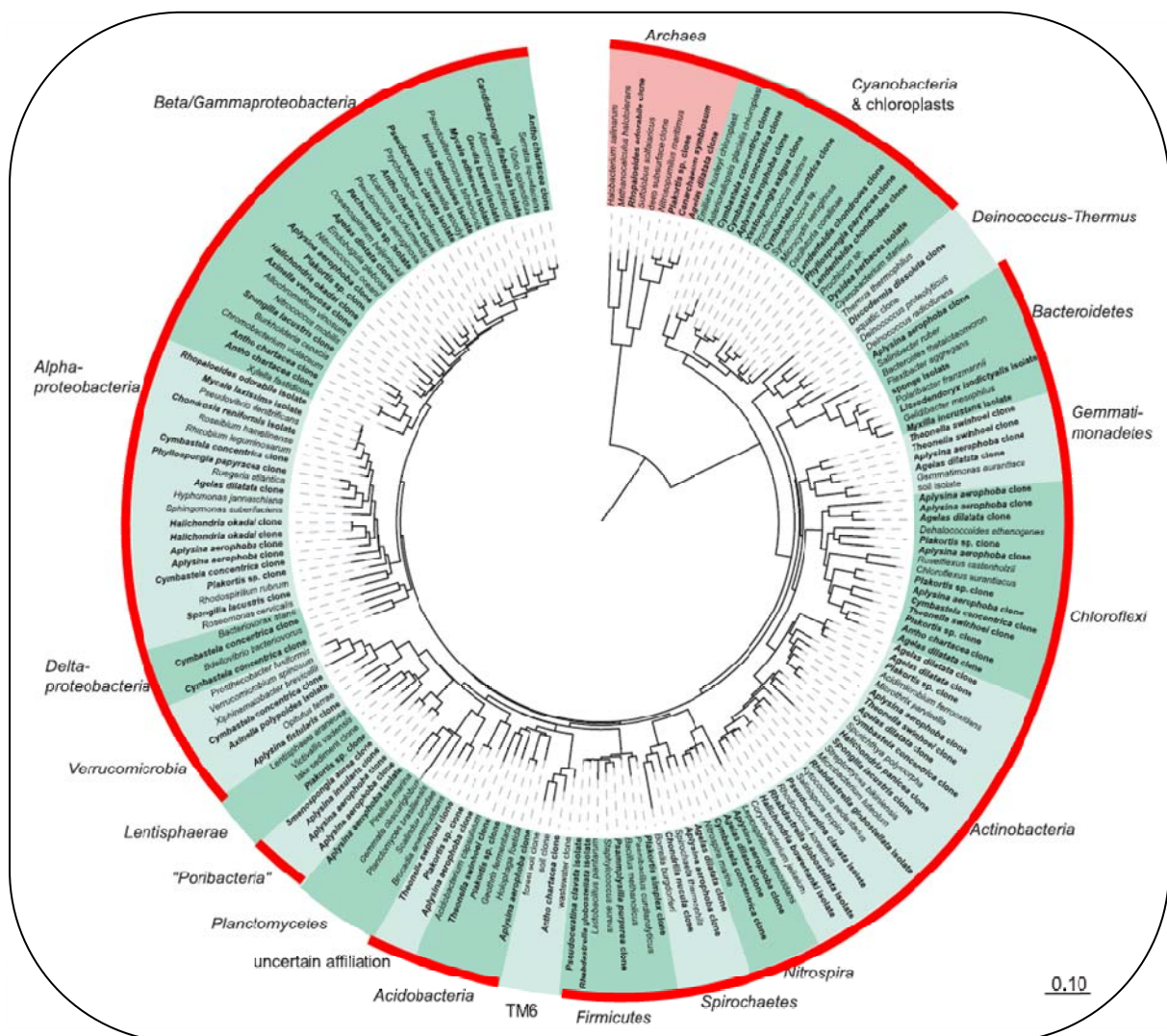


Abb. 2-5: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf 16S rRNA Gensequenzen aus Schwämmen (fett markiert). Skalierung: 10 % Sequenzdivergenz. Bakterielle Phyla, welche Schwamm-spezifische Cluster enthalten, sind rot unterlegt. Abbildung modifiziert nach Taylor *et al.* (2007).

Ebenso beinhaltet die archaeale Abstammungslinie der *Crenarchaeota*, nicht aber der *Euryarchaeota*, Schwamm-spezifische Cluster (Holmes und Blanch 2006, Taylor *et al.* 2007 sowie darin zitierte Referenzen, Bayer *et al.* 2008). Gegenwärtig sind über 5.000 aus Schwämmen stammende 16S rDNA-Sequenzen aus Schwämmen in der Sequenzdatenbank ‚Genbank‘ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) abgelegt, während es 2002 noch 190 waren (Hentschel *et al.* 2002). Der stetige Zuwachs an Sequenzinformation sorgt dabei permanent für Neubildungen und Umstrukturierungen, aber auch für Auflösungen von Schwamm-spezifischen Clustern. Die Entdeckung des Candidatus Phylums *Poribacteria* (Fieseler *et al.* 2004) in marinen Schwämmen legt zudem die Vermutung nahe, dass die phylogenetische Diversität in marinen Schwämmen noch nicht vollständig bekannt ist.

Das hochdiverse mikrobielle Konsortium mariner Schwämme scheint relativ stabil über geografische Distanzen hinweg zu sein. So konnte eine ‚konservierte Signaturgemeinschaft‘ in unterschiedlichsten Schwammarten aus verschiedenen geografischen Regionen identifiziert werden (Hentschel *et al.* 2002). Ebenfalls konserviert scheint die räumliche Verteilung der Mikroorganismen innerhalb des Schwamms zu sein. Während photoautotrophe Cyanobakterien (Abb. 2-4 C) im äußeren, licht-exponierten Randbereich (Pinacoderm) vorzufinden sind, wird der Kernbereich (Mesohyl) von heterotrophen Bakterien aus anderen Phyla dominiert. Mittlerweile konnte auch für einige marine Schwämme gezeigt werden, dass das spezifische mikrobielle Konsortium vertikal an die nächste Generation weitergegeben werden kann (Enticknap *et al.* 2006, Schmitt *et al.* 2007 b, Schmitt *et al.* 2008, Sharp *et al.* 2007). Zusätzlich wird eine Stabilität des Schwamm-spezifischen Konsortiums dadurch gewährleistet, dass Bakterien in der Lage zu sein scheinen, zwischen Futterbakterien und ‚Symbionten‘ zu differenzieren (Wilkinson *et al.* 1984, Wehrl *et al.* 2007).

2.2.3. Das Candidatus Phylum *Poribacteria*

Zurzeit sind knapp 90 poribakterielle 16S rRNA-Gensequenzen in öffentlich zugänglichen Datenbanken abgelegt, wobei alle davon exklusiv aus marinen Schwämmen stammen. Da Poribakterien weder im Meerwasser noch im marinen Sediment oder anderen Habitaten nachweisbar sind, ist diese Gruppe als Schwamm-spezifisch definiert worden. Durch das Vorhandensein von weniger als 75 % Sequenzhomologie über das gesamte 16S rRNA-Gen zu allen bekannten eubakteriellen Phyla wurde ein neues Phylum ‚*Poribacteria*‘ postuliert,

wobei der Zusatz ‚Candidatus‘ das Fehlen eines kultivierten Repräsentanten kennzeichnet (Fieseler *et al.* 2004). Zusammen mit den am nächsten verwandten Phyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Lentisphaerae*, *Chlamydiae*, sowie dem Candidatus Phylum OP3 bilden die *Poribacteria* das sogenannte PVC-Superphylum (Abb. 2-6) (Wagner und Horn 2006).

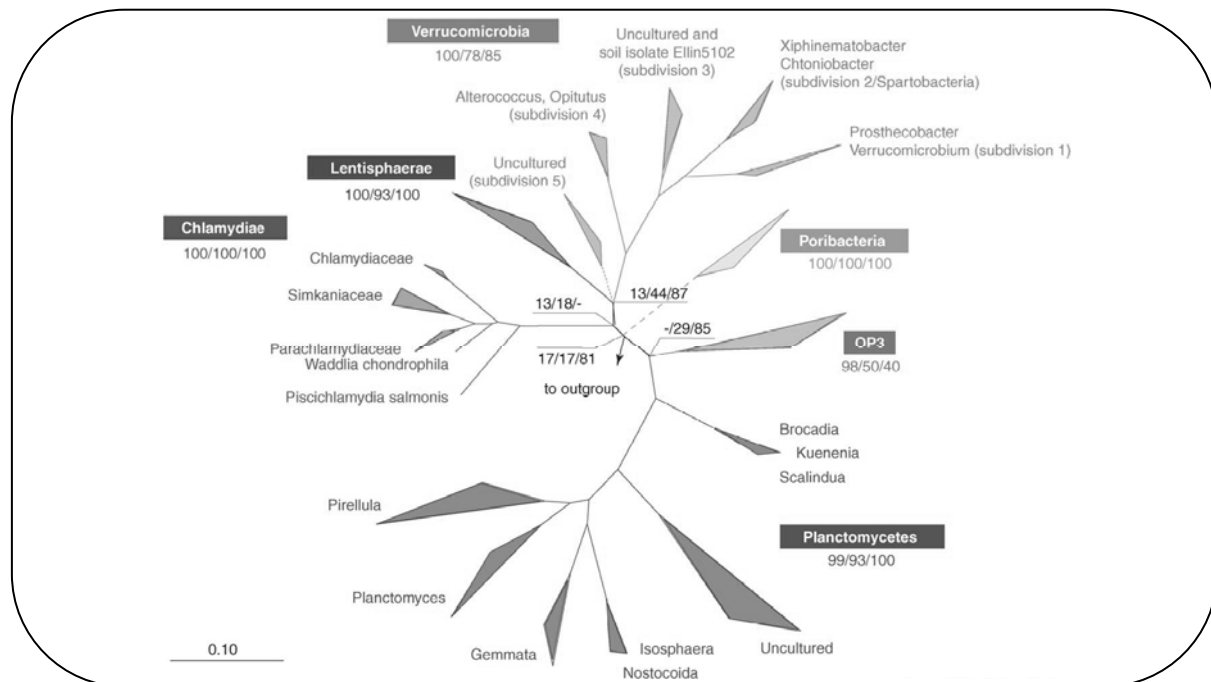


Abb. 2-6: Phylogenetischer Stammbaum des PVC-Superphylums, dem auch die Poribakterien zuzuordnen sind. Skalierung: 10 % Sequenzdivergenz. Abbildung aus Wagner und Horn (2006).

Die moderate phylogenetische Verwandtschaft der Poribakterien mit den Planktomyceten spiegelt sich zudem durch das gemeinsame Vorhandensein eines membranbegrenzten, Nucleoid-ähnlichen Zellkompartiments wider (Abb. 2-4 D) (Fieseler *et al.* 2004). Innerhalb der Bakterien ist eine solche intrazelluläre Struktur, wie sie für Eukaryonten typisch ist, einmalig. Diese Zellkompartimentierung konnte auch durch das Verwenden von Poribakterien-spezifischen ‚fluorescence *in situ* hybridization‘ (FISH-) Sonden gezeigt werden. Hierbei wies das Nucleoid kein FISH-Signal auf, was die Vermutung nahelegt, dass dieses keine poribakteriellen Ribosomen beinhaltet (Fieseler *et al.* 2004). Ebenfalls durch FISH-basierte Studien konnte belegt werden, dass Poribakterien hochabundant im Schwamm-Mesohyl vorliegen und vermutlich metabolisch hochaktiv sind (Abb. 2-7) (Fieseler *et al.* 2004).

Genomische Information über die Poribakterien ist von der Analyse eines Fosmidklons aus einer 1,1 Gb umfassenden Metagenombank des Schwamms *A. aerophoba* abgeleitet. Das 39

Kilobasen (kb) umfassende Insert (Abb. 2-7) kodiert neben dem poribakteriellen 16S rRNA-Gen eine tRNA und 27 offene Leseraster (open reading frame, ORF) (Fieseler *et al.* 2006). Interessanterweise liegt ein geteiltes rRNA-Operon vor, was innerhalb der Prokaryonten nur selten vorzufinden ist. Zwei hypothetische Proteine wiesen Sequenzähnlichkeiten zu Homologen aus dem Planktomyceten *Rhodopirellula baltica* auf. Zusätzlich konnten eine neuartige, Molybdän-haltige Oxidoreduktase sowie ein Transporter, der von acht ORFs kodiert wird, den Poribakterien zugeordnet werden.

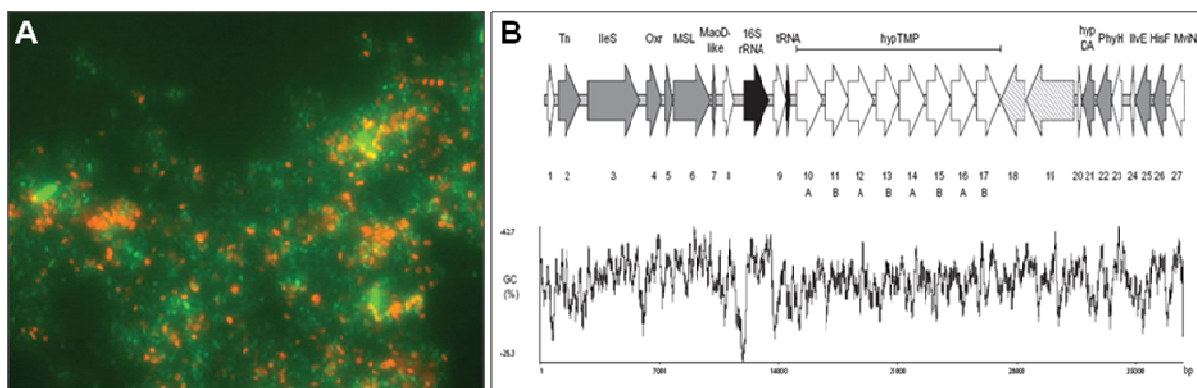


Abb. 2-7: A: FISH-Aufnahme des Mesohyls von *Aplysina aerophoba*. Poribakterien sind rot, die restlichen Eubakterien grün gefärbt. Abbildung aus Fieseler *et al.* (2004). B: Genomische Organisation und GC-Gehalt des poribakteriellen Fosmidklons 64K2. Abbildung aus Fieseler *et al.* (2006).

2.3. Primär- und Sekundärstoffwechsel Schwamm-assoziierter Bakterien

Die Charakterisierung des metabolischen Repertoires von Schwamm-assozierten Bakterien wird durch das Fehlen von kultivierten Repräsentanten erschwert. Aus diesem Grund wurde vermehrt auf physiologische Analysen von Gesamtschwammgewebe zur Charakterisierung des bakteriellen Primärstoffwechsels sowie auf metagenomische Studien zur Beschreibung des Sekundärstoffwechsels gesetzt. So konnte u.a. die cyanobakterielle CO₂-Fixierung und O₂-Produktion in Schwämmen gezeigt (Vacelet 1971, Wilkinson 1983) und ein positiver Effekt auf den Wirt, in etwa durch den Transfer von Glycerin-3-Phosphat als Reduktionsäquivalent (Ariello *et al.* 1993, Thacker 2005), nachgewiesen werden. Neben bakterieller anaerober Sulfat-Reduzierung in *Geodia barretti* (Hoffmann *et al.* 2005) konnte ebenfalls durch physiologische Tests die mikrobielle Nitrifikation in diversen Schwämmen gezeigt werden. Die zweistufige Oxidation von Ammoniak zu Nitrit und weiter zu Nitrat konnte in lebenden Schwämmen detektiert werden und phylogenetische Studien identifizierten sowohl bakterielle, als auch archaeale Nitrifizierer als dafür verantwortlich

(Bayer *et al.* 2008). Die *in situ* Aktivität dieser Mikroorganismen konnte sowohl über die Messung von Nitrat, als auch mit Hilfe von FISH-Experimenten belegt werden (Bayer *et al.* 2008). Neben der Nitrifikation spielt die Stickstofffixierung eine weitere zentrale Rolle im globalen Stickstoffkreislauf. So konnten in den beiden Schwämmen *Ircinia strobilina* and *Mycale laxissima* bakterielle NifH-Gene identifiziert und den Phyla *Cyanobacteria* und *Proteobacteria* zugeordnet werden (Mohamed *et al.* 2008 a). Ferner konnte im Rahmen dieser Studie erstmalig die Expression eines Protein-kodierenden, bakteriellen Gens (*nifH*) aus einem Schwamm gezeigt werden. Zudem wurde ein positiver Effekt auf den Wirt durch die Bereitstellung von bakteriell fixiertem Stickstoff postuliert. Desweiteren wurden Analysen von stabilen Stickstoff-Isotopen („stable isotope N probing“) eingesetzt, um metabolische Flüsse zwischen Mikroorganismen und Schwämmen aufzudecken (Weisz *et al.* 2008). Interessanterweise korrelierten hierbei niedrige $\delta^{15}\text{N}$ Ratios ausschließlich mit bakterienhaltigen Schwämmen, was als Indikator für mikrobielle Einspeisung von Stickstoff in den Metabolismus des Schwamms gewertet wurde.

Mikrobielle Symbionten gelten ebenfalls als Produzenten von Sekundärmetaboliten, welche in marinen Schwämmen vorgefunden werden (Grozdanov und Hentschel 2007, Kennedy *et al.* 2007, Piel 2009). Zu den wichtigsten mikrobiellen Naturstoffklassen mit großem biotechnologischen Potential zählen Produkte von Polyketidsynthasen (PKS) und nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), sowie von hybriden PKS-NRPS Systemen. Beide Enzymfamilien weisen einen modularen Aufbau unter Verwendung spezifischer Domänen auf, welche die schrittweise Kondensation einfacher Karbonsäuren (bei PKS-Systemen) bzw. einzelner Aminosäuren (bei NRPS-Systemen) katalysieren. Durch Kombination der essentiellen Module sowie durch den Einsatz bestimmter Zusatzdomänen kann eine hohe Diversität an Endprodukten gewährleistet werden. Polyketide beinhalten Aromaten, Polyene sowie Polyether (z.B. Makrolide) mit den verschiedensten bioaktiven Eigenschaften. Dazu zählen antibiotische (z.B. Erythromycin und Tetracyclin), Tumor-hemmende, immun-supprimierende sowie Cholesterin-senkende Fähigkeiten der bakteriellen Polyketide. Zahlreiche PKS-Systeme konnten bislang in den Metagenomen mariner Schwämme gefunden werden, darunter auch ein Schwamm-exklusives, weitverbreitetes, monomodulares PKS-System vom Typ I (Fieseler *et al.* 2007). Als mögliche Produkte dieses PKS-Typs (Sup-PKS für „sponge ubiquitous PKS“) wurden Methyl-verzweigte Fettsäuren postuliert. Strukturell verwandte Fettsäuren sind Bestandteil der Zellwand von *Mycobacterium tuberculosis*, wo sie am Schutz vor der Immunantwort des Wirts gegen das Pathogen beteiligt sind (Azad *et al.* 1997, Minnikin *et al.* 2002). Somit ist denkbar, dass die Sup-PKS-Produkte einen möglichen

Schutz vor Phagozytose durch Schwammzellen vermitteln und dadurch eine mögliche Symbiose-Determinante darstellen. Die eigentlichen Produzenten der Sup-Polyketide waren zu Beginn dieser Doktorarbeit jedoch unbekannt. Ebenfalls bioaktive Substanzen, wie z.B. Antibiotika (u.a. Vancomycin und Penicillin), aber auch Stoffe mit immun-supprimierenden (Cyclosporin) oder Tumor-hemmenden Eigenschaften (Bleomycin) werden von großen NRPS-Systemen synthetisiert und befinden sich daher im Fokus biotechnologischer Forschung. Vor allem Vertreter der *Actinobacteria* sind prominente Produzenten dieser Peptide, wobei speziell *Streptomyces*-Arten dabei eine übergeordnete Rolle spielen. Diverse NRPS-Systeme konnten bereits im Metagenom von Schwamm-Mikroorganismen (Schirmer *et al.* 2005) oder auch in *Actinobacteria*-Isolaten aus Schwämmen (Jiang *et al.* 2007) identifiziert werden, wo ihnen eine mögliche Funktion bei der Biosynthese von Peptid-Alkaloiden zugeschrieben wird. Vor allem innerhalb der Schwammordnung Verongida finden sich zahlreiche halogenierte Verbindungen, welche an der aktivierten Verteidigung dieser Tiere (z.B. gegenüber Fraßfeinden) beteiligt sind. In diesem Zusammenhang steht auch die Entdeckung einer neuen FADH₂-abhängigen Halogenase im Metagenom des mediterranen Schwamms *Aplysina aerophoba* (Scheuermayer 2006).

2.4. Methoden zur Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen

Generell gelten für die Charakterisierung Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen die gleichen Maßstäbe wie für alle Umweltbakterien. Nach wie vor ist eine Reinkultur des zu untersuchenden Mikroorganismus' als ‚Goldstandard‘ in der Bakteriologie anzusehen. Sie erlaubt u.a. detaillierte physiologische und biochemische Studien, aber auch genomische Untersuchungen (Abb. 2-8). Durch die sog. ‚great plate count anomaly‘ (Amann *et al.* 1995), also die Erkenntnis, dass nur weniger als 1 % aller Umweltbakterien unter gängigen Laborbedingungen kultivierbar sind, ist man allerdings oftmals gezwungen, auf Sequenz-basierte, Kultivierungs-unabhängige Experimente zurückzugreifen. Diese sind in erster Linie auf phylogenetische Analysen des 16S rRNA-Gens gestützt. Dabei dient die Erstellung von 16S rRNA-Genbanken der mikrobiellen Diversitätsbeschreibung, wohingegen Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) den visuellen Nachweis sowie die Abschätzung von Abundanzen bestimmter Mikroorganismen in Umweltproben erlauben. Die Methode der denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) ermöglicht zudem die vergleichende Analyse der Zusammensetzung von mikrobiellen Konsortien in verschiedenen Proben. Zur

weitergehenden funktionellen Charakterisierung nicht-kultivierbarer mikrobieller Lebensgemeinschaften wurde in den letzten Jahren zudem verstärkt auf die Metagenomik gesetzt (Handelsman 2004, Schloss und Handelsman 2005, Vieites *et al.* 2009) (Abb. 2-8). Die wichtigsten Errungenschaften der sich idealerweise ergänzenden Strategien Kultivierung, 16S rRNA-Gen basierte Studien sowie Metagenomik von Schwamm-assoziierten Bakterien sollen in den folgenden Kapiteln beschrieben werden.

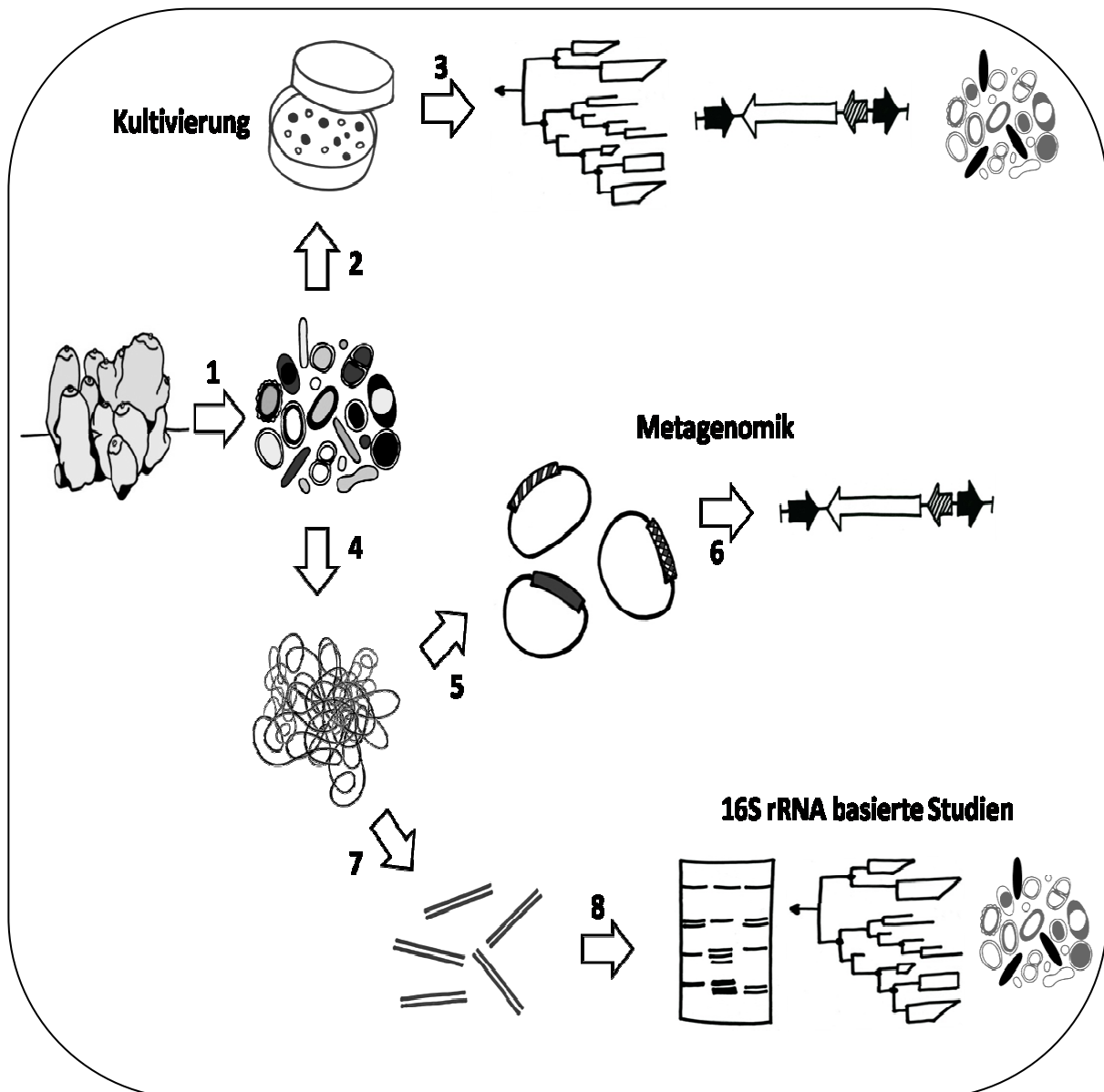


Abb. 2-8: Überblick über verschiedene Strategien zur Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen. 1: Isolierung des mikrobiellen Konsortiums; 2: Kultivierung; 3: Phylogenie, genomische Charakterisierung und FISH-Studien von Isolaten; 4: Isolierung des Metagenoms; 5: Klonierung des Metagenoms; 6: genomische Charakterisierung von Metagenomklonen; 7: PCR-Amplifizierung des 16S rRNA Gens; 8: DGGE, phylogenetische Analysen und FISH-Studien. Detaillierte Erläuterungen im laufenden Text.

2.4.1. Kultivierung

Bislang konnte eine Vielzahl bakterieller Isolate in Reinkultur aus verschiedenen marinen Schwämmen gewonnen werden. Diese sind den Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, *Planctomycetes*, *Proteobacteria* und *Verrucomicrobia* zuzuordnen (Taylor *et al.* 2007 sowie darin zitierte Referenzen, Muscholl-Silberhorn *et al.* 2008, Zhu *et al.* 2008, Zhang *et al.* 2008), wobei phylogenetische Analysen nahelegen, dass es sich hierbei nicht um permanent mit dem Schwamm assoziierte Symbionten, sondern vielmehr um eingestrudelte Futterbakterien handelt. Einzige Ausnahme hiervon stellt das Alphaproteobakterium MBIC3368 (Abb. 2-4 B) dar, das bereits aus mindestens zehn Schwammarten isoliert werden konnte (Scheuermayer *et al.* 2006 b). Für diesen Stamm konnte ebenfalls die Weitergabe an die nächste Schwammgeneration über die Larven gezeigt werden, was die Hypothese einer spezifischen Assoziation mit marinen Schwämmen zusätzlich untermauert (Enticknap *et al.* 2006). Die Mehrheit der als Schwamm-spezifisch klassifizierten Mikroorganismen bleibt jedoch unter Standard-Laborbedingungen nicht-kultivierbar. Die Gründe hierfür sind vielfältig. So können schnellwachsende Vertreter mariner Proteobakterien Stämme mit niedrigen Verdoppelungsraten überwachsen. Ferner weisen die in Schwämmen oftmals hochkonzentrierten Sekundärmetabolite antibakterielle Eigenschaften auf. Bei der mechanischen Extraktion der Schwamm-Symbionten werden diese Naturstoffe aus Vakuolen freigesetzt und können so das mikrobielle Wachstum im Medium inhibieren. Ein weiteres Problem bei der Kultivierung Schwamm-assoziiierter Bakterien stellt das nur unzureichende Wissen über die natürlichen Wachstumsbedingungen dar, sei es Nährstoffgehalt oder optimale Konzentration an essentiellen Spurenelementen. Ferner bleibt zu klären, ob Schwamm-Symbionten einen autonomen Primärstoffwechsel besitzen oder aber auxotroph sind, d.h. auf gewisse Metabolite (z.B. bestimmte Aminosäuren) ihres Wirtes angewiesen sind.

2.4.2. 16S rRNA-Gen basierte Studien

Um ein im Vergleich zu kultivierungs-abhängigen Studien umfassenderes Bild der phylogenetischen Diversität von mikrobiellen Konsortien mariner Schwämme zu erhalten, wurde in erster Linie das 16S rRNA-Gen als universeller Marker herangezogen (z.B. Webster *et al.* 2001, Hentschel *et al.* 2002). Um die relativen Abundanzen von spezifischen Vertretern

des mikrobiellen Konsortiums quantifizieren zu können, wurden zudem ‚real-time qPCRs‘ durchgeführt, welche auf dem 16S rRNA-Molekül basierten (Cassler *et al.* 2008). Die Erstellung von 16S rRNA-Genbanken wurde oftmals durch FISH-Studien visuell komplementiert (z.B. Webster *et al.* 2001, Hoffmann *et al.* 2006, Bayer *et al.* 2008). DGGE-Studien wurden in erster Linie dafür eingesetzt, um die Komposition mikrobieller Konsortien unter verschiedenen Bedingungen miteinander zu vergleichen. So wurde u.a. der Einfluss von Schwammkrankheit (Webster *et al.* 2008 b), verschiedener Temperaturen (Webster *et al.* 2008 a), sowie die Auswirkung von Schwammhälterung (Mohamed *et al.* 2008 b) auf die Zusammensetzung der mikrobiellen Lebensgemeinschaften untersucht. Ferner diente die Methode der DGGE der ergänzenden Untersuchung von vertikaler Weitergabe der bakteriellen Symbionten (Schmitt *et al.* 2007 b) und selektiver, bakterieller Aufnahme durch marine Schwämme (Wehrl *et al.* 2007).

2.4.3. Metagenomik

Eine bedeutende kultivierungs-unabhängige Technik zur funktionellen Charakterisierung komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften, wie sie in marinen Schwämmen auftreten, stellt die sogenannte Metagenomik oder Umweltgenomik (engl. ‚metagenomics‘ oder ‚environmental genomics‘) dar. Dabei wird die komplette genomische DNA (das ‚Metagenom‘) einer Umweltprobe extrahiert und große Fragmente in dafür geeignete Vektoren (z.B. Cosmide, Fosmide, BACs) kloniert. Generell können auf diesem Weg erstellte Metagenombanken entweder funktionell, z.B. auf das Vorhandensein von Klonen mit antimikrobieller Aktivität, oder aber Sequenz-basiert durchmustert werden, beispielsweise auf das Vorhandensein bestimmter funktioneller oder ribosomaler Gene. Speziell die Entwicklung neuer Sequenzieretechnologien (z.B. Pyrosequenzierung), welche schnelle und kostengünstige Sequenzierungen im Hochdurchsatzverfahren ermöglichten, resultierten in einem ‚Boom‘ dieser Methode für das Gebiet der mikrobiellen Ökologie. Zusätzlich zur Sequenz-basierten Charakterisierung dieser DNA-Fragmente können interessante Gene, so in etwa Biosynthese-Gencluster, heterolog exprimiert werden. Auf diesem Weg können pharmazeutisch wichtige Substanzen auch ohne das Vorhandensein einer Reinkultur nutzbar gemacht werden. Da Polyketide ein großes biotechnologisches Potential aufweisen, ist ein Hauptaugenmerk der Schwamm-Metagenomik auf die Erforschung der Biosynthese dieser Naturstoffklasse gerichtet. So konnte innerhalb einer 60.000 Klone umfassenden Metagenombank des

Schwamms *Theonella swinhoei* ein Klon identifiziert werden, welcher für ein PKS-System kodiert, das für die Synthese von Onnamid verantwortlich ist, eines Naturstoffs mit Tumorerhemmender Wirkung (Piel *et al.* 2004). Zusätzlich wurden bereits die Metagenome der mikrobiellen Konsortien aus den Schwämmen *Discodermia dissoluta* (Schirmer *et al.* 2005) und *Pseudoceratina clavata* (Kim und Fuerst 2006) nach Ketosynthese-Domänen von PKS-Systemen hin durchmustert. Interessanterweise zeigten sich hier Schwamm-spezifische Cluster von KS-Domänen. Als Meilenstein der Schwamm-Metagenomik kann die Arbeit an ‚Candidatus *Cenarchaeum symbiosum*‘ angesehen werden. Dieser Crenarchaeot ist spezifisch mit dem kalifornischen Schwamm *Axinella mexicana* assoziiert und macht als einziges Archaeon bis zu 65 % der mikrobiellen Biomasse dieses Schwamms aus (Preston *et al.* 1996). Nach zusätzlicher physikalischer Anreicherung und Bankenkonstruktion konnte schließlich das komplette Genom von *Ca. C. symbiosum*, trotz auftretender Probleme aufgrund genomischer Mikroheterogenität zwischen nah verwandten Variationen, rekonstruiert werden (Hallam *et al.* 2006 a). Diese Studien konnten ferner zeigen, dass *Ca. C. symbiosum* sowohl autotroph über Ammoniakoxidation, als auch mixotroph wachsen kann (Hallam *et al.* 2006 b). Zusätzlich konnten mehrere mögliche Symbiosefaktoren identifiziert werden, die bei freilebenden Verwandten fehlen, so zum Beispiel Zelloberflächen-Moleküle, Regulations- und Verteidigungs-Determinanten (Hallam *et al.* 2006 a).

2.4.4. Einzel-Zell-basierte Methoden

Trotz des großen Potentials der Metagenomik für die Charakterisierung nicht-kultivierbarer mikrobieller Lebensgemeinschaften bleiben wesentliche technische Herausforderungen dieser Methodik bestehen. Speziell bei der Analyse spezifischer Zielorganismen innerhalb sehr komplexer Gemeinschaften können Limitierungen auftreten. So konnte zum Beispiel innerhalb der Metagenombank Apae001 trotz ihrer knapp 29.000 Klone kein überlappendes Fragment zum einzigen Poribakterien 16S rRNA-Gen kodierenden Fosmid 64K2 gefunden werden (Fieseler 2005). Zusätzlich sind Metagenombanken nur bedingt dafür geeignet, die phylogenetische Identität spezifischer Mikroorganismen mit deren Funktion zu verknüpfen. Dies ist nur dann möglich, wenn sich ein phylogenetischer Marker (z.B. das 16S rRNA-Gen) auf demselben genomischen Fragment befindet wie das zu untersuchende funktionelle Gen. Neue Einzel-Zell-basierte Methoden sollen helfen, die oben erwähnten Limitierungen von klassischer Kultivierung und Metagenomik zu umgehen.

„Dilution-to-extinction“

„Dilution-to-extinction“ beschreibt eine Methode zur Kultivierung von Bakterien, bei der die Komplexität mikrobieller Konsortien über Verdünnungen soweit reduziert wird, dass Flüssigmedien mit einer definierten Anzahl Bakterien inokuliert werden können. Durch Ausdünnung bis auf die Einzel-Zell-Ebene kann ein mögliches Überwachsen interessanter Stämme durch Nährstoff-tolerantere, schnellwachsende Bakterien weitestgehend verhindert werden. Erste Versuche mit marinen Bakterien gehen bereits auf die frühen 1990er Jahre zurück (Schut *et al.* 1993). Seitdem fand diese Methode eine breite Anwendung zur Kultivierung meist planktonischer, oligotropher Bakterien unter der Verwendung von Hochdurchsatz-Ansätzen (Cho und Giovannoni 2004, Stingl *et al.* 2008). Dabei werden nur noch geringe Volumina an Medium in Mikrotiterplatten inokuliert und nach meist mehrwöchiger Inkubation mikroskopisch auf bakterielles Wachstum hin untersucht. Um die natürlichen Bedingungen weitestgehend zu imitieren, werden in der Regel keine reichhaltigen Vollmedien sondern Nährstoff-limitierte Minimalmedien verwendet. Daher kann auch mit keiner Medientrübung als Indiz für bakterielles Wachstum gerechnet werden. Alternativ können unter der Verwendung spezieller Apparaturen die Proben ganzer Mikrotiterplatten parallel auf Filter aufgezogen, fixiert und für die Fluoreszenzmikroskopie angefärbt werden.

Vereinzelung von Bakterien mittels FACS

Alternativ zur Vereinzelung von Bakterien über Verdünnungsreihen können mikrobielle Konsortien auch mittels „fluorescence activated cell sorting“ (FACS; Durchflusszytometrie) aufgetrennt werden (Raghunathan *et al.* 2005, Podar *et al.* 2007, Stepanauskas und Sieracki 2007). Prinzipiell wurden FACS-Geräte zwar für die Eukaryontenzellen-Analytik konzipiert, finden mittlerweile aber auch Anwendung in der Mikrobiologie. Zellen können dabei aufgrund verschiedener Parameter untersucht und sortiert werden. Dazu zählen Zellgröße und Oberflächenbeschaffenheit sowie gegebenenfalls die Emission von Licht verschiedener Wellenlänge bei der Verwendung von spezifischen Sonden, Farbstoffen oder fluoreszenzmarkierten Antikörpern. Bei der Durchflusszytometrie passieren einzelne Partikel einen Laserstrahl. Das dabei gestreute Licht wird von Detektoren gemessen, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC; forward scatter) mit der Zellgröße korreliert, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (SSC; sideways scatter) von der Granularität der Zelle abhängt, also

gegebenenfalls von der Größe des Zellkerns oder von intrazellulären Strukturen (z.B. Vesikel). Für die Messung verschiedener Fluoreszenzen werden zusätzlich Laser verschiedener Wellenlängen sowie unterschiedliche Filter zur Signalerkennung benötigt. Auf diesem Weg können mittels FACS sowohl spezifische Zellpopulationen mit definierten Merkmalen aus einem Konsortium isoliert und separiert werden, als auch Mikrotiterplatten mit einer vorgegebenen Zellzahl inokuliert werden. Der Flüssigkeitsstrom mit der Zellsuspension bricht an einer definierten Stelle ab, sodass jeder entstehende Tropfen die gewünschte Zellzahl enthält. Diese Tropfen werden dann elektrisch aufgeladen, abgelenkt und so in geeignete Reaktionsgefäße sortiert. Die hohe Durchsatzleistung der Durchflusszytometrie gewährleistet dabei die Produktion einer Vielzahl einzelner Zellen für weitergehende Studien (z.B. ‚whole genome amplifications‘).

‚Whole genome amplification‘ (WGA) und Einzel-Zell-Genomik

Einzel-Zell-Genomik basierend auf Gesamt-Genom-Amplifizierungen (‚whole genome amplification‘; WGA) ist eine neue Methode mit zunehmender Bedeutung für das Gebiet der Umweltmikrobiologie (Binga *et al.* 2008, Hutchison und Venter 2006, Ishoey *et al.* 2008). Diese Technik gewährt genomische Einblicke in komplexe mikrobielle Konsortien, deren Vertreter nicht-kultivierbar sind und basiert auf einer unspezifischen genomischen Amplifizierung unter Verwendung eines Gemischs an Hexamer-Primern sowie einer phi29-Polymerase. Dabei genügen geringste Mengen an Ausgangs-DNA; sogar genomische DNA von Einzelzellen kann dabei als ‚template‘ für die ‚whole genome amplification‘ (WGA) dienen. Die amplifizierte DNA kann dann weitergehenden Anwendungen unterzogen werden, so z.B. der Klonierung in Vektoren.

Mussmann und Kollegen (2007) gelang es, die genomische DNA einzelner *Beggiatoa*-Filamente Gesamt-Genom-Amplifizierungen zu unterziehen. Dadurch konnten u.a. chemolithotrophe Stoffwechselwege dieses marinen Bakteriums rekonstruiert werden. Die erfolgreiche Vereinzelung von Bakterien mittels FACS in Kombination mit ‚whole genome amplifications‘ konnte erstmalig an *Escherichia coli* gezeigt werden (Raghunathan *et al.* 2005). Mittlerweile wurden auch pelagische marine Bakterien solchen Studien unterzogen (Stepanauskas und Sieracki 2007). Diese Studien belegen allesamt das große Potential von Einzel-Zell-basierten Studien für die genomische Charakterisierung komplexer bakterieller Lebensgemeinschaften.

2.5. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation war es, neue Einzel-Zell-basierende Methoden zur Bakteriencharakterisierung auf das Gebiet der Schwamm-Mikrobiologie zu übertragen. Dabei sollten sowohl Kultivierungs-abhängige als auch Kultivierungs-unabhängige methodische Ansätze verfolgt werden, um in erster Linie mehr Information über das Candidatus Phylum *Poribacteria* zu erlangen. Über einen auf dem ‚dilution-to-extinction‘ Prinzip beruhenden Kultivierungsansatz galt es, neue bakterielle Isolate aus dem mediterranen Schwamm *Aplysina aerophoba* im Hochdurchsatz-Verfahren zu gewinnen. Auf diesem Weg erhaltene Stämme sollten ferner in Reinkultur angezogen und phylogenetisch auf eine etwaige permanente Assoziation mit dem Schwamm hin untersucht werden. Weiterhin sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Protokoll zur FACS-Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Bakterien etabliert werden. Ein Ziel bestand darin, die genomische DNA dieser vereinzelt Mikroorganismen durch die Anwendung von ‚whole genome amplifications‘ für weitergehende Anwendungen zugänglich zu machen. Dazu zählte sowohl die Konstruktion einer ‚large insert‘-Bank unter der Verwendung von Cosmiden, als auch die direkte Pyrosequenzierung der amplifizierten DNA mittels 454-Technologie. Durch die Kombination dieser Einzel-Zell-basierenden Techniken sollten speziell Mitglieder des Schwamm-spezifischen Konsortiums genauer charakterisiert werden, welche funktionell gar nicht oder nur unzureichend beschrieben sind. Der Fokus lag hierbei auf dem neu entdeckten Candidatus Phylum *Poribacteria*. Ein weiteres Hauptaugenmerk lag auf der Identifizierung und Beschreibung von Genen, die mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziiert sind. Durch die Verwendung von vereinzelt Zellen sollte schließlich eine Verknüpfung von phylogenetischer Identität und spezifischer Funktion erreicht werden. Dadurch sollte ein erweiterter Beitrag zum Verständnis der Schwamm-Bakterien-Interaktion, etwa durch die Identifikation potentieller Symbiose-Determinanten, geleistet werden.

3. Methoden

Sämtliche, im Rahmen dieser Doktorarbeit benutzten Materialien, Geräte, Chemikalien, Enzyme und ‚kits‘, sowie eine Auflistung aller verwendeten Oligonukleotide und die Zusammensetzung von Nährmedien, Puffern und Lösungen sind im Anhang (Kapitel 8) aufgeführt.

3.1. Sammeln und Hältern von *Aplysina aerophoba*

Für die Extraktion des mikrobiellen Konsortiums sowie für alle darauf basierenden Experimente dieser Doktorarbeit diente der mediterrane Schwamm *Aplysina aerophoba* (Ordnung: Verongida; Familie: Aplysinidae) (Abb. 2-1). Die Sammlung der Individuen erfolgte in Wassertiefen von 5-15 m vor der kroatischen Küste nahe der Stadt Rovinj (45°05'N, 13°38'E) während Tauchgängen im Mai 2005, April 2006, Mai 2007 sowie April 2008. Unter Vermeidung von direktem Kontakt mit Luft wurden diese entweder noch vor Ort experimentell genutzt oder aber lebend nach Deutschland transportiert und dort in einem Meerwasseraquarium gehältert. Für molekulare Arbeiten diente sowohl frisches als auch tiefgefrorenes Schwammmaterial, wohingegen bei Kultivierungsexperimenten ausschließlich frische Schwamm-Individuen für die Isolierung des mikrobiellen Konsortiums herangezogen wurden.

3.2. Isolierung des mikrobiellen Konsortiums aus *Aplysina aerophoba*

Die Abtrennung der Schwamm-assoziierten Prokaryonten (SAPs) vom Schwammgewebe erfolgte nach einem veröffentlichten Protokoll für metagenomische Anwendungen (Fieseler 2005). Dafür wurde zunächst mit einem sterilen Skalpell der Kernbereich (‚core‘ mit Mesohyl) vom Pinacoderm befreit, in ca. 5 mm³ große Stücke zerkleinert und diese in eiskaltem Calcium- und Magnesium-freiem künstlichem Meerwasser (CMF-ASW) mit 10 mM EDTA unter heftigem Vortexen mehrfach für je 15 min gewaschen, um in das Kanalsystem eingestrudelte Meerwasserbakterien zu entfernen. Nach Verwerfen des Überstands fand eine vollständige Homogenisierung der Gewebestücke in einem Mörser statt. Die gewonnene Suspension wurde mit CMF-ASW versetzt und erneut für weitere 10 min

heftig geschüttelt. Das Fehlen von Ca^{2+} - sowie Mg^{2+} -Ionen förderte eine Dissoziation der Schwammzellen, was eine saubere Fraktionierung erlaubte. Die Filtrierung des Homogenisats durch ein Nitex-Sieb (Porengröße 30 μm) diente dem Entfernen von Gewebestücken sowie noch vorhandener Zellaggregate. Anschließend fand eine differentielle Zentrifugation der gefilterten Suspension statt. Zunächst wurde die Schwammzellfraktion bei 600 x g abgetrennt (45 min, 4 °C, Heraeus Megafuge 1.0R), der Überstand dekantiert und die gesamte SAP-Fraktion bei 6.000 x g pelletiert (45 min, 4 °C). Um die in Lösung befindlichen Sekundärmetabolite zu entfernen, wurde das Pellet solange mit eiskaltem CMF-ASW gewaschen (6.000 x g, jeweils 30 min, 4 °C), bis der Überstand klar blieb. Die mikrobielle Biomasse wurde entweder sofort weiterverarbeitet oder mit Glycerin (15 % Endvolumen) versetzt und bei -80 °C gelagert. Dabei wurde die Zellzahl so eingestellt, dass in einem Milliliter die Mikroorganismen aus 1 g Schwamm (ca. 10^9 Mikroorganismen) enthalten waren.

3.3. Allgemeine nukleinsäureanalytische Methoden

3.3.1. Isolierung genomischer DNA

Für die Extraktion von genomischer DNA aus SAP-Fractionen (Kapitel 3.2.) diente das ‚FastDNA Spin Kit (for soil)‘ der Firma MP Biomedicals, wobei ein pelletiertes 500 μl -Aliquot (entspricht ca. 10^4 Zellen) für eine Extraktion eingesetzt wurde. Im Gegensatz zu den Angaben des Herstellers fanden dabei jedoch zwei Waschschriffe mit Puffer SEWS-M statt, um DNA-Kontaminationen mit verbliebenen Sekundärmetaboliten zu vermeiden. Ferner erfolgte die Eluierung der DNA mit 50 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ anstatt DES. Für die Isolierung von DNA aus marinem Sediment wurden 500 μg der Probe direkt in die Reaktion eingesetzt. Zur Extraktion genomischer DNA aus Meerwasser wurde dieses zunächst auf einen 0,2 μm Filter aufgezogen und dieser dann ebenfalls mit dem Kit bearbeitet.

Um Bakterienisolate phylogenetisch zu klassifizieren, wurde chromosomale DNA mittels verschiedener Methoden isoliert. Führte direktes Aufkochen von einzelnen Kolonien während der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) nicht zum gewünschten Ergebnis (‚Kolonie-PCR‘, siehe Kapitel 3.3.4.), wurde etwas Biomasse des zu untersuchenden Isolats in 100 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ resuspendiert und für 10 min aufgekocht. Ein Zentrifugationsschritt diente der Abtrennung der freigesetzten DNA von zellulären Bestandteilen. Alternativ wurde das ‚QIAamp DNA

Mini Kit[®] der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers verwendet oder chromosomale DNA mit Hilfe von Lysozym und Proteinase K isoliert. Dafür wurden 2 ml einer Flüssigkultur des zu untersuchenden Isolats pelletiert, das Pellet in 1 ml TNE-Puffer gewaschen und anschließend in 270 µl TNEX-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 25 µl Lysozym (Stocklösung 10 mg/ml) und einer 30 minütigen Inkubation bei 37 °C wurden 50 µl Proteinase K (Stocklösung 20 mg/ml) hinzupipettiert. Nach Klärung der Lösung (ca. 2 h bei 60 °C) erfolgte die Zugabe von 15 µl 5 M NaCl und 500 µl eiskaltes EtOH (100 %) sowie die Pelletierung der DNA für 15 min bei maximaler Geschwindigkeit. Das Pellet wurde mit 70 %igem EtOH gewaschen, luftgetrocknet und schließlich in 100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

Für die Klassifizierung bakterieller Isolate aus dem ‚dilution-to-extinction‘-Experiment (Kapitel 3.4) wurden 200 µl der jeweiligen Flüssigkultur zunächst mechanisch durch jeweils drei Einfrier-Auftau-Zyklen (jeweils für 10 min -80 °C bzw. 70 °C) aufgeschlossen. Danach wurde genomische DNA mit Hilfe des ‚DNeasy Blood & Tissue Kits‘ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Für die Eluierung der DNA dienten hierbei jedoch 100 µl H₂O_{bidest}.

Die Lagerung von genomischer DNA in Lösung erfolgte prinzipiell bei 4 °C, z.T. aber auch bei -20 °C (amplifizierte genomische DNA). Die Gewinnung genomischer DNA aus vereinzelt Bakterienzellen wird separat in Kapitel 3.6.1. beschrieben.

3.3.2. Elektrophoretische Methoden

Für Standardanalysen von PCR-Produkten wurden 1 %ige Agarosegele in 1 x TAE verwendet; für die Auswertung von Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen (RFLPs) 3 %ige Agarosegele. Zur Größenbestimmung von Cosmidinserts dienten 0,8 %ige Agarosegele. Zudem kamen für die Bewertung hochmolekularer DNA, so z.B. chromosomale DNA aus SAP-Fractionen oder ‚whole genome amplification‘-Produkte spezielle ‚low melt‘-Agarosegele zum Einsatz. Dafür wurde zunächst ein 1 %iges Gel mit auf 50 °C abgekühlter ‚low melt‘-Agarose der Firma Bio-Rad gegossen, nach dem Polymerisieren die obersten 2 cm inkl. der Taschen ausgeschnitten und dieser Bereich mit einem 1 %igen ‚low melt‘-Agarosegel inkl. 2 % PVP aufgefüllt. Die verwendeten DNA-Größenstandards (Marker) sind im Kapitel 8.6. aufgelistet. Alle zu untersuchenden Fragmente wurden elektrophoretisch in

1 x TAE bei 6 V / cm aufgetrennt, mit Ethidiumbromid (EtBr; 10 mg / ml) angefärbt und die Gele unter einem UV-Transilluminator (Gel Doc 2000; BioRad) fotografiert.

3.3.3. DNA-Konzentrationsmessung

Die Messung von DNA-Konzentrationen in Lösung erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Dazu wurden entweder Quarzküvetten (1 cm Breite) unter Verwendung eines herkömmlichen Photometers (Ultraspec 3000; Pharmacia Biotech) verwendet oder aber direkt 1 µl der DNA-Lösung für die Messung an einem NanoDrop ND1000 Spektrophotometer (PiqLab) eingesetzt. Als Nullwert diente derselbe Puffer, der für die DNA-Eluierung verwendet wurde. Grundlage der Konzentrationsbestimmung ist das Lambert-Beer'sche Gesetz ($A = E * b * c$), wobei A die Absorption in Absorptionseinheiten darstellt, E den Extinktionskoeffizienten (für doppelsträngige DNA: 50 ng * cm / ml), b den Lichtweg in cm und c die Konzentration in mol / l. Letztlich wird dadurch die DNA in ng / µl quantifiziert. Zusätzlich wurde die 260 / 280 Ratio bestimmt, welche ein Maß für die Reinheit der DNA darstellt. Dabei repräsentiert ein Wert von ca. 1,8 pure DNA, wohingegen geringere Werte ein Indiz für Kontaminationen, z.B. mit Proteinen sind. Ein zweiter Indikator für die Reinheit der gemessenen DNA ist die 260 / 230 Ratio, deren optimaler Wert zwischen 1,8 und 2,2 liegen sollte.

3.3.4. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Für die spezifische Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Nachweis von ribosomalen und funktionellen Genen wurden Polymerase-Ketten-Reaktionen (PCRs) durchgeführt. Als Matrize („template“) dafür dienten sowohl extrahierte genomische DNA aus SAP-Fraktionen und bakteriellen Isolaten, aber auch bakterielle Biomasse (Kolonie-PCR), sowie Plasmid- und Cosmid-Präparationen. Dafür dienten wenn nötig DNA-Verdünnungen von bis zu 1:1000. Als Positivkontrolle wurde, falls nicht anders angegeben, entweder *Escherichia coli* (für die Amplifikation von 16S rRNA Genfragmenten) oder SAP-DNA verwendet, für Negativkontrollen wurde dem Reaktionsgemisch keine Matrize zugefügt. Ein typischer 50 µl PCR-Ansatz enthielt 10 x PCR-Puffer (Qiagen), 2 mM von beiden Primern, 0,2 mM dNTPs (Sigma), sowie 1,25 U *Taq* DNA Polymerase (Qiagen). Bei Bedarf wurden 1 µl einer MgCl₂-

Lösung (Qiagen) und 5 x Q-Solution (Qiagen) zugefügt. Bei größeren Ansätzen wurden entweder die Reaktionsvolumina verringert oder auf den ‚REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix‘ (Sigma) zurückgegriffen, der bereits alle PCR-Komponenten mit Ausnahme der Primer enthält. Sämtliche, im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Oligonukleotid-Primer sind tabellarisch unter Angabe der Sequenzen im Anhang (Kapitel 8.5.) aufgelistet. Das Standard-PCR-Protokoll umfasste folgende Schritte: initiale Denaturierung bei 96 °C (für 2 min unter Verwendung extrahierter DNA; für 5 min bei Kolonie-PCRs), und darauf folgende 30-40 Zyklen bestehend aus einer weiteren Denaturierung für 30-45 sec bei 96 °C, dem Primer-Annealing für 30-45 sec sowie der Elongation bei 72 °C. Abschließend erfolgte eine End-Elongation bei 72 °C für 5 min. Die Annealing-Temperatur wurde individuell für die jeweils verwendeten Primerpaare berechnet, wobei diese zunächst auf 5 °C unter der niedrigeren Schmelztemperatur T_m der beiden Primer eingestellt und später gegebenenfalls nachjustiert wurde. Die Schmelztemperatur wird dabei vom Hersteller (Sigma) angegeben oder kann alternativ über die Formel $T_m = 4 * (G + C) + 2 * (A + T)$ ausgehend von der Nukleotidsequenz kalkuliert werden. Die Elongationsdauer wurde ausgehend von der zu erwartenden Fragmentlänge eingestellt. Der Berechnung lag dabei eine durchschnittliche DNA-Syntheserate von ca. 1 kb / min für die *Taq* DNA Polymerase zugrunde.

Als einzige Ausnahme hiervon ist die PCR zur Detektion von Adenylierungs- (A-) Domänen nicht-ribosomaler Peptidsynthetasen (NRPS) zu nennen. Durch Verwendung der degenerierten Primer A3 und A7R (Ayuso-Sacido und Genilloud 2005) musste hierbei die Annealingzeit auf 2 min und die Elongationsdauer auf 4 min erweitert werden. Für den Nachweis von 16S rRNA-Genen in Proben mit nur geringen DNA-Mengen (z.B. im Rahmen des ‚dilution-to-extinction‘-Kultivierungsprojekts) wurden sogenannte ‚nested‘-PCRs durchgeführt. Dafür wurde zunächst eine PCR mit den universellen bakteriellen Primern 27f-B und 1492r-B durchgeführt. Dieses PCR-Produkt diente dann als Matrize für eine zweite ‚nested‘-PCR mit den ebenfalls universellen Primern 27f-B und 1406r (Suzuki und Giovannoni 1996). Für den Nachweis von poribakterieller 16S-rDNA diente das spezifische Primerpaar 389f/ 1130r (Fieseler *et al.* 2004). Die universellen bakteriellen Primer sind hierfür aufgrund von Fehlpaarungen innerhalb der 27f-Primerbindungsstelle nicht geeignet (Fieseler 2005).

Für weitergehende Anwendungen (u.a. Klonierung und Sequenzierung) wurden die PCR-Produkte zunächst gelelektrophoretisch analysiert und mit Hilfe des ‚QIAquick PCR Purification Kits‘ (Qiagen) laut Angaben des Herstellers aufgereinigt. Waren neben dem

PCR-Produkt der richtigen Größe noch unspezifische Banden auf dem Agarosegel erkennbar, erfolgte unter Verwendung des ‚QIAquick Gel Extraction Kits‘ (Qiagen) die Extraktion der gewünschten Bande aus dem Gel nach dem Protokoll des Herstellers.

3.3.5. Herstellung kompetenter Zellen

Der Herstellung elektrokompenter Zellen diente der *E. coli* Stamm XL1 blue. Dafür wurde zunächst 1 l LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5-0,7 geschüttelt (37 °C, 300 rpm). Einer 30 minütigen Inkubation auf Eis folgte die Pelletierung der Zellen für 20 min bei 4 °C und 6.000 rpm (Heraeus, Megafuge 2R) sowie ein Waschschriff mit 1 l sterilem, eiskaltem H₂O_{bidest.} Dieser Waschschriff wurde zunächst mit 0,5 l H₂O_{bidest.}, danach mit 10 %igem Glycerin wiederholt. Schließlich wurden die Zellen in einem Volumenverhältnis von 1:1 in einer 10 %igen Glycerinlösung resuspendiert und in 80 µl-Aliquots bei -80 °C gelagert.

Alternativ dazu wurde für die Herstellung von hitzekompetenten Zellen der *E. coli* Stamm Novablue der MnCl₂-Methode unterzogen. Dafür wurden 250 ml SOB-Medium mit 2 ml einer Novablue-Übernachtskultur inokuliert und bei 19 °C und 200 rpm bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 wachsen gelassen. Einer 10 minütigen Inkubation auf Eis folgte die Pelletierung der Zellen für 10 min bei 4 °C und 4.000 rpm. Das Zellpellet wurde vorsichtig in 80 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für weitere 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Pelletierung (10 min, 4 °C, 4.000 rpm) wurden die Zellen vorsichtig in 20 ml eiskaltem TB-Puffer und 1,4 ml DMSO gelöst. Der Lagerung von 80 µl-Aliquots bei -80 °C ging letztlich ein Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff voraus.

3.3.6. Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte, die von der *Taq* DNA Polymerase generiert wurden, zeichnen sich durch ein am 3‘-Terminus angefügtes Adenin aus und konnten somit direkt in die bereits linearisierten Vektoren pGEM-T und pGEM-T Easy (Promega), die einen ‚T-Überhang‘ besitzen, ligiert werden. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers verfahren. Für die Transformation der Plasmide kamen sowohl elektrokompente als auch hitzekompente *E. coli*-Zellen (siehe Kapitel 3.3.5.) zum Einsatz.

Für die Elektroporation wurde zunächst ein Aliquot elektrokompetenter *E. coli* XL1 blue-Zellen auf Eis aufgetaut und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (EquiBio, EPC 102) überführt. Nach der Zugabe von 1-2 µl des Ligationsansatzes wurde der Ansatz für 10 min auf Eis inkubiert und die Zellen danach durch einen elektrischen Impuls bei 2,5 kV (EquiBio, Easyject PRIMA) transformiert. Der sofortigen Zugabe von 1 ml SOC-Medium folgte die Inkubation der Zellen in einem 2 ml-Reaktionsgefäß für ca. 2 h bei 37 °C unter Schütteln. Danach wurden die Zellen auf AIX-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert, um über eine ‚Blau-Weiß-Selektion‘ plasmidtragende Klone mit Insert zu identifizieren. Weiße Klone wurden direkt in eine Kolonie-PCR mit den Vektorprimern SP6 und T7 eingesetzt, um das Vorhandensein eines Inserts der richtigen Größe zu verifizieren.

Alternativ zur Elektroporation erfolgten Hitzetransformationen des *E. coli* Stamms Novablue. Dafür wurde zunächst ein Aliquot hitzekompetenter Novablue-Zellen auf Eis aufgetaut. Der Zugabe von 1-2 µl Ligationsansatz folgte eine 30 minütige Inkubation auf Eis sowie die Hitzetransformation für 90 sec bei 42 °C im Heizblock. Nach weiteren 5 min auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugefügt und der Ansatz für ca. 2 h bei 37 °C geschüttelt. Auch hier fanden im Anschluss eine ‚Blau-Weiß-Selektion‘ sowie eine Überprüfung der Insertgröße statt.

Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus-(RFLP-) Analysen wurden im Anschluss an die Kolonie-PCRs (mit den Vektor-spezifischen Primern SP6 und T7) durchgeführt, falls eine Heterogenität von amplifizierten Fragmenten zu vermuten war (z.B. unter Verwendung von SAP-DNA als ‚template‘). Dadurch sollte zum Einen die Diversität von PCR-amplifizierten Genfragmenten bestimmt werden und zum Anderen die Anzahl von Plasmid-Mini-Präparationen und Sequenzierungen minimiert werden. Zu diesem Zweck wurde, soweit nicht anders vermerkt, ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzympaaren *MspI* und *HaeIII* bzw. mit *HhaI* und *DpnII* (alle New England Biolabs) durchgeführt. Ein 20 µl RFLP-Reaktionsansatz beinhaltete dabei 10 µl PCR-Produkt, 10 U eines jeden Enzyms sowie 10 x NEB Puffer 2 (für *MspI* und *HaeIII*) bzw. Puffer 3 (für *HhaI* und *DpnII*). Der Verdau fand bei 37 °C für ca. 2 h statt und wurde anschließend auf ein 3 %iges Agarosegel aufgetragen. Daraufhin erfolgte eine Zuordnung der Bandenmuster mit verschiedenen Phylotypen. Von allen weiterverwendeten Klonen wurden Kryokulturen mit Glycerin (15 % Endkonzentration) angefertigt, die bei -80 °C gelagert wurden.

3.3.7. Plasmid-Mini-Präparation

Für die analytische Präparation von Plasmiden wurden zunächst Übernachtskulturen von ausgewählten weißen Klonen in 2 ml LB_{amp} angezogen. Die Zellen der stationären Wachstumsphase wurden dann bei 13.000 rpm für 2 min pelletiert (Heraeus, Biofuge pico). Dieser, sowie alle folgenden Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 1 sorgfältig resuspendiert und weitere 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 2 zugegeben. Nach vorsichtigem Durchmischen der Proben durch Invertieren wurden 150 µl Plasmid Miniprep Puffer 3 hinzu pipettiert und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Das entstandene Präzipitat wurde für 20 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert. Der nun klare Überstand wurde wiederum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, die Plasmid-DNA durch Zugabe von 350 µl Isopropanol (= 0,7 % v/v) gefällt und im Anschluss daran für 15 min bei 13.000 rpm pelletiert. Die DNA wurde mit 250 µl 70 %igem EtOH gewaschen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 50 µl H₂O_{bidest} aufgenommen. Die Lagerung von Plasmiden in Lösung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -20 °C.

3.3.8. DNA-Sequenzierung

Im folgenden Kapitel wird die direkte Sequenzierung von PCR-Produkten sowie die Sequenzierung von Plasmidinserts beschrieben. Das Vorgehen zur Sequenzierung von Cosmiden und zur direkten Sequenzierung von ‚whole genome amplification‘-Produkten mittels 454-Technologie wird in den Kapiteln 3.7.9. bzw. 3.8.1. abgehandelt.

Eine direkte Sequenzierung von PCR-Produkten diente der schnellen Überprüfung homogener PCR-Produkte (z.B. von Reinkulturen). Dafür wurde jeweils einer der bereits für die PCR eingesetzten Primer verwendet, sowie die entsprechende Annealingtemperatur (max. 60 °C). In den meisten Fällen wurde die Sequenzier-PCR mit isolierter Plasmid-DNA als Matrize und unter Verwendung der pGEM-Vektoren-bindenden Primer SP6 und T7 durchgeführt. Auf diesem Weg konnte, im Gegensatz zur direkten Sequenzierung von PCR-Produkten, die vollständige Sequenz des Inserts erhalten werden. Zusätzlich wurde bei Inserts mit mehr als 1 kb der Mittelteil sequenziert, um überlappende Teilsequenzen zu erhalten (z.B. mit 341f oder 907r für das 16S rRNA-Gen).

Ein 10 µl Sequenzier-PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten: 2 µl Premix, 2 µl 5 x Sequenzierpuffer (ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit), 1,5 µl Plasmid-DNA bzw. 1 µl PCR-Produkt, sowie 1 µl eines Primers (Stock-Konzentration 25 pmol / µl). Die Sequenzier-PCR startete mit einer initialen Denaturierung für 2 min bei 96 °C, gefolgt von 30 Zyklen, bestehend aus einer weiteren Denaturierung bei 96 °C für 30 sec, der Primer-Hybridisierung (SP6: 45 °C; T7: 50 °C) für 15 sec, sowie der Elongation bei 60 °C für 4 min. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz gegebenenfalls über eine Ethanol-fällung aufgereinigt, wofür zunächst 90 µl H₂O_{bidest.}, 10 µl 3 M NaAc (pH 4,6) sowie 250 µl 100 % EtOH_{abs.} zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert (Heraeus, Biofuge pico) wurde. Das Pellet wurde mit 250 µl 70 % EtOH_{abs.} gewaschen und erneut für 5 min bei Raumtemperatur und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Entfernen des Ethanol fand ein Trocknen des Pellets bei 37 °C und abschließend eine Aufnahme in 25 µl HiDi-Formamid statt. Die Analyse der Sequenzier-PCR-Produkte wurde am Institut für Immunologie und Virologie der Universität Würzburg unter Verwendung eines Perkin Elmer ABI 377 XL Sequenzierers durchgeführt.

3.3.9. Sequenzauswertung

Die Rohsequenzdaten wurden mit Hilfe der Software ‚Contig Express‘ des Programmpakets ‚Vektor NTI Advance 10‘ (Invitrogen) analysiert und gegebenenfalls manuell nachbearbeitet. Hier fanden u.a. die Exzision der Vektorsequenzen sowie die Generierung von überlappenden Sequenzbereichen (‚contigs‘) aus einzelnen Teilsequenzen statt. Die DNA-Sequenzen wurden dann mit der Datenbank (‚GenBank‘) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) unter Verwendung des ‚Basic Local Alignment Search Tools‘ (BLAST) abgeglichen (Altschul *et al.* 1997). Für rRNA- sowie tRNA-Gensequenzen diente dabei BLASTn, für Protein-kodierende Gensequenzen BLASTx. Alternativ wurden Protein-kodierende DNA-Sequenzen zunächst mit Hilfe des Online-Tools ‚EMBOSS Transseq‘ in alle 6 Leseraster übersetzt und die eigentliche Proteinsequenz über BLASTp analysiert. Sämtliche 16S rRNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der beiden Programme ‚Pintail‘ (Ashelford *et al.* 2005) und ‚Chimera Check‘ auf das Vorhandensein von Chimären untersucht. Die methodische Auswertung von Cosmidsequenzierungen und 454-Sequenzierdaten wird in den Kapiteln 3.7.10. bzw. 3.8.3. behandelt.

3.3.10. Phylogenetische Analysen

Zur Berechnung phylogenetischer Stammbäume wurden mehrere Referenzsequenzen der zu klassifizierenden Sequenzen unter Verwendung der Online-Datenbank Genbank ausgewählt. Der Wurzelung der Stammbäume diente zusätzlich eine entfernt verwandte Sequenz, so z.B. das 16S rRNA-Gen eines Vertreters aus einem anderen Phylum. Unter Verwendung des 16S rRNA-Gens als phylogenetischem Marker wurden Nukleotidsequenzen verwendet, für phylogenetische Analysen von Proteinen hingegen Aminosäuresequenzen. Die Sequenzen wurden auf richtige Orientierung hin untersucht und über das Programm ‚ClustalX‘ automatisch aligniert. Die computergenerierten Alignments wurden manuell im Sequenz-Alignment-Editor ‚Align‘ (Hepperle 2002) überprüft und wenn nötig korrigiert. Ebenso erfolgte hier ein Zurechtschneiden der Sequenzen auf einen Alignmentblock gleicher Länge. Phylogenetische Stammbaum-Berechnungen erfolgten mit Hilfe des ‚ARB‘-Programm-Pakets (Ludwig *et al.*, 2004). Dabei kamen sowohl Distanzmatrizen (‚neighbor joining‘), als auch Parsimonie-Optionen (‚DNAPars‘ bzw. ‚PROTPars‘) zum Einsatz. Als Korrekturfaktor für Distanzanalysen diente die ‚Jukes-Cantor-Correction‘. Soweit nicht anders angegeben, dienten 1000 Baumberechnungen zur Erstellung eines ‚Consensus-Baums‘, welcher mit Hilfe des Programms ‚Treeview‘ visualisiert wurde.

3.4. Mikrobielle Kultivierung mittels ‚dilution-to-extinction‘

Ein erstes, auf dem Prinzip der ‚dilution-to-extinction‘ beruhendes Hochdurchsatz-Kultivierungsexperiment wurde in Kooperation mit Prof. Dr. Stephen Giovannoni in dessen Labor am Department for Microbiology an der Oregon State University (Corvallis, Oregon, USA) im Juni 2005 durchgeführt. Ein zweiter experimenteller Ansatz fand dann im September 2005 am Zentrum für Infektionsforschung an der Universität Würzburg statt. Um eventuellen Kontaminationen vorzubeugen, wurden sämtliche Arbeiten mit Filter-Pipettenspitzen (‚filter-tips‘) durchgeführt. Ein methodischer Überblick zur Kultivierung von Schwammbakterien mittels ‚dilution-to-extinction‘ ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

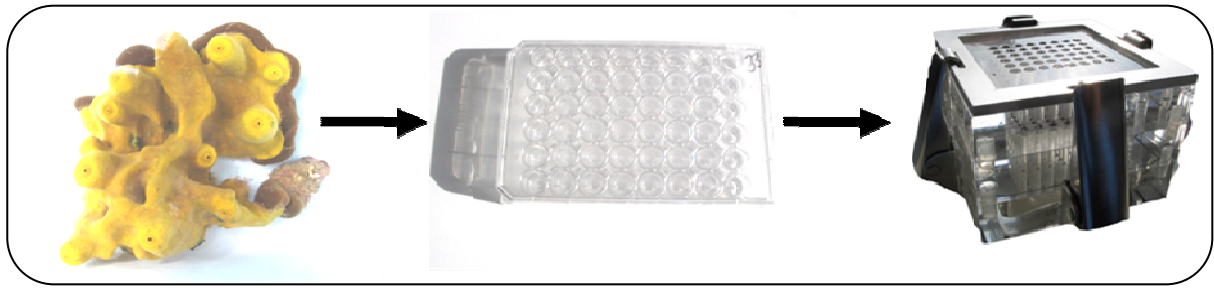


Abb. 3-1: Überblick über die ‚dilution-to-extinction‘ Methode zur Kultivierung Schwamm-assoziiierter Bakterien. In einem ersten Schritt wird dabei das mikrobielle Konsortium über Verdünnungen auf eine definierte Zellzahl eingestellt und damit Mikrotiterplatten angeimpft. Nach der Inkubation werden Proben auf Filter aufgezogen und mikroskopisch auf Wachstum hin untersucht.

3.4.1. Verdünnung des mikrobiellen Konsortiums

Im Rahmen des ersten Kultivierungsversuchs wurden Kryo-SAPs von vier verschiedenen *Aplysina aerophoba*-Individuen mikroskopisch ausgezählt und dann unter Verwendung der jeweiligen Medien auf folgende Zellzahlen justiert: 5 Zellen bzw. 15 Zellen pro 100 μ l. Die Sammlung der Schwämme, die Isolierung der SAPs aus dem frischen Schwammgewebe sowie das Schockgefrieren der SAPs fand im Mai 2005 im Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj, Kroatien statt.

Für das zweite Kultivierungsexperiment stand frisches Schwammmaterial zur Verfügung. Für die Inokulation dienten frisch extrahierte SAPs (siehe Kapitel 3.2.) bzw. Schwammextrakt aus zwei verschiedenen *A. aerophoba* Individuen. Die Schwämme wurden von Tauchern des Biologischen Instituts der Universität Stuttgart während einer Expedition nach Rovinj, Kroatien im September 2005 gesammelt, lebend nach Deutschland transportiert und im Zentrum für Infektionsforschung in Würzburg innerhalb von 24 h weiterverarbeitet. Für die Erstellung des Schwammextrakts wurde in Stücke geschnittener Kernbereich gemörsert und in CMF-ASW (inkl. 10 mM EDTA) geschüttelt. Es folgte eine Passage des Homogenisats durch einen Faltenfilter, dessen Extrakt der mikroskopischen Bestimmung der Zellzahl diente. Die Zellpräparationen wurden schließlich mit CMF-ASW auf folgende Konzentrationen eingestellt: 10 bzw. 100 Zellen pro 20 μ l CMF-ASW.

3.4.2. Herstellung von Flüssigmedien

Für den ersten Kultivierungsansatz im Juni 2005 wurden zwei verschiedene Meerwasser-basierte Medien hergestellt. Das Meerwasser stammte aus der Nähe von Newport (Oregon, USA) aus einer Tiefe von 5 m. Die beiden Medien unterschieden sich nur durch das Vorhandensein eines 0,01 %igen Bakterienlysats beim sog. ‚+‘-Medium. Dafür wurden drei marine Bakterienisolate (SB89 [*alpha-Proteobacteria*], SB177 [*Vibrio* sp.], SB200 [*Pseudoalteromonas* sp.]; Stammsammlung ZINF) bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezogen, die Kulturen danach autoklaviert und sterilfiltriert (0,2 μm Porengröße). Durch diesen Zusatz sollte eine zusätzliche Versorgung des Mediums mit Kohlenstoff bzw. Bakterienmetaboliten gewährleistet werden. 4 l Meerwasser wurden ebenfalls autoklaviert und sterilfiltriert (0,2 μl Porengröße) und für 12 h mit CO_2 sowie für weitere 24 h mit Luft versetzt. Daran folgte die Zugabe von 400 μl einer sterilfiltrierten Vitaminlösung (siehe Kapitel 8.3.). Der zusätzlichen Versorgung mit Stickstoff (bzw. Ammonium) und Phosphor (bzw. Phosphat) diente die Zugabe von sterilfiltrierten Lösungen der folgenden Salze: Dikaliumhydrogenphosphat (Endkonzentration 10 μM) und Ammoniumchlorid (Endkonzentration 100 μM). Ammonium wurde als Stickstoff-Quelle gewählt, da Stickstoff zumindest in *A. aerophoba* in erster Linie in dieser Form vorliegt, mit Raten von bis zu 1,5 $\mu M g^{-1}$ Trockengewicht h^{-1} vom Schwamm ausgeschieden und von Schwammbakterien metabolisiert wird (Bayer *et al.* 2008).

Im Rahmen des zweiten Kultivierungsansatzes im September 2005 wurden insgesamt 12 verschiedene Medien präpariert, mit denen jeweils vier 48-,well‘-Platten befüllt wurden. Sämtliche Medienzusammensetzungen sind im Anhang (Kapitel 8.3.) aufgeführt. Alle 12 Medien waren dabei Meerwasser-basiert, das im Mai 2005 vor der kroatischen Küste nahe der Stadt Rovinj (45°05'N, 13°38'E) in Tiefen von 5-15 m gesammelt, danach entweder sterilfiltriert (0,2 μm Porengröße) oder zusätzlich autoklaviert wurde. Der Stickstoffversorgung lagen zwei Bedingungen zugrunde: zum Einen wie bereits für das erste Kultivierungsexperiment 10 $\mu M PO_4^{3-}$ und 100 $\mu M NH_4^+$, zum Anderen die niedrigeren Konzentrationen 5 $\mu M PO_4^{3-}$ und 10 $\mu M NH_4^+$. Auf den Zusatz eines Bakterienlysats wurde entweder verzichtet oder aber, wie oben beschrieben, in einer Endkonzentration von 0,01 % verwendet. Alternativ dazu wurden Kulturen der drei Bakterienisolate pelletiert und der Überstand nur sterilfiltriert, nicht aber autoklaviert. Dieser zellfreie Überstand wurde in einer Endkonzentration von 0,05 % den Medien zugegeben, damit gegebenenfalls hitzelabile Zellsekrete (z.B. ‚autoinducer‘) im Überstand erhalten bleiben. Alle Medien enthielten

dieselbe Konzentration an Vitaminen wie bereits im ersten Kultivierungsexperiment (siehe Kapitel 8.3.).

3.4.3. Inokulation und Inkubation

Für die Inokulation im Rahmen des ersten Kultivierungsexperiments wurden jeweils 900 µl der Medien in die Vertiefungen von 48-,well'-Platten vorgelegt und 100 µl der jeweiligen SAP-Verdünnungen zugefügt. Jede Platte beinhaltete mindestens eine Negativkontrolle (Medium ohne SAPs). Insgesamt belief sich der erste Kultivierungsansatz auf die Inokulation von 32 Platten (1.536 ,wells' abzüglich der Kontrollen). Nach dem Animpfen wurden die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 20 °C stehend für mindestens 5 Wochen bis zur mikroskopischen Auswertung inkubiert.

Für das zweite Kultivierungsexperiment wurden jeweils 1 ml Medium mit 10 oder 100 Zellen (in je 20 µl CMF-ASW) angeimpft. Insgesamt dienten so 48 Platten mit je 48 ,wells' der Inokulation (2.304 ,wells' abzüglich der Kontrollen). Die Inkubation der versiegelten Platten fand ebenfalls für mindestens 5 Wochen stehend bei 20 °C statt. Zusätzlich wurden die Platten des zweiten Kultivierungsversuchs einem zweiten ,screening' nach 9-10 monatiger Inkubation unterzogen, um gegebenenfalls langsam wachsende Isolate nachweisen zu können.

3.4.4. Mikroskopische Auswertung

Durch die Verwendung von Minimalmedien konnte nicht mit einer Trübung als Indiz für bakterielles Wachstum gerechnet werden, daher musste auf eine mikroskopische Bewertung zurückgegriffen werden. Für das ,screening' auf bakterielles Wachstum wurde eine spezielle ,cell array'-Apparatur verwendet, die das parallele mikroskopische ,screening' von 48 ,wells' einer Platte ermöglicht (Abb. 3-2).



Abb. 3-2: Spezielle Apparatur („cell array“) zum parallelen mikroskopischen „screening“ von 48-,well“-Platten (Eigenkonstruktion des Labors von Prof. Giovanni).

Dafür wurde zunächst der obere Aufsatz mit den 48 Bohrungen für 10 min in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ sonifiziert und die einzelnen Vertiefungen mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ nachgespült. Zwischen die beiden Array-Einheiten wurde ein Whatman-Filter und darauf ein Polykarbonatfilter ($0,2 \mu\text{m}$ Porengröße) gelegt und die Apparatur verschlossen. In jede Vertiefung wurden $200 \mu\text{l}$ Medium unter der Vermeidung von Luftblasen pipettiert, die Zellen mit $5 \mu\text{l}$ einer 10 %igen Formaldehydlösung fixiert und mit $10 \mu\text{l}$ des Fluoreszenzfarbstoffes 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI; Stocklösung $100 \mu\text{g} / \text{ml}$) angefärbt. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln erfolgte das Aufziehen der Proben auf den Filter unter Vakuum. Der Filter wurde der Apparatur entnommen, für 5 min getrocknet und auf einen Objektträger aufgebracht. Nach Überschichtung mit Immersionsöl und dem Auflegen eines Deckglases konnten die Filter am Fluoreszenzmikroskop unter der Verwendung eines $100 \times$ Objektivs, auf mikrobielles Wachstum hin analysiert werden. Sich deutlich vom Filterhintergrund absetzende DAPI-Signale in Form von typisch prokaryontischen Zellformen (z.B. Stäbchen, Kokken) dienten dabei als Grundlage für die Bewertung von mikrobiellem Wachstum.

3.4.5. Phylogenetische Klassifizierung von Isolaten

Von „wells“ die mikroskopisch positiv auf bakterielles Wachstum hin bewertet wurden, dienten $200 \mu\text{l}$ der DNA-Extraktion (siehe Kapitel 3.3.1.). Weitere $200 \mu\text{l}$ Kultur wurden mit $200 \mu\text{l}$ Medium (inkl. 20 % Glycerin) versetzt und als Kryokultur bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Die phylogenetische Identifizierung erfolgte mittels „nested“-PCR (siehe Kapitel 3.3.4.) unter Verwendung der degenerierten universellen bakteriellen Primerpaare 27f-B / 1492r-B und 27f-B / 1406r. Ein Restriktionsverdau des PCR-Produkts mit *HaeIII* (Fermentas) diente zum

Einen dazu, gleiche Phylotypen zu identifizieren und zum Anderen der Überprüfung von Reinkulturen. Nur bei Reinkulturen, nicht aber bei Mischisolaten ergibt die Summe der einzelnen RFLP-Banden das ca. 1,4 kb große PCR-Fragment. Eine grobe Klassifizierung der Isolate erfolgte über die Ansequenzierung des aufgereinigten PCR-Produkts mit dem Primer 27f-B, wohingegen für eine exakte Klassifizierung das PCR-Produkt kloniert und komplett sequenziert wurde. Die phylogenetische Stammbaumberechnung erfolgte gemäß der Anleitung aus Kapitel 3.3.10.

3.5. Vereinzlung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS

Zur Zell-Vereinzlung des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* wurde das FACS Vantage SE Durchflusszytometer mit FACSDiVa Option (Becton Dickinson) des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg verwendet. Die Anregung erfolgte dabei mit einem Laser der Wellenlänge 488 nm, gemessen wurden sowohl ‚forward‘ (FSC) und ‚sideways scatter‘ (SSC), als auch die Autofluoreszenzen bei 530 nm und 585 nm. Als interne Größenkontrolle diente eine Kultur des *Escherichia coli*-Stamms DH5 α , die zunächst pelletiert und dann in PBS resuspendiert wurde. In allen Folgeexperimenten wurden nur Schwamm-assoziierte Bakterien sortiert, die gleich groß und kleiner als *E. coli* waren. Von elektronenmikroskopischen Studien ist bereits bekannt, dass der Großteil an Schwammbakterien deutlich kleiner als 3 μm und somit kleiner als *E. coli* ist. Ausgehend von der Hauptpopulation an *E. coli*-Zellen erfolgte dann das Legen eines ‚gates‘ zur Zellsortierung von Schwammbakterien. Als Ausgangsmaterial für die Zellsortierung diente in einem ersten Versuch eine Kryo-SAP-Fraktion, die zunächst durch mehrere Waschschriffe von Glycerinresten befreit wurde. Die Schwämme wurden im April 2006 in Kroatien gesammelt, die SAP-Präparation erfolgte vor Ort im Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj. Für zwei weitere Folgeexperimente dienten frisch präparierte SAP-Fraktionen der Durchflusszytometrie. Hierfür sammelten Kollegen vom Biologischen Institut der Universität Stuttgart Schwämme im August 2007 bzw. April 2008 in Kroatien, welche lebend nach Deutschland transportiert wurden. Die SAP-Präparation aus frischem Schwammgewebe fand anschließend innerhalb von 24 h in Würzburg statt. Sortiert wurde generell in 96-‚well‘-Platten, in deren Vertiefungen bereits 10 μl TE-Puffer (für ‚whole genome amplifications‘) bzw. PBS oder Medium (für Kultivierungen) vorgelegt war. Die Anzahl an Partikeln, die in ein ‚well‘ sortiert wurden, konnte dabei frei gewählt werden und betrug je nach Folgeexperiment 1, 2, 5 oder

10 Zellen. Zur Überprüfung der Sortier-Effizienz wurden im Rahmen des ersten Versuchs zusätzlich *E. coli*-Zellen in PBS und LB-Medium sortiert. Zur Bestimmung, ob FACS-sortierte Bakterien prinzipiell noch lebensfähig sind, wurde das so inokulierte LB-Medium direkt über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Zellzahl pro ‚well‘ wurde der Inhalt der PBS-befüllten ‚wells‘ auf LB-Agar ausplattiert und ebenfalls bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. 96-‚well‘-Platten mit sortierten SAP-Zellen für molekulare Arbeiten wurden bis zur weiteren Verwendung ohne weitere Zusätze bei -80 °C gelagert.

3.6. ‚Whole genome amplification‘ (WGA) von vereinzelt Schwammbakterien

Die Einzel-Genom-Amplifizierung (‚whole genome amplification‘; WGA) von FACS-vereinzelt Schwammbakterien umfasste die folgenden Schritte: i) Einzel-Zell-Lyse, ii) die WGA mittels phi29-Polymerase vermittelter ‚multiple displacement amplification (MDA)‘, sowie iii) die phylogenetische Klassifizierung des WGA-Produkts. Alle Schritte einschließlich der WGA-Reaktion wurden direkt in 96-‚well‘-Platten durchgeführt. Jegliche Kontamination wurde durch die Verwendung von autoklavierten und zusätzlich sterilfiltrierten Lösungen versucht zu vermeiden. Reaktionsansätze wurden zum Durchmischen nur vorsichtig geschwenkt, um die Wahrscheinlichkeit von DNA-Strangbrüchen zu minimieren. Die amplifizierte genomische DNA diente im Anschluss weiteren Anwendungen, z.B. funktionellen ‚screenings‘ mittels PCR (Kapitel 3.6.3.), der Cosmidklonierung (Kapitel 3.7.) oder der 454-Sequenzierung (Kapitel 3.8.1.). In Abbildung 3-3 ist der methodische Ansatz der Einzel-Zell-Genomik von Schwammbakterien schematisch wiedergegeben.

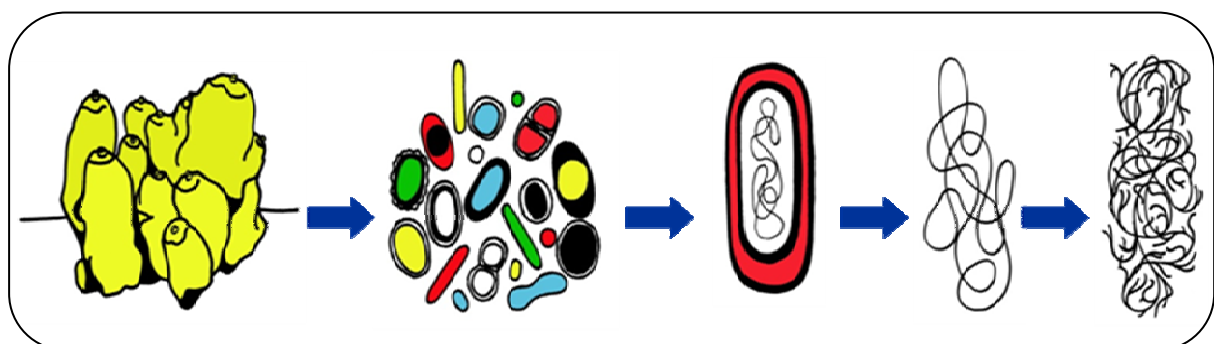


Abb. 3-3: Schematische Darstellung eines Einzel-Zell-Genomik-basierten Ansatzes zur Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Bakterien. Gezeigt sind folgende methodische Schritte: Isolierung des mikrobiellen Konsortiums, Zell-Vereinzelung, Einzel-Zell-Lyse, WGA.

3.6.1. Einzel-Zell-Lyse

Zur Extraktion von genomischer DNA aus FACS-vereinzelten Schwamm Bakterien wurden diese zunächst mit drei Folgezyklen von Einfrieren (-80 °C; 10 min) und Auftauen (70 °C; 10 min) mechanisch aufgeschlossen. Im Anschluss daran folgte ein etabliertes Protokoll mit einigen Änderungen basierend auf alkalischer Lyse (Lasken *et al.* 2005). Dafür wurden dem 10 µl-Einzel-Zell-Ansatz zunächst weitere 3 µl TE-Puffer und dann 3,5 µl frisch angesetzter Denaturierungspuffer (400 mM KOH, 10 mM EDTA) zugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation bei 65 °C erfolgte die Zugabe von 3,5 µl Neutralisationspuffer (800 mM Trizma Hydrochlorid). Der 20 µl Ansatz wurde umgehend für die WGA eingesetzt.

3.6.2. Einzel-Genom-Amplifizierung

Für die Genom-Amplifizierungen von vereinzelten, lysierten Schwamm Bakterien wurde je nach weiterer Anwendung das REPLI-g Mini Kit oder das REPLI-g Midi Kit (beide Qiagen) verwendet. Die ‚kits‘ unterscheiden sich dabei nur durch die Ausbeute an amplifizierter DNA. Typischerweise liefert eine Reaktion bis zu 10 µg (Mini) bzw. 40 µg (Midi) DNA. In beiden Fällen liegt die Produktlänge der amplifizierten DNA („Amplikons“) zwischen 2 kb und 100 kb. Sämtliche WGA-Reaktionen erfolgten mit einigen Abwandlungen nach Angaben des Herstellers. Bei Verwendung des Mini Kits wurde ein Master Mix, bestehend aus 10 µl H₂O_{bidest}, 29 µl REPLI-g Mini Reaction Buffer und 1 µl REPLI-g Mini DNA-Polymerase dem 20 µl Einzel-Zell-Lysat zugegeben. Im Fall des Midi Kits wurde das Reaktionsvolumen auf insgesamt 50 µl reduziert (29 µl REPLI-g Midi Reaction Buffer, 1 µl REPLI-g Midi DNA-Polymerase und 20 µl Einzel-Zell-Lysat). Nach luftdichter Versiegelung der Platten fand die isothermale WGA-Reaktion bei 30 °C für 16 h statt. Abschließend wurde die DNA-Polymerase durch 3 minütiges Erhitzen auf 65 °C deaktiviert, die Ausbeute an amplifizierter DNA spektrophotometrisch gemessen (Kapitel 3.3.3.) und die Platten mit der amplifizierten DNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.6.3. Phylogenetische Klassifizierung und funktionelles ‚screening‘

Zur Identifizierung und phylogenetischen Klassifizierung der FACS-sortierten Zellen wurden PCRs mit rDNA-spezifischen Primern auf die WGA-Produkte durchgeführt. Dabei diente, soweit nicht anders vermerkt 1 µl der amplifizierten genomischen DNA der FACS-sortierten Zellen als ‚template‘. Neben den eubakteriellen 16S rRNA-Gen spezifischen Primern 27f und 1492r (Lane 1991), wurden die Poribakterien 16S rRNA-Gen spezifischen Primer 389f und 1130r (Fieseler *et al.* 2004) verwendet. Um weitergehende Kontaminationen auszuschließen, kamen ferner die Archaeen 16S rRNA-Gen spezifischen Primer Arch21f und Arch958r (DeLong 1992), sowie die Eukaryonten 18S rRNA-Gen spezifischen Primer A und B (Medlin *et al.* 1988) zum Einsatz. ‚Amplikons‘ mit positiven Ergebnissen bei der Archaeen- und Eukaryonten-PCR wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter bearbeitet. Als Kontrolle zur WGA dienten sog. ‚single cell PCRs‘ mit FACS-sortierten, lysierten Zellen ohne WGA als ‚template‘. Hierbei konnten jedoch, wie zu erwarten war, keine PCR-Produkte gewonnen werden.

Eubakterielle sowie poribakterielle PCR-Produkte wurden wie bereits beschrieben aufgereinigt (Kapitel 3.3.4.) und unter Verwendung des Vektors pGEM-T Easy (Promega) kloniert (Kapitel 3.3.6.). Kolonie-PCR-Produkte mit den Primern SP6 und T7 dienten sogleich RFLP-Analysen, um Anzahl und Diversität ursprünglich in ein ‚well‘ sortierter Zellen abzuschätzen. Letztendlich wurden die klonierten PCR-Produkte ausgewählter Klone für eine phylogenetische Einordnung sequenziert.

Die ‚Amplikons‘ aus den WGA-Reaktionen dienten anschließend verschiedenen ‚screening‘-PCRs unter Verwendung von Primerpaaren zum Nachweis von funktionellen Genen. Dabei kamen in erster Linie Primerpaare zum Einsatz, mit deren Hilfe sich Gene des bakteriellen Sekundärmetabolismus nachweisen lassen. So wurden u.a. die Primer KSDPQQF / KSHGTGR (Fieseler *et al.* 2007) und A3 / A7R (Ayuso-Sacido und Genilloud 2005) verwendet, mit denen sich Ketosynthase- (KS-) Domänen von Polyketidsynthase- (PKS-) Genen bzw. Adenylierungs- (A-) Domänen von nicht-ribosomalen Peptidsynthetase- (NRPS) Genen nachweisen lassen. Im Rahmen einer von mir betreuten Diplomarbeit kam zudem eine Reihe von Primern zum tragen, mit deren Hilfe Gene des bakteriellen Stickstoffmetabolismus in WGA-Produkten vereinzelter Schwambakterien detektiert wurden (Stangel 2008).

3.7. Cosmidklonierung eines WGA-Produkts

(*Poribacteria* 16S rDNA-, *Chloroflexi* 16S rDNA-, PKS-, NRPS-positiv)

Das PCR-,screening‘ von WGA-Produkten führte zur Identifizierung eines ‚wells‘, dessen ‚Amplikon‘ von nur zwei Schwamm-assoziierten Bakterien stammte. Neben einem poribakteriellen und einem *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen konnten zudem ein PKS- sowie ein NRPS-Gen nachgewiesen werden. Dieses ‚Amplikon‘ diente als ‚template‘ für die Klonierung in Cosmide. Dadurch sollte der genomische Kontext dieser ribosomalen und funktionellen Gene identifiziert, sequenziert und charakterisiert werden. Vor der Cosmidklonierung wurde das ‚Amplikon‘ von ‚well‘ A4 zunächst mit Hilfe eines ‚low melt‘-Agarosegels (Kapitel 3.3.2.) auf die richtige Größe hin untersucht. Optimal für Cosmidklonierungen ist dabei die Verwendung von ‚template‘-DNA mit einer durchschnittlichen Größe von 40 kb.

3.7.1. Enzymatische Vorbehandlung

Da sich WGA-Produkte in einigen wesentlichen Punkten, z.B. durch ihre hypervverzweigte Struktur, von natürlicher, hochmolekularer DNA unterscheiden, waren einige enzymatische Behandlungen sowie Aufreinigungen vor der eigentlichen Cosmidklonierung nötig. Im Wesentlichen wurden dabei die Vorgaben von Zhang und Kollegen (2006) befolgt. Dadurch sollte zum Einen die Klonierungseffizienz erhöht, zum Anderen die Chimärenrate deutlich reduziert werden.

Zunächst wurden 10 µl des unter Verwendung des REPLI-g Mini Kits erhaltenen WGA-Produkts erneut amplifiziert, um die für eine Cosmidklonierung benötigte DNA-Ausbeute zu erhöhen. Diese Reamplifizierung erfolgte gemäß des bereits in Kapitel 3.6.2. beschriebenen Protokolls. Das reamplifizierte WGA-Produkt wurde anschließend unter Verwendung von Microcon YM-100 Säulchen (Millipore) aufgereinigt, um Hexanukleotidprimer und Nukleotide zu entfernen. Dafür wurden die ‚Amplikons‘ zunächst für 12 min bei Raumtemperatur und 500 x g abzentrifugiert (Heraeus Biofuge pico), die Säule kopfüber in ein neues Reaktionsgefäß transferiert und der Säulenüberstand (ca. 10 µl) zentrifugiert (3 min; RT; 1000 x g).

Es folgte ein als ‚debranching‘ bezeichneter Schritt, bei dem die hypervverzweigte Struktur des WGA-Produkts durch die DNA-Strang-verdrängende Eigenschaft der phi29-Polymerase

aufgelöst werden sollte. Dies wurde durch eine erneute WGA erreicht, allerdings ohne den Zusatz von Hexanukleotidprimern. Der ‚debranching‘-Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 1 µl REPLI-g Mini DNA-Polymerase, 5 µl dNTPs (= 1 mM; 10 mM Stocklösung; Sigma), sowie 5 µl 10 x phi29 DNA Polymerase Buffer (New England Biolabs). Nach Zugabe des aufgereinigten Konzentrats wurde der Ansatz mit H₂O_{bidest} auf 50 µl Endvolumen aufgefüllt. Das ‚debranching‘ fand bei 30 °C für 2 h statt, wonach die Reaktion schließlich bei 65 °C für 3 min terminiert wurde.

Im Anschluss daran wurde ein S1-Nuklease-Verdau durchgeführt. Während dieser, als ‚junction breaking‘ bezeichneten Reaktion werden die Verzweigungen des ‚Amplikons‘ weiter reduziert und die entstandenen 3‘-Einzelstrang-Überhänge entfernt. Das WGA-Produkt ist nun doppelsträngig und weist bereits ‚blunt ends‘ auf, besitzt jedoch noch Lücken („nicks“) an den ursprünglichen Verzweigungspunkten. Für den Verdau wurden dem 50 µl ‚debranching‘-Ansatz 0,5 µl S1-Nuklease (= 1 U / µl; USB) sowie 200 µl S1-Nuklease-Puffer (30 mM NaAc pH 4,5; 50 mM NaCl; 1 mM ZnCl₂) zugegeben. Die Reaktion fand bei 37 °C für 30 min statt. Anschließend wurde der Ansatz über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt, wofür dem Ansatz 30 µl Phenol zugefügt und nach Inversion 10 min bei 9.000 rpm zentrifugiert (Heraeus Biofuge 13) wurde. Der Überstand wurde mit 30 µl Chloroform versetzt, erneut zentrifugiert (10 min, 9.000 rpm) und 0,1 Vol. NaAc sowie 2,5 Vol. 100 % eiskaltes EtOH dem Überstand zugegeben. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 9.000 rpm) wurde das Pellet mit 70 % EtOH gewaschen, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und schließlich in 20 µl H₂O_{bidest} aufgenommen.

In einer letzten, als ‚polishing and nick translation‘ bezeichneten enzymatischen Behandlung sollten die noch vorhandenen Lücken („nicks“) innerhalb der doppelsträngigen DNA aufgefüllt und die Synthese von glatten Enden („blunt ends“) vervollständigt werden („polishing“). Der 50 µl-Ansatz bestand dabei aus folgenden Komponenten: die 20 µl aufgereinigte DNA, 1 µl T4 DNA Polymerase (= 3 U; New England Biolabs), 1 µl DNA Polymerase I (= 10 U; New England Biolabs), 2,5 µl dNTPs (= 0,5 mM; Sigma), 5 µl 10 x Puffer 2 (New England Biolabs), sowie 20,5 µl H₂O_{bidest}. Die Reaktion wurde für 1 h bei 25 °C durchgeführt und die Enzyme im Anschluss daran hitzedeaktiviert (10 min, 75 °C). Es folgte eine weitere Aufreinigung mittels Phenol-Chloroform-Extraktion wobei allerdings nur jeweils 10 µl Phenol und Chloroform verwendet wurden. In Abbildung 3-4 sind die wichtigsten Schritte der enzymatischen Behandlung von WGA-Produkten zusammengefasst.

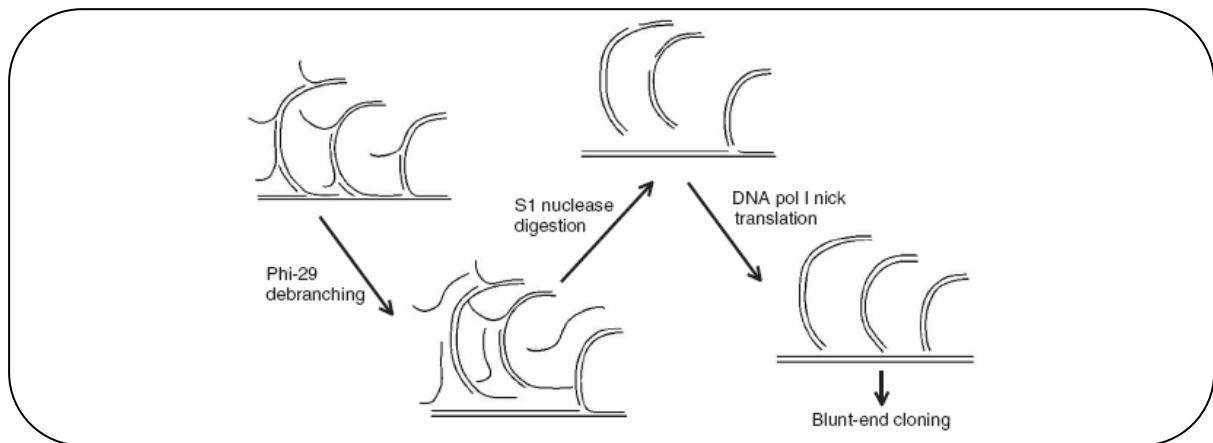


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der wichtigsten enzymatischen Behandlungen von WGA-Produkten zur Erhöhung der Klonierungseffizienz sowie zur Reduzierung der Chimärenrate. Quelle: Zhang *et al.* 2006.

3.7.2. Klonierung in pWEB

Die Klonierung der enzymatisch behandelten und aufgereinigten WGA-Produkte erfolgte über das ‚pWEB Cosmid Cloning Kit‘ (Epicentre). Dabei wurden im Wesentlichen die Angaben des Herstellers befolgt. Da der Vektor bereits im dephosphorylierten Zustand geliefert wird, war eine Behandlung der Insert-DNA mit Calf Intestinal Phosphatase (CIP) nicht nötig. Zur weiteren Erhöhung der Klonierungseffizienz wurde vor der Ligation eine von Epicentre angeratene ‚end-repair‘-Reaktion der Insert DNA durchgeführt. Der 80 µl-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 8 µl 10 x End-Repair-Puffer, 8 µl 2,5 mM dNTP Mix, 8 µl 10 mM ATP, 42 µl H₂O_{bidest.}, 10 µl Insert-DNA, sowie 4 µl End-Repair-Enzym Mix. Die Reaktion fand für 45 min bei Raumtemperatur statt, gefolgt von einer anschließenden Hitzedeaktivierung der Enzyme für 10 min bei 70 °C. Auf die DNA-Konzentrationsmessung (Kapitel 3.3.3.) folgte dann die eigentliche Ligation. Dafür wurde folgender 20 µl-Ansatz unter Verwendung von Epicentre-Reagenzien erstellt: 2 µl 10 x Fast-Link Ligation Buffer, 1 µl 10 mM ATP, 1 µl pWEB Vektor, 1 µl Fast-Link DNA Ligase und 15 µl der Insert-DNA. Zusätzlich wurde eine Ligation von Kontroll-DNA in pWEB nach Angaben des Herstellers angesetzt. Beide Ligationsansätze wurden für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert und die Ligase im Anschluss deaktiviert (10 min bei 70 °C).

3.7.3. Verpackung in T1-Phagen

Für die Verpackung der ligierten Cosmide in T1-Phagen (*in vitro* packaging) diente ein halbes Aliquot des ‚MaxPlax Lambda Packaging Extracts‘ (Epicentre). 10 µl des Ligationsansatzes wurden hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Nach 90 minütiger Inkubation bei 30 °C erfolgte die Zugabe der andere Hälfte des ‚Packaging Extracts‘ bei 30 °C. Nach einer weiteren 90 minütigen Inkubation bei 30 °C erfolgte die Zugabe von 500 µl ‚phage dilution buffer‘ (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 100 mM NaCl; 10 mM MgCl₂) wonach der Ansatz leicht gevortext und mit 25 µl Chloroform überschichtet wurde. Die so in Phagen verpackten Cosmide konnten nach erneutem Vortexen bei 4 °C gelagert werden.

3.7.4. Transfektion von *Escherichia coli* EPI100-T1^R

Für die Infektion mit in Phagen verpackten Cosmiden wurde der *Escherichia coli* Stamm EPI100-T1^R (Epicentre) verwendet. Dazu wurden am Vortag der Transfektion 5 ml LB-Medium (inkl. 10 mM MgSO₄) mit 10 µl des *E. coli* Glycerinstocks angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Danach wurden weitere 50 ml LB-Medium (inkl. 10 mM MgSO₄) mit 100 µl der Übernachtskultur inokuliert und die Kultur bei 37 °C bis zu einer OD_{600nm} von 0,8-1,0 wachsen gelassen. Die Verwendung der Zellen für die Infektion erfolgte bei einer Lagerung von 4 °C innerhalb der nächsten 72 h. Dazu wurden jeweils 10 µl der verpackten Cosmide zu 100 µl der *E. coli*-Kultur pipettiert und für 20 min bei 37 °C geschüttelt. Die transfizierten Zellen wurden auf LB_{amp}-Agar ausplattiert und für min. 24 h bei 37 °C bebrütet.

3.7.5. Archivierung der Cosmidbank

Insgesamt wurden 50 LB_{amp}-Agarplatten mit transfizierten *E. coli* EPI100-T1^R-Zellen ausplattiert. Die Übertragung der Klone auf, mit einem ‚384 pin replicator‘ (Nunc) vorgestempelte, LB_{amp}-Agarplatten erfolgte mit sterilen Zahnstochern. Nach Inkubation im Brutschrank bei 37 °C über Nacht wurden dann die 384 Klone einer Agarplatte mit dem Replikator in jeweils zwei 384-,well‘-Mikrotiterplatten mit je 60 µl LB_{amp}-Flüssigmedium (inkl. 15 % Glycerin) gestempelt. Nach erneuter Bebrütung bei 37 °C für 12 h wurde die

abgelegte Cosmidbank in zweifacher Kopie bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in separaten Gefrierschränken gelagert. Alle Klone einer 384-,well'-Platte werden im Folgenden als ‚pool‘ bezeichnet.

3.7.6. Endsequenzierung von Cosmidklonen

Um sowohl die Sequenzdiversität innerhalb der Cosmidbank abzuschätzen, als auch die Sequenzqualität von Cosmid-klonierten WGA-Produkten zu bewerten, wurden 96 zufällig ausgewählte Cosmide von beiden Seiten terminal ansequenziert. Die Firma ‚Services in Molecular Biology‘ (Berlin) führte dabei die Cosmidpräparation, die Cosmidamplifizierung zur Erhöhung der Ausbeute an ‚low copy‘ Vektoren sowie die Sequenzierung mit Vektor-spezifischen Primern durch. Die Teilsequenzen wurden schließlich mittels BLASTn und BLASTx ausgewertet und aufgrund ihrer besten Datenbanktreffer klassifiziert.

3.7.7. Cosmid-Mini-Präparation

Für die Isolierung von Cosmiden zur weitergehenden Analytik (z.B. RFLP, Sequenzierung) wurde das ‚QIAprep Miniprep Kit‘ (Qiagen) verwendet, wobei im Wesentlichen das vom Hersteller angegebene Protokoll sowie die Anmerkungen zur Aufreinigung von ‚low-copy‘ Plasmiden und Cosmiden befolgt wurden. Für die Cosmid-Mini-Präparation dienten 8 ml einer Übernachtskultur des jeweiligen Klons. Daher wurden jeweils doppelte Mengen an Puffern P1, P2 und N3 verwendet. Als Alternative zum Qiagen-Kit diente das ‚EasyPrep Pro-Kit‘ der Firma Biozym nach Angaben des Herstellers. Die Lagerung von Cosmiden erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.7.8. ‚Screening‘ der Cosmidbank auf 16S rRNA- und funktionelle Gene

In der Cosmidbank sollten mittels PCR einzelne Klone identifiziert werden, deren Cosmide 16S rRNA-Gene sowie funktionelle Gene kodieren. Für den Nachweis ribosomaler Gene wurden zum Einen die Poribakterien 16S rDNA-spezifischen Primer 389f und 1130r verwendet, zum Anderen kamen spezifische 16S rDNA Primer zum Einsatz, die mit Hilfe des Programms ‚Primer3‘ konzipiert wurden. Grundlage hierfür waren die 16S rRNA-Gensequenzen, die mittels PCR, Klonierung und Sequenzierung im nicht-klonierten WGA-

Produkt identifiziert wurden. Universelle bakterielle 16S rDNA Primer eignen sich aufgrund des *E. coli*-Hintergrunds nicht zum ‚screening‘ nach ribosomalen Genen.

Zur Identifizierung von Einzelklonen wurden zunächst die einzelnen, 384 ‚wells‘ umfassenden ‚pools‘ der Cosmidbank einem PCR-‚screening‘ unterzogen. Zur Isolierung von Cosmid-‚pool‘-DNA wurden die ‚pools‘ zunächst auf Agar ausgestempelt und nach Inkubation 10 ml TE-Puffer hinzu pipettiert. Mit Hilfe eines Drigalski-Spatels wurden die Kolonien vorsichtig in Lösung gebracht, die Zellsuspension anschließend pelletiert (8.000 rpm; 10 min; Heraeus Biofuge pico) und das Pellet in 500 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Cosmid-‚pool‘-Extraktion erfolgte, wie bereits beschrieben, mit dem ‚QIAprep Miniprep Kit‘ (Qiagen) (Kapitel 3.7.7.). Allerdings wurde aufgrund der hohen Biomasse nach dem Puffer N3-Zentrifugationsschritt das Präzipitat entfernt und der Überstand erneut zentrifugiert. Die so gewonnene Cosmid-‚pool‘-DNA diente dann dem PCR-‚screening‘. Bei positiven Ergebnissen folgte eine Unterteilung des entsprechenden ‚pools‘ in sog. ‚subpools‘, welche aus 16 Klonen bestanden. Diese wurden mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze von der Agarplatte abgeschabt, in 100 µl H₂O_{bidest} aufgenommen und die Suspension abschließend für 30 min bei 100 °C aufgekocht, pelletiert und eine ‚Lysat-PCR‘ auf den Überstand durchgeführt. Zur Klon-Identifizierung innerhalb eines PCR-positiven ‚subpools‘ dienten letztlich noch 16 ‚Kolonie-PCRs‘.

3.7.9. Komplett-Sequenzierung ausgewählter Cosmidklone

Vor der Komplett-Sequenzierung ausgewählter Cosmidklone (Klon 1i19 [*Chloroflexi* 16S rRNA Gen]; Klon 1k6 [PKS-Gen]; Klon 1n22 [NRPS-Gen]) wurden diese einem Restriktionsverdau unterzogen, um die Insertgröße zu bestimmen. Dies erfolgte mit den Restriktionsenzymen *EcoRI*, *NotI* und *BamHI* in getrennten Ansätzen. 20 ‚units‘ (U) eines jeden Enzyms (New England Biolabs) wurden unter Verwendung der jeweiligen Puffer eingesetzt, um 20 µl Cosmid-Mini-Präparation in 25 µl Reaktionsansätzen bei 37 °C über Nacht zu verdauen. Alternativ dazu kamen die ‚Fast Digest Restriction Enzymes‘ (Fermentas) nach Herstellerangaben zum Einsatz. Zur Fragmentauftrennung wurden 0,5 %ige Agarosegele verwendet. Zusätzlich diente die terminale Endsequenzierung der Cosmid-Inserts mit den beiden pWEB-spezifischen Primern M13 und T7 der Überprüfung, ob Gene oder Gencluster vollständig auf dem Insert vorhanden oder unterbrochen waren.

Die Firma Agowa GmbH (Berlin) führte die Konstruktion von Shotgun-Banken zur Komplettssequenzierung der ausgewählten Cosmidklone, sowie die Assemblierung („assembly“) der daraus resultierenden Einzelsequenzen („reads“) durch.

3.7.10. Sequenzannotation und Sequenzanalyse

Aufgrund von Sequenzduplikationen konnten für zwei der drei ausgewählten Klone keine durchgängigen Insertsequenzen, sondern mehrere nicht-überlappende Fragmente („contigs“) durch die Assemblierung der Rohdaten erhalten werden. Durch eine Kombination aus Sequenzannotation und Identifizierung der Sequenzwiederholungen („repeats“) mit Hilfe des Online-Tools „Repeat Finder using Blast“ (<http://www.proweb.org/proweb/Tools/selfblast.html>) wurden diese, von der phi29-Polymerase verursachten Sequenz-Artefakte schließlich manuell entfernt, um durchgängige Insertsequenzen zu erhalten.

Die Annotation Protein-kodierender Regionen („open reading frames“; ORFs) der Cosmidklone erfolgte unter Anwendung des Programmpakets „Vector NTI Advance 10“ (Invitrogen). Die Ergebnisse wurden durch Verwendung des Online-Tools „ORF Finder“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/>), sowie des Programms „Artemis 10“ (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>) verifiziert. Die Identifizierung von rRNA-Genen erfolgte mit Hilfe des „RNAmmer 1.2 Servers“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/>), tRNA-Gene wurden mit dem Online-Tool „tRNAscan-SE 1.21“ (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) identifiziert und charakterisiert. Für die Analyse von Sequenzhomologien zu Datenbankeinträgen diente das „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLASTn, BLASTx, BLASTp) (Altschul *et al.* 1997). Die Berechnung des durchschnittlichen GC-Gehalts erfolgte über den „GC Calculator“ (http://www.genomicsplace.com/gc_calc.html). Zur möglichen phylogenetischen Klassifizierung der Cosmidsequenzen wurden sowohl das Online-Tool „PhyloPythia“ (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/phylopythia.html>), als auch die Software „TETRA 1.0b2 for Windows“ (<http://www.megx.net/tetra/>) unter Verwendung von Tetranukleotid-Frequenz-Analysen verwendet. Transmembrandomänen wurden über den „DAS“-Transmembrane Prediction server“ (<http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/>) und den „TMHMM Server v. 2.0“ (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) identifiziert. Signalpeptide wurden mit Hilfe des „SignalP 3.0 Servers“ (<http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) ermittelt, und die Ergebnisse mit dem Tool „SIG-

Pred: Signal Peptide Prediction‘ (http://bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html) verifiziert.

Für die Sequenzanalyse von PKS- und NRPS-Genen kamen folgende Online-Tools zum Einsatz: ‚NRPS-PKS‘ (<http://www.nii.res.in/nrps-pks.html>) sowie die ‚PKS/NRPS Analysis Web-site‘ (<http://www.tigr.org/jravel/nrps/>) zur Analyse der Domänenorganisation von PKS- und NRPS-Systemen, sowie ‚ASMPKS‘ (<http://gate.smallsoft.co.kr:8008/~hstae/asmpps/index.html>) zur PKS-Analyse und ‚NRSPredictor‘ (<http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred>) zur Substratvorhersage von Adenylierungsdomänen bei NRPS-Systemen.

Die im Rahmen dieser Doktorarbeit charakterisierten Cosmidsequenzen wurden unter folgenden ‚Accession‘-Nummern bei den Datenbanken GenBank / EMBL / DDBJ abgelegt: FJ560485 (Klon 1i19 [*Chloroflexi* 16S rRNA-Gen]), FJ560486 (Klon 1k6 [PKS-Gen]) und FJ560487 (Klon 1n22 [NRPS-Gen]).

3.8. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms

Für eine direkte Sequenzierung mittels 454-Technologie wurde das amplifizierte Genom eines FACS-vereinzelteten Poribakteriums ausgewählt. FACS-Vereinzelung von Schwammbakterien, Zell-Lyse, sowie WGA-Reaktion mit dem REPLI-g Midi Kit (Qiagen) wurden wie bereits beschrieben (Kapitel 3.6.) durchgeführt. Verschiedene rRNA-basierende PCRs sollten der Verifizierung eines einzelnen amplifizierten Genoms (‚single amplified genome‘; SAG) ohne weitere DNA-Kontamination dienen.

3.8.1. 454-Sequenzierung

Das WGA-Produkt eines vereinzelteten Mitglieds des Candidatus Phylums *Poribacteria* wurde zunächst einem S1-Nukleaseverdau unterzogen. Dabei wurde, wie bereits in Kapitel 3.7.1. beschrieben vorgegangen, allerdings wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl 0,5 M EDTA und 10 minütiges Erhitzen bei 70 °C terminiert. Nach sorgfältigem Vortexen des Reaktionsansatzes wurde dieser mit dem ‚QIAamp DNA Mini Kit‘ (Qiagen) aufgereinigt. Dabei wurde das vom Hersteller angegebene Protokoll leicht abgewandelt. Zunächst wurden

200 µl Puffer AL dem 200 µl Ansatz zugegeben und gut gevortext. Nach Zugabe von 200 µl 100 % EtOH wurde der Ansatz wiederum gut gemischt, auf eine Säule transferiert und zentrifugiert (1 min, 8.000 rpm, RT, Heraeus Biofuge pico). Das Säulchen wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben, mit 500 µl Puffer AW1 gewaschen (1 min, 8.000 rpm) und erneut in ein neues Reaktionsgefäß transferiert. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW2 wurde für 3 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und dieser Trocknungsschritt in einem neuen Cap für 1 min bei 14.000 rpm wiederholt. Anschließend wurde die DNA nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit 200 µl Puffer AE in ein neues Reaktionsgefäß eluiert (1 min, 8.000 rpm). Abschließend fand ein zweiter Eluierungsschritt mit weiteren 200 µl Puffer AE statt. Im Anschluss daran wurden die DNA-Konzentrationen der beiden Eluate spektrophotometrisch gemessen (siehe Kapitel 3.3.3.) und die Eluate erneut mittels PCR auf das Vorhandensein ribosomaler Gene überprüft.

Für die 454-Sequenzierung wurden die beiden Eluate mit insgesamt 23,5 µg DNA eines Poribakterien-SAGs vereint und an die Firma Agowa GmbH (Berlin) übergeben, wo weitere Probenvorbereitungen (z.B. Scherung, Ligation an Adaptoren), Qualitätskontrollen (z.B. Titrationslauf), sowie die Pyrosequenzierung an einem ‚Genome Sequencer FLX‘ (Roche) stattfanden. Dabei wurde eine Pikotiterplatte mit ca. 400.000 Läufen und durchschnittlichen Leseweiten von ca. 240 Basen pro Lauf verwendet, was einer theoretischen Gesamtsequenz von ca. 100 Mb entspricht. Die Firma Agowa GmbH führte ebenfalls die automatische Assemblierung der Sequenzdaten durch. Die Daten wurden abschließend statistisch ausgewertet und die Daten im FASTA-Format unter Angabe der Sequenzier-Abdeckung (‚coverage‘) übermittelt. Die Assemblierung resultierte in der Erstellung zweier Datensätze: während ‚454AllContigs‘ alle ‚contig‘-Sequenzen mit einer Größe von > 100 bp enthält, wurden für den Datensatz ‚454LargeContigs‘ nur ‚contigs‘ berücksichtigt, die eine Länge von > 500 bp aufwiesen.

3.8.2. Automatische Sequenzannotation

Die assemblierten ‚contigs‘ der 454-Sequenzierung eines poribakteriellen SAGs wurden an die Firma Ribocon GmbH (Bremen) zur automatischen Annotation übermittelt. Die bioinformatische Prozessierung dieser Daten beinhaltete folgende Komponenten: automatische ORF Vorhersage, automatische Annotation der ORFs (basierend auf Vorhersagen zur Proteinähnlichkeit mittels paarweisen- und profilbasierenden

Suchalgorithmen, sowie Signalpeptid- und Transmembranprotein-Vorhersagen), manuelle Überprüfung der Ergebnisse auf Plausibilität und Erstellung von Genomstatistiken. Dabei wurde der ursprüngliche Datensatz assemblierter ‚contigs‘ weiter aufgeteilt. Während der Datensatz ‚POR_large‘ bzw. ‚POR_CDS‘ alle DNA-Fragmente mit mindestens einer kompletten kodierenden Region (ORFs, tRNAs, rRNAs) enthält, finden sich im Datensatz ‚POR_small‘ bzw. ‚POR_contigs‘ alle anderen, meist sehr kurzen, Fragmente. Diese wurden in alle sechs Leserahmen übersetzt und Fragmente ohne signifikante Treffer gegen öffentliche Datenbanken gelöscht.

3.8.3. Sequenzauswertung mittels ‚JCoast‘

Die vollständig annotierten und prozessierten Daten beider Datenbanken wurden von der Firma Ribocon GmbH mit dem Java-basierten Software-Tool ‚JCoast‘ (www.megx.net/jcoast; Richter *et al.* 2008) verknüpft und anschließend für weitergehende Analysen bereitgestellt. Das Programm beinhaltet u.a. eine grafische Darstellung der ‚contigs‘, sowie diverse Statistiken und Suchfunktionen. ‚JCoast‘ ist mit verschiedenen bioinformatischen Tools verknüpft, so u.a. mit BLAST (Altschul *et al.* 1997), Pfam (Bateman *et al.* 2004), Interpro (Mulder *et al.* 2005), SignalP (Bendtsen *et al.* 2004) und TMHMM (Krogh *et al.* 2001). Unter Verwendung der verschiedenen Funktionen wurden die automatisch annotierten Daten gegebenenfalls manuell nachannotiert, sowie ORFs näher charakterisiert und Stoffwechselwege rekonstruiert. Ferner diente die Software dazu, sog. ‚Gruppen-spezifische Gene‘ zu identifizieren und die genomische Organisation von Genclustern mit Sequenzähnlichkeiten zu anderen Bakterien zu vergleichen. Zusammenfassend wurde mit Hilfe von ‚JCoast‘ das genomische Repertoire eines Vertreters der *Poribacteria* erfasst und interpretiert.

4. Ergebnisse

4.1. Kultivierung mittels ‚dilution-to-extinction‘

Die erstmalige Anwendung der ‚dilution-to-extinction‘-Kultivierungsstrategie im Gebiet der Schwamm-Mikrobiologie sollte in erster Linie dazu dienen, einen Vertreter des Candidatus Phylums *Poribacteria* für weiterführende Studien in Reinkultur zu gewinnen. Im Rahmen des ersten Kultivierungsexperiments an der Oregon State University im Juni 2005 konnte mikrobielles Wachstum in fünf von insgesamt 1.536 untersuchten Wells (= 0,3 %) nachgewiesen werden. Sowohl RFLP-Analyse als auch Ansequenzierung der PCR-Produkte mit dem Primer 27f belegten, dass es sich hierbei um zwei verschiedene Isolate innerhalb der Alpha-Proteobakterien handelt. Die Ergebnisse der phylogenetischen Klassifizierung sind in Tabelle 4-1 zusammengefasst.

Tabelle 4-1: Phylogenie der Alpha-proteobakteriellen Isolate, die im Rahmen des ersten Kultivierungsansatzes gewonnen wurden. ‚+‘: Medium mit Bakterienlysate; ‚-‘: Medium ohne Bakterienlysate. Alle gewonnenen Isolate stammen aus ‚wells‘, die mit 15 Zellen inokuliert wurden.

Isolate	Medium / Inokulation	Bester BLASTn Treffer	Identität in %
1C7, 3D4	+ / 15	Marines Bakterium NJ1-1-1 (Wirt: marine Alge <i>L. catenata</i>)	98
9B1, 10A4, 11D7	± / 15	<i>Pseudovibrio</i> sp. MKT94 (isoliert aus marinen Tieren)	99

Der beste BLASTn Treffer der Isolate 1C7 und 3D4 ist das aus einer marinen Alge stammende Bakterium NJ1-1-1, allerdings bestehen ebenfalls große Homologien innerhalb des 16S rRNA Gens (98 % Identität) zum Alpha-Proteobakterium MBIC1876 (AB026194), welches bereits aus einem marinen Schwamm isoliert wurde. Der beste BLASTn Treffer der Isolate 9B1, 10A4 und 11D7 ist ebenfalls mit marinen Tieren assoziiert. Interessanterweise sind diese drei Isolate ebenfalls nahe verwandt mit *Pseudovibrio* sp. JE062 (98 % Identität), welches bereits aus verschiedenen Schwammarten kultiviert werden konnte (Scheuermayer *et al.* 2006 b). Zusätzlich wurde die vertikale Weitergabe dieses Bakteriums im Schwamm *Mycale laxissima* gezeigt (Enticknap *et al.* 2006). Eine Genomsequenzierung dieses Stamms wird derzeit durchgeführt (NZ_ABXL00000000).

Die mikroskopische Auswertung der 48-,well‘-Platten des zweiten Kultivierungsexperiments, welches im September 2005 am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg durchgeführt wurde, führte zum Nachweis von mikrobiellem Wachstum in 41 von insgesamt 2.304 untersuchten Wells (= 1,8 %). Grund für die gesteigerte Kultivierungseffizienz im Vergleich zum ersten Experiment (= 0,3 %) könnte die Verwendung von frischem Schwamm-Material anstelle von Kryo-SAPs sein. Aufgrund von RFLP-Analysen konnten sechs Mischkulturen identifiziert werden. Phylogenetische Klassifizierungen der übrigen 35 Reinkulturen erlaubten eine Zuordnung zu den bakteriellen Phyla *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (α -, β -, γ -) und *Verrucomicrobia* (Abb. 4-1). Die meisten Isolate waren dabei den α - *Proteobacteria* (57 %) und den *Bacteroidetes* (28 %) zugehörig. Ferner konnte in allen Fällen eine hohe 16S-rDNA-Sequenzhomologie (> 95 %) zu bereits kultivierten Bakterien unterschiedlichster Herkunft gezeigt werden, wobei marine Vertreter klar dominierten (77 % inklusive Isolaten aus marinen Schwämmen und Korallen). Das den *Verrucomicrobia* zugehörige Isolat besaß große 16S rDNA-Sequenzhomologien mit *Rubritalea marina* str. Pol012 (DQ302104; 99 % Identität), das ebenfalls aus einem marinen Schwamm isoliert wurde (Scheuermayer *et al.* 2006 a).

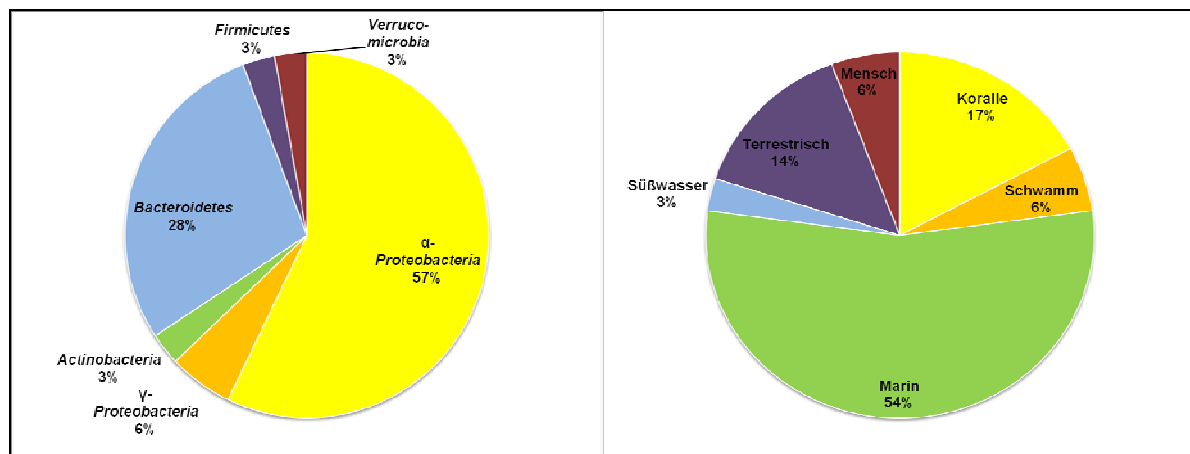


Abb. 4-1: Phylogenetische Zugehörigkeit der im Rahmen des zweiten Kultivierungsprojekts gewonnenen 35 Reinkulturen (links), sowie der Ursprung des besten BLASTn-Treffers (rechts).

Im Rahmen eines weiteren ‚screenings‘ des zweiten Kultivierungsansatzes nach 9-10 monatiger Inkubation konnten sechs zusätzliche ‚wells‘ mit mikrobiellem Wachstum identifiziert werden. Allerdings legte die RFLP-Analyse der klonierten 16S rDNA-PCR-Produkte nahe, dass es sich hierbei nicht um Reinkulturen handelte. In einem Fall bestand die Mischkultur aus mindestens zwei Vertretern der *Proteobacteria* sowie einem Vertreter des Phylums *Thermus / Deinococcus*. Interessanterweise wies letzterer 16S rDNA-

Sequenzhomologien zu einem Klon aus dem Schwamm *Discodermia dissoluta* auf (AY897093; 97 % Identität). Keines der in Mischkultur vorliegenden Isolate konnte jedoch in Reinkultur angezogen werden. Ebenfalls gelang es nicht, die Ausbeute an mikrobieller Biomasse durch ein ‚upscaling‘ der Mischkulturen zu erhöhen, um diese zumindest nachfolgenden molekularbiologischen Untersuchungen zugänglich zu machen. Aus diesen Gründen wurden weiterführende Experimente mit diesen Mischkulturen nicht verfolgt.

Darüberhinaus konnten im Rahmen des zweiten Kultivierungsexperiments zwölf Isolate des eubakteriellen Phylums *Bacteroidetes* in Reinkultur gewonnen werden. Die Ergebnisse der BLASTn-Analyse sowie die verwendeten Medien sind in Tabelle 4-2 dargestellt. Interessanterweise scheinen sowohl Inokulumart (SAPs oder Gesamtschwamm-Extrakt) und Inokulumgröße (10 oder 100 Zellen), aber auch Medienzusammensetzung keinen Einfluss auf die Kultivierung dieser *Bacteroidetes*-Kladen gehabt zu haben. Alle Isolate konnten auf Festmedium transferiert werden und zeigten auf Zobell-Agar bei 30 °C starkes Wachstum innerhalb von 24 h. Keines der zwölf Isolate konnte jedoch in LB-Medium angezogen werden, was einen obligat marinen Charakter dieser *Bacteroidetes*-Isolate vermuten lässt. Die 16S rDNA-Sequenzen aller zwölf *Bacteroidetes*-Isolate wurden negativ auf das Vorhandensein von Chimären getestet. Ferner ergab die Erstellung einer Ähnlichkeitsmatrix (‚similarity matrix‘) 16S rDNA-Homologien von 78,6 – 100 % der Isolate untereinander. Zwar sind alle besten BLASTn-Treffer marinen Ursprungs, allerdings konnte für keines der zwölf Isolate ein Schwamm-spezifischer Bezug festgestellt werden (Abbildung 4-2). Alle gewonnenen Isolate weisen 16S rDNA-Sequenzhomologien von > 95 % zu bereits kultivierten Arten auf. Der zu Isolat 16c8-16 am nächsten verwandte Datenbankeintrag bei Durchführung des Experiments war *Microscilla furvescens* str. IFO 15994 mit nur 92 % Sequenzidentität. Mittlerweile wurden jedoch nahe verwandte, aus Meerwasser gewonnene Isolate den Sequenzdatenbanken zugefügt. Abbildung 4-2 zeigt Morphologie und Phylogenie dieses stäbchenförmigen Bakteriums.

Zusammenfassend konnten die phylogenetischen Analysen zeigen, dass es auch trotz der Anwendung einer neuen Kultivierungsstrategie im Rahmen dieser Dissertation nicht gelang, einen Vertreter des Schwamm-spezifischen Candidatus Phylums *Poribacteria* zu kultivieren. Auf weiterführende Charakterisierungen von Isolaten wurde verzichtet, da entweder kein Schwamm-spezifischer Bezug festgestellt werden konnte oder es sich um Stämme bzw. Varianten bereits beschriebener Arten handelte.

Tabelle 4-2: Phylogenetische Analyse der *Bacteroidetes*-Isolate aus dem zweiten Kultivierungsprojekt, für das frisches Schwammmaterial verwendet wurde. Für die Inokulation dienten 10 bzw. 100 Zellen aus Fraktionen an ‚sponge associated prokaryotes‘ (SAPs) bzw. Gesamtschwamm-Homogenisat („Gesamt“). Das Experiment wurde im September 2005 am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg durchgeführt. Stand der BLASTn-Analyse: März 2009. Medienzusammensetzung siehe Anhang (Kapitel 8.3.).

Isolat	Medium / Inokulation	Bester BLASTn Treffer [* erster kultivierter Vertreter]	Identität
16c8-16	#4 / SAPs 100	nichtkultivierter <i>Microscilla</i> sp. Klon BME34 DQ917821 (Quelle: gebleichte Koralle) [* Flexibacteraceae Bakterium MOLA 398 AM990675 (Quelle: Meerwasser)]	1406/1439 (97%) 1338/1348 (99%)
20a2-18	#5 / SAPs 100	Flexibacteraceae Bakterium MOLA 398 AM990675 (Quelle: Meerwasser)	1258/1305 (96%)
20b4-21	#5 / SAPs 100	Flexibacteraceae Bakterium MOLA 398 AM990675 (Quelle: Meerwasser)	1289/1298 (99%)
37f2-38	#10 / Gesamt 10	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1248/1296 (96%)
39b6-39	#10 / SAPs 10	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1255/1303 (96%)
40a6-41	#10 / SAPs 100	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1358/1409 (96%)
41a1-43	#11 / Gesamt 10	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1291/1338 (96%)
41e4-44	#11 / Gesamt 10	Flexibacteraceae Bakterium MOLA 398 AM990675 (Quelle: Meerwasser)	989/1017 (97%)
45a8-47f	#12 / Gesamt 10	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1325/1374 (96%)
45a8-47g	#12 / Gesamt 10	<i>Flagellimonas eckloniae</i> str. DOKDO 007 DQ191180 (Quelle: marine Alge)	1368/1424 (96%)
45a8-47r	#12 / Gesamt 10	Bacteroidetes Bakterium MOLA 103 AM990877 (Quelle: Meerwasser)	1355/1367 (99%)
45e7-48	#12 / Gesamt 10	<i>Microscilla furvescens</i> str. IFO 15994 AB078079 (Quelle: Meerwasser)	1290/1335 (96%)

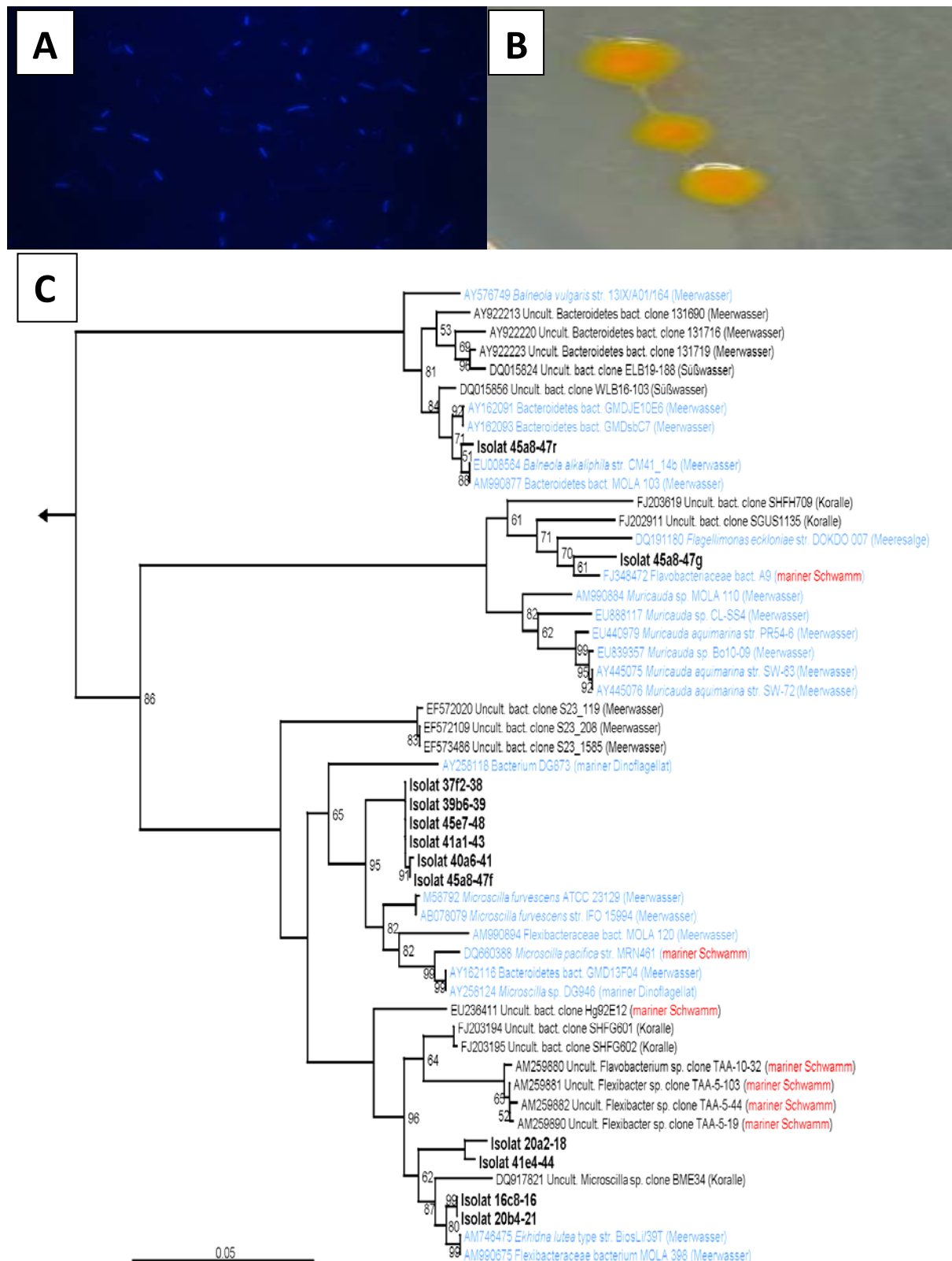


Abb. 4-2: Morphologie und Phylogenie der *Bacteroidetes*-Isolate, die im Rahmen des zweiten Kultivierungsexperiments in Reinkultur gewonnen wurden. A: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme des DAPI-gefärbten Isolats 16c8-16. B: Kolonimorphologie von Isolat 16c8-16 auf Zobell-Agar. C: Phylogenetischer Stammbaum des bakteriellen Phylums *Bacteroidetes* basierend auf der Distanzanalyse von 16S rRNA-Genen (1.092 bp Alignment Länge). Nur ‚bootstrap‘-Werte über 50 sind angegeben. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe. Isolate, die im Rahmen dieser Studie gewonnen wurden, sind fett dargestellt, Datenbankeinträge kultivierter Vertreter sind blau und aus marinen Schwämmen stammende Sequenzen rot markiert. Die Skalierung markiert 5 % Sequenzdivergenz.

4.2. Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS

Als Grundlage für kultivierungs-unabhängige, Einzel-Zell-basierte Studien an Schwammsymbionten sollten zunächst Vertreter des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* mittels Durchflusszytometrie (FACS) analysiert und vereinzelt werden.

Abbildung 4-3 zeigt vergleichend die FACS-Analyse verschiedener Schwammfraktionen, um diese auf Zusammensetzung und Reinheit zu untersuchen. Anhand des FSC/SSC-Plots in Abbildung 4-3 zeigt sich deutlich, dass die Schwammzellen-Fraktion, welche bei der SAP-Herstellung anfällt, im Vergleich zu den anderen Fraktionen die meisten großen Partikel („gate“ P1) enthält. Hierbei handelt es sich mit größter Wahrscheinlichkeit um die Schwammzellen selbst sowie um größere Zellaggregate. In beiden SAP-Fraktionen, sowohl aus dem Kernbereich des Schwamms, als auch aus der Außenschicht des Schwamms (Cortex) konnten diese fast vollständig durch differentielle Zentrifugation entfernt werden. Zusätzlich belegt die vergleichende FACS-Studie, dass sowohl die Schwammzellfraktion, als auch die SAP-Fraktion des Kerns nur sehr wenige autofluoreszente Partikel mit einem Extinktionsmaximum bei 585 nm enthalten („gate“ P4). Bei der SAP-Fraktion aus der Außenschicht macht diese Population jedoch 57 % der Gesamtpartikel aus und zeigt ferner auch Autofluoreszenzen der Wellenlängen 660 und 670 nm. Hierbei handelt es sich vermutlich um Cyanobakterien, die in erster Linie die lichtexponierten Außenbereiche des Schwammgewebes besiedeln, was durch die FACS-Analyse bestätigt wurde. Zusammenfassend belegen die Ergebnisse der vergleichenden FACS-Analyse, dass die SAPs des Kernbereichs fast vollständig von Schwammzellen und anderen großen Partikeln abgetrennt werden konnten und das mikrobielle Konsortium des Mesohyls aus dem Schwamm *Aplysina aerophoba* annähernd frei von phototrophen Cyanobakterien ist.

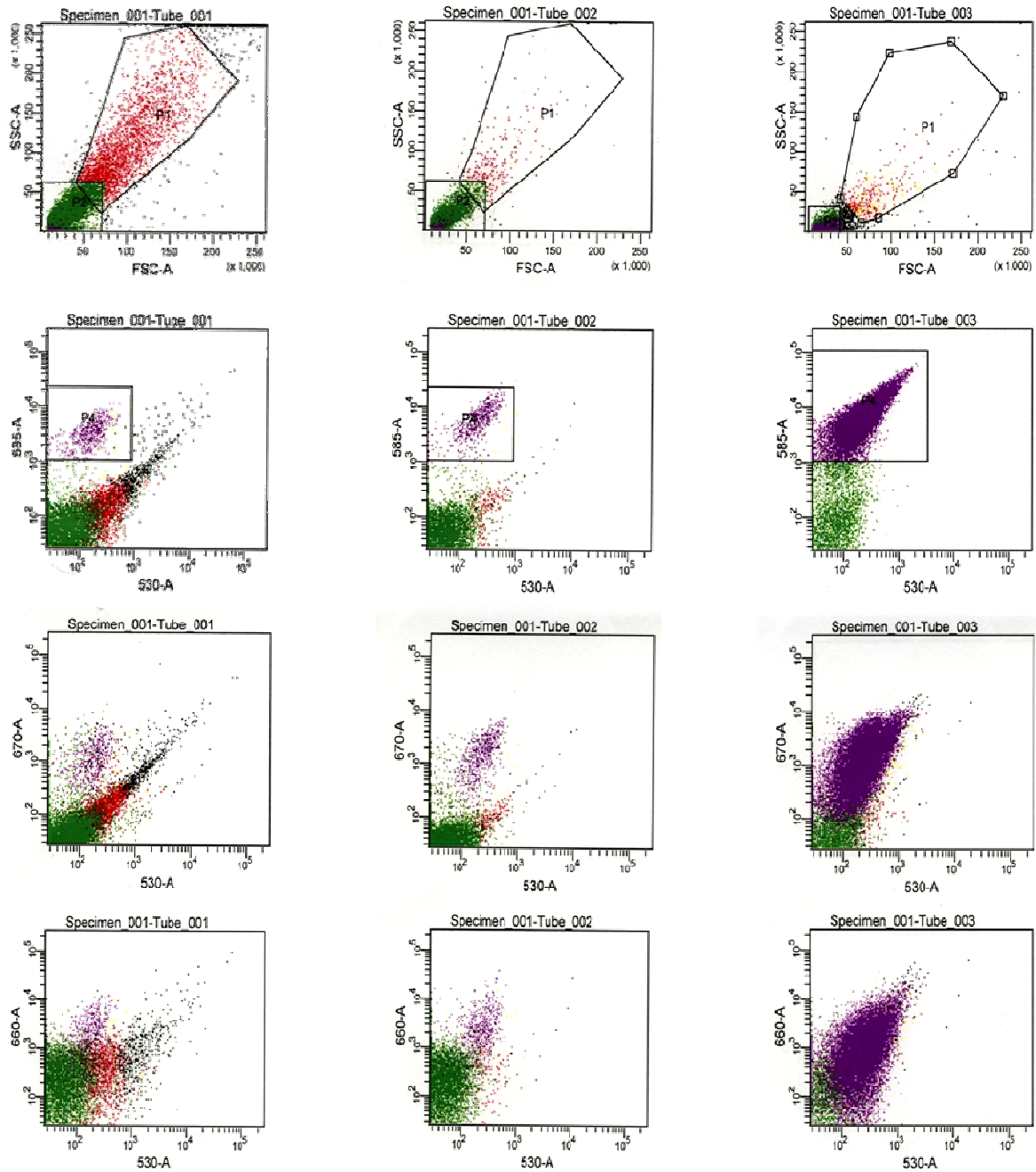


Abb. 4-3: FACS-Analyse von Schwammzellen (linke Spalte; Tube_001), SAPs aus dem Kernbereich (mittlere Spalte; Tube_002) und SAPs aus der Außenschicht (rechte Spalte; Tube_003). Dargestellt sind neben forward (FSC) und sideways scatter (SSC) die Plots verschiedener Autofluoreszenzen (der Wellenlängen 530, 585, 660 und 680 nm). Umrandet sind die ‚gates‘ der Schwammzellen (P1) sowie der autofluoreszenten Partikel (P4; Extinktionsmaximum 585 nm).

Für alle weiterführenden Zell-Sortierungen wurden ausschließlich SAP-Fraktionen des Kernbereichs verwendet, da Poribakterien als Mitglieder des Schwamm-spezifischen Konsortiums bereits über FISH-Studien im Schwamm-Mesohyl von *A. aerophoba* lokalisiert wurden (Fieseler *et al.* 2004). Im Rahmen eines ersten Versuchs wurden dafür tiefgefrorene

SAPs verwendet. Abbildung 4-4 zeigt die Ergebnisse dieser FACS-Analyse einer SAP-Fraktion und einer *Escherichia coli*-Zellsuspension als Kontrolle. Die aus diesem Experiment sortierten Zellen dienen ‚whole genome amplifications‘ (WGAs) und letztlich der Konstruktion einer Cosmidbank. Für die 454-Sequenzierung eines poribakteriellen WGA-Produkts wurden frisch isolierte SAPs aus *A. aerophoba* ohne Kryolagerung als Ausgangsprodukt für die Zellsortierung verwendet. Sowohl FSC/SSC-Plot, als auch die Autofluoreszenzen zeigten hierbei keinerlei Unterschiede zu den Kryo-SAPs des ersten Versuchs.

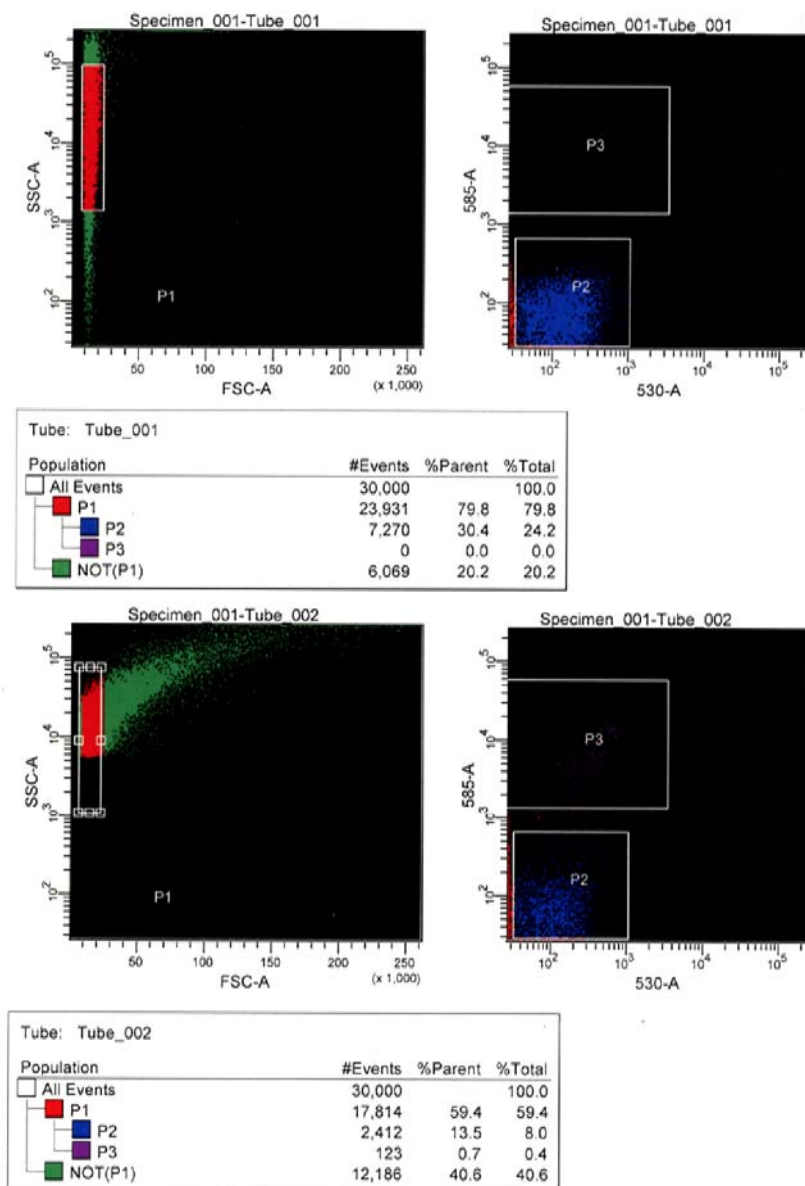


Abb. 4-4: FACS-Analyse von *E. coli*-Zellen (Tube_001) und SAPs (Tube_002). Dargestellt sind neben einem Plot aus forward (FSC) und sideways scatter (SSC) auch die Autofluoreszenzen bei 530 nm und 580 nm, sowie die mengenmäßige Verteilung der jeweiligen Populationen. ‚Gate‘ P1 repräsentiert die Subpopulation, die für die Zellsortierung gewählt wurde, ‚gate‘ P3 die autofluoreszente SAPs-Subpopulation.

Die FACS-Analyse der *E. coli*-Zellen zeigte, dass die gesamte Population eine relativ einheitliche Zellgröße (FSC) aufweist, wohingegen die Granularität (SSC) eine gewisse Variabilität besitzt. Die gesamte Zellpopulation wies keine Autofluoreszenz der Wellenlängen 530 nm und 585 nm auf. Die Hauptpopulation der SAP-Fraktion hingegen besaß im Vergleich zu *E. coli* eine geringere Heterogenität in der Granularität, allerdings waren die Zellen bezüglich ihrer Größe variabler. Vermutlich sind dafür Reste von Schwammzellen und Zellaggregaten in der SAP-Fraktion verantwortlich. Ein geringer Anteil der Partikel (0,4 % der Gesamtpopulation) zeigte zudem Autofluoreszenz der Wellenlänge 585 nm („gate“ P3). Für die Zellsortierung wurde zunächst innerhalb der *E. coli*-Population ein „gate“ gelegt, das ca. 80 % der Zellen beinhaltet („gate“ P1). Dieses „gate“ wurde dann exakt für die Sortierung der SAP-Partikel übernommen. Somit sollte gewährleistet werden, dass nur SAP-Partikel sortiert werden, die nicht größer als *E. coli* sind. Rund 60 % aller SAP-Partikel wiesen diese Eigenschaft auf.

Von der *E. coli*-Suspension wurden jeweils eine oder zehn Zellen direkt in „wells“ mit LB-Medium sortiert. Nach Inkubation bei 37 °C wiesen alle „wells“ Trübungen des Mediums auf. Somit konnte gezeigt werden, dass *E. coli* nach der FACS-Sortierung noch teilungsfähig ist. Zur Effizienzbestimmung der FACS-Sortierung wurden zudem eine bzw. zehn *E. coli*-Zellen zunächst in „wells“ mit 10 µl PBS sortiert, dann auf LB-Agar ausplattiert und nach Bebrüten die Koloniezahl bestimmt. Die Auszählung zeigte jeweils durchschnittlich dreimal mehr Kolonien als erwartet. Ursache hierfür könnten ebenfalls Zellaggregate sowie Zellteilungen zwischen Sortierung und Ausplattieren sein. Die Sortierung von SAP-Zellen in „wells“ mit Zobell-Medium führte hingegen zu keinerlei Trübung. Auch konnten keine Kolonien durch das Ausplattieren von FACS-sortierten SAPs gewonnen werden. Diese Ergebnisse bestätigen wiederum die Tatsache, dass der Großteil des Schwamm-assoziierten Konsortiums unter Verwendung von Standard-Nährmedien nichtkultivierbar ist.

Die FACS-Studie des Schwamm-assoziierten Konsortiums offenbart das große Potential dieser Technik für die beschreibende Analyse der Zusammensetzung hochkomplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften. Gleichzeitig konnte dadurch eine Grundlage für Einzelzell-basierte Experimente geschaffen werden.

4.3. Erstellung einer Cosmidbank mit WGA-Produkten von Schwammbakterien

(*Poribacteria* 16S rDNA-, *Chloroflexi* 16S rDNA-, PKS-, NRPS-positiv)

4.3.1. ‚Whole genome amplifications‘ (WGAs)

Für die ‚whole genome amplification‘ (WGA) mit dem REPLI-g Mini Kit (Qiagen) dienten 20 ‚wells‘ mit FACS-vereinzelt und lysierten Zellen einer Kryo-SAPs-Fraktion. Zur Kontrolle wurden WGAs auf 5 ‚wells‘ mit vereinzelt Zellen des *Escherichia coli*-Stamms DH5 α durchgeführt. Zusätzlich wurden zur Kontrolle je zwölf ‚single cell PCR‘ mit FACS-vereinzelt und lysierten, aber nicht Gesamt-Genom-amplifizierten *E. coli*-Zellen bzw. SAPs durchgeführt. Für keine der hierbei untersuchten 24 Proben konnte ein 16S rDNA-PCR-Produkt nachgewiesen werden. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der PCRs mit WGA-Produkten als ‚template‘. So konnte mit dem universellen eubakteriellen Primerpaar 27f/1492r bei 18 von 20 (90 %) SAPs-WGA-Produkten ein PCR-Produkt gewonnen werden (Abb. 4-5). Ebenso war die universelle 16S rDNA-PCR bei vier von fünf (80 %) *E. coli*-WGA-Produkten positiv. Zusätzlich konnte mit den Poribakterien-16S-rDNA-spezifischen Primern 389f und 1130r bei fünf von 20 (25 %) SAPs-WGA-Produkten ein PCR-Produkt der richtigen Größe gewonnen werden (Abb. 4-5).

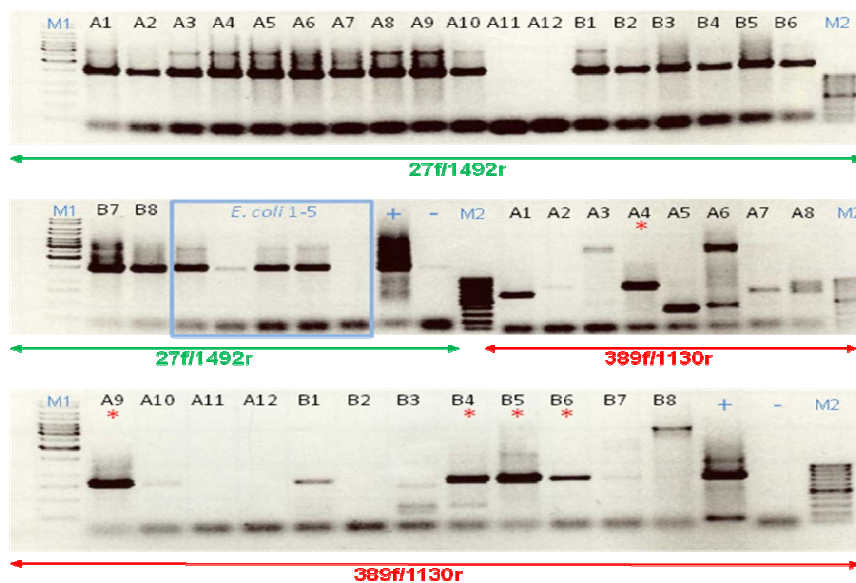


Abb. 4-5: Ergebnisse der universellen 16S rDNA- (27f/1492r), sowie der Poribakterien 16S rDNA-spezifischen (389f/1130r) PCR mit WGA Produkten als ‚template‘. Die Nummerierung entspricht der Nummerierung von ‚wells‘ mit amplifizierter genomischer DNA. M1: 1kb DNA Ladder (Fermentas). M2: 100bp DNA Ladder (Fermentas). Mit Stern gekennzeichnete Proben markieren poribakterielle 16S rDNA PCR-Produkte der richtigen Größe. ‚+‘: Positivkontrolle (SAPs-DNA) ‚-‘: Negativkontrolle (kein ‚template‘).

Direkte Sequenzierungen der jeweiligen PCR-Produkte mit dem Primer 389f bestätigten diese Ergebnisse. Alle Sequenzen besaßen hohe 16S rDNA-Sequenzhomologien (95-98 %) zum nicht-kultivierten *Poribacteria* Klon 64K2 (AY713479). Da Poribakterien nicht mit den universellen 16S rDNA-Primern 27f / 1492r nachweisbar sind, wird anhand Abbildung 4-5 erkenntlich, dass alle fünf poribakteriellen WGA-Produkte noch mindestens ein zusätzliches, eubakterielles amplifiziertes Genom beinhalten müssen. Die direkte Sequenzierung des 16S rDNA-PCR-Produkts einer *E. coli*-WGA mit dem Primer 27f offenbarte eine 100%ige Sequenzübereinstimmung mit *E. coli*-Datenbankeinträgen, was die hohe Zuverlässigkeit der phi29-Polymerase deutlich macht.

4.3.2. Phylogenetische Klassifizierung der Ausgangs-DNA

Da das Hauptaugenmerk dieser Doktorarbeit auf den Poribakterien lag, wurden zur phylogenetischen Klassifizierung von WGA-Produkten nur Poribakterien-positive Proben ausgewählt („wells“ A4, A9, B4, B5, B6). Klonierung und RFLP-Analysen beider PCR-Produkte (Poribakterien-spezifisch und 16S-universell) zeigten bereits, dass die „wells“ A9, B5 und B6 jeweils mindestens drei verschiedene OTUs („operational taxonomic units“) enthielten. Diese Proben wurden daher nicht weiter bearbeitet. Ferner offenbarte die Sequenzierung des 16S rDNA PCR-Produkts, dass „well“ B4 genomische DNA eines α -Proteobakteriums nicht-marinen Ursprungs enthält. Daher wurde auch diese Probe nicht weiter bearbeitet.

Die RFLP-Analyse für „well“ A4 führte zur Identifizierung von drei OTUs bei der universellen 16S rDNA-PCR (38 Klone) und vier OTUs bei der Poribakterien-spezifischen PCR (45 Klone) (Abb. 4-6). Die Ergebnisse des Doppelverdau mit *MspI* / *HaeIII* wurden dabei durch die Verwendung des Enzympaars *DpnII* / *HhaI* bestätigt. Allerdings zeigte die Sequenzierung ausgewählter Klone (Abb. 4-6), dass Klon 36 ein chimäres Insert trägt. Die beiden Klone 4 und 10 wiesen zwar unterschiedliche Bandenmuster auf, tragen aber dennoch das gleiche Insert. Ferner besaßen alle vier Poribakterien 16S rRNA-Gen tragenden Klone denselben besten Datenbanktreffer (98 % Identität zum *Poribacteria* Klon 64K2). Prinzipiell können sich multiple intragenomische Kopien des 16S rRNA-Gens eines Organismus voneinander unterscheiden (Case *et al.* 2007). Der PCR-Nachweis von eukaryontischer 18S rDNA und archaealer 16S rDNA verlief für WGA-A4 negativ. Zusammengenommen belegen

diese Ergebnisse, dass ‚well‘ A4 die amplifizierte genomische DNA von nur zwei Mikroorganismen, und zwar eines Eubakteriums und eines Poribakteriums enthält.

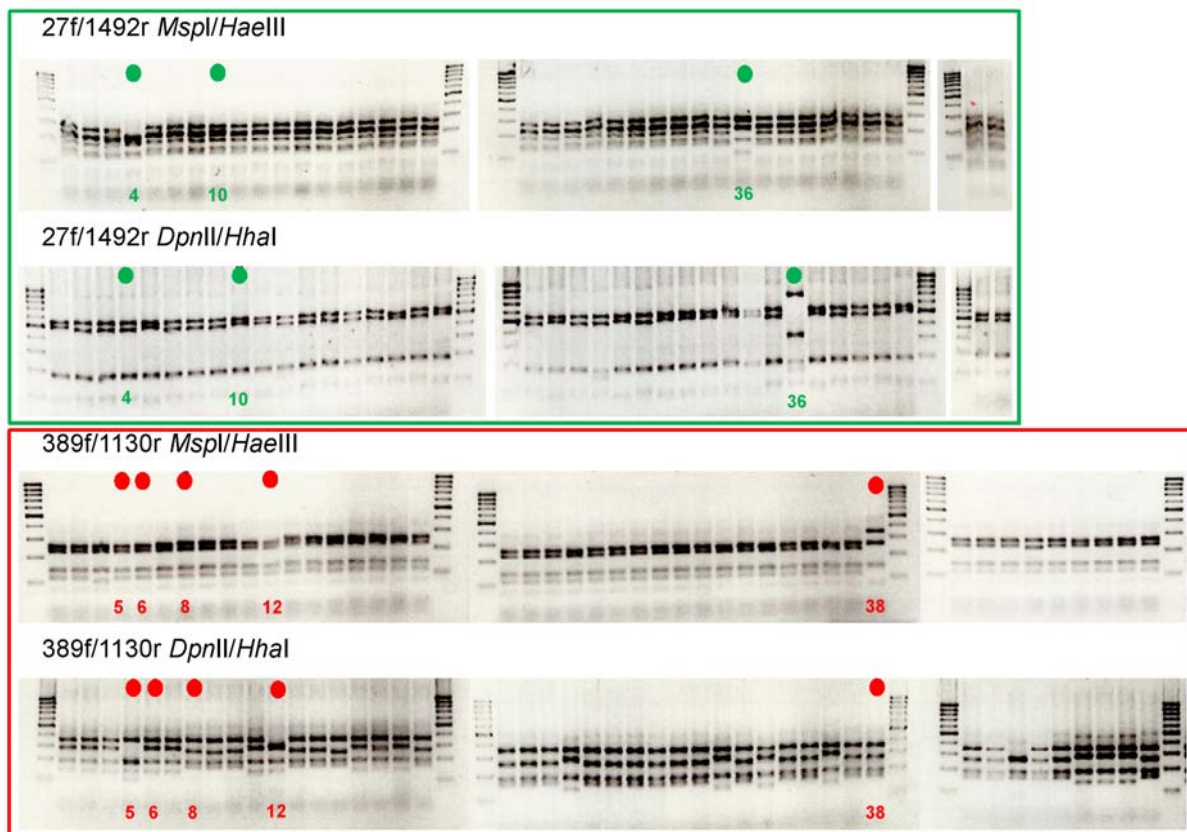


Abb. 4-6: RFLP-Analyse der 16S rDNA-PCR-Produkte von ‚well‘ A4, die mit dem eubakteriellen Primerpaar 27f/1492r (grün) bzw. dem Poribakterien-spezifischen Primerpaar 389f/1130r (rot) erhalten wurden. Gezeigt sind jeweils die Bandenmuster durch den Doppelverdau mit den Enzympaaren *MspI/HaeIII* bzw. *DpnII/HhaI*. Marker: 100bp DNA Ladder (Fermentas). Mit einem Punkt markierte Spuren repräsentieren Klone, die der Sequenzierung dienten.

In Abbildung 4-7 ist das Ergebnis der phylogenetischen Stammbaumberechnung des Poribakteriums aus ‚well‘ A4 dargestellt. Abbildung 4-8 zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen des zusätzlich in ‚well‘ A4 befindlichen Bakteriums, welches als Mitglied des Phylums *Chloroflexi* identifiziert wurde. Die phylogenetische Klassifizierung zeigt die Zugehörigkeit dieses Bakteriums zu einer, aus marinen Schwämmen unterschiedlicher Gattungen (*Agelas dilatata*, *Aplysina aerophoba*, *Ircinia strobilina*) stammenden Sequenz-Klade innerhalb der *Chloroflexi* Klasse Caldilineae. Da diese Klade auch den aus *A. aerophoba* stammenden bakteriellen Klon TK23 (AJ347038) enthält, wird dieses Sequenzcluster im Folgenden als ‚TK23-Klade‘ bezeichnet.

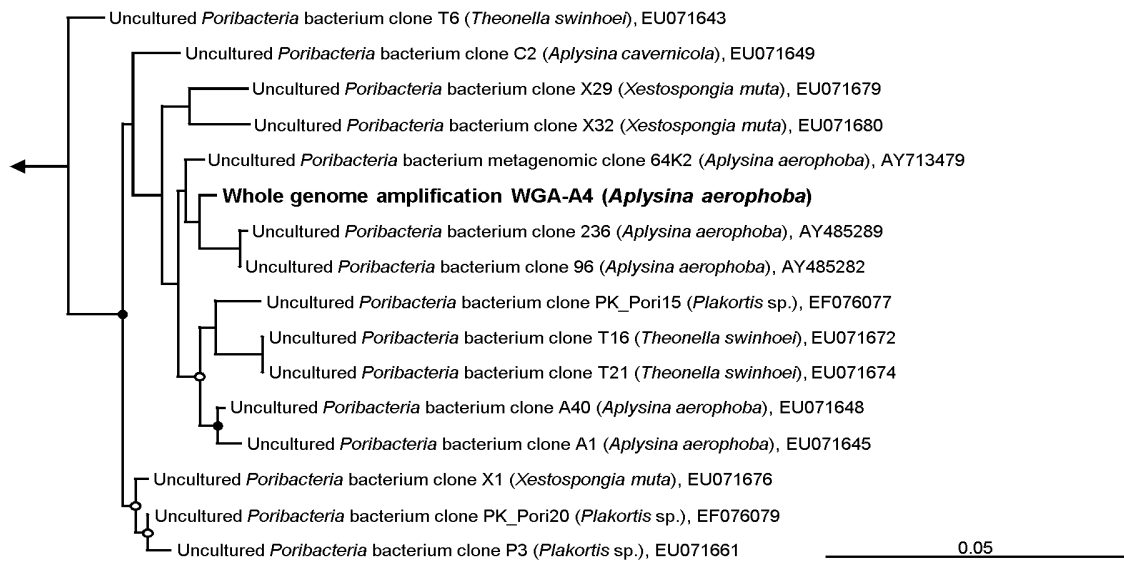


Abb. 4-7: Phylogenetischer Stammbaum („neighbor joining“) basierend auf 16S rRNA-Genen (801 bp Alignment Länge) des bakteriellen, Schwamm-spezifischen Candidatus Phylums *Poribacteria*. Die, von der WGA-A4 abgeleitete Sequenz ist fett dargestellt. Angegeben ist bei Referenzsequenzen neben der ‚accessionnumber‘ auch die Schwammart, aus der die Sequenz stammt. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe (*Escherichia coli*; X80725), mit welcher der Baum gewurzelt wurde. Schwarze Kreise an den Knotenpunkten repräsentieren ‚bootstrap‘-Werte von >90 und weiße Kreise von >75. Die Skalierung markiert 5 % Sequenzdivergenz.

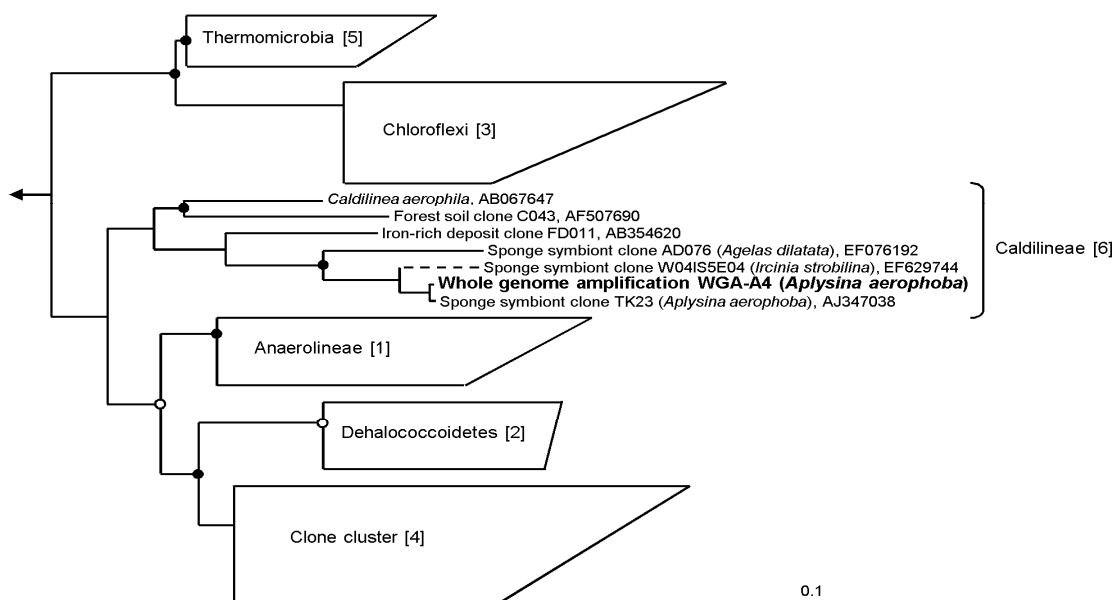


Abb. 4-8: Phylogenetischer Stammbaum („neighbor joining“) basierend auf 16S rRNA-Genen (1.411 bp Alignment Länge) des bakteriellen Phylums *Chloroflexi*. Die, von der WGA-A4 abgeleitete Sequenz ist fett dargestellt. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe (*Escherichia coli*; X80725), mit welcher der Baum gewurzelt wurde. Schwarze Kreise an den Knotenpunkten repräsentieren ‚bootstrap‘-Werte von >90 und weiße Kreise von >75. Die Skalierung markiert 10 % Sequenzdivergenz. Die gestrichelte Linie markiert eine Referenzsequenz, die aufgrund ihrer Länge (915 bp) nachträglich über ARB in den bestehenden Baum eingerechnet wurde. Für Sequenzen, die aus marinen Schwämmen stammten, ist zusätzlich die jeweilige Schwammart angegeben. Die Referenzsequenzen wurden z.T. von Hugenholz und Stackebrandt (2004) übernommen. Klassenbezeichnung sowie deren Nummerierung stammen aus Yamada *et al.* (2006).

4.3.3. Eigenschaften der Cosmidbank WGA-A4

Für die Konstruktion der Cosmidbank WGA-A4 diente amplifizierte genomische DNA eines Poribakteriums und eines *Chloroflexi* aus ‚well‘ A4 als ‚template‘. Das hochmolekulare Produkt der WGA-Reaktion ist in Abbildung 4-9 dargestellt, besaß eine geschätzte Größe von ca. 30-40 kb und war daher für Cosmidklonierungen geeignet.

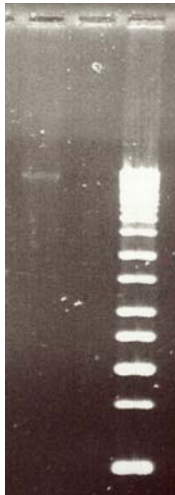


Abb. 4-9: DNA-Gel mit amplifizierter genomischer DNA aus ‚well‘ A4. Deutlich sichtbar ist die Bande mit hochmolekularer DNA in der linken Spur. Marker: GeneRuler DNA Ladder, High Range (Fermentas).

Insgesamt wurden in der Cosmidbank WGA-A4 8.279 Klone in 23 Pools abgelegt. Bei einer geschätzten durchschnittlichen Insertgröße von 35 kb entspräche das einer Archivierung von insgesamt ca. 290 Mb genomischer Information. Unter der Annahme einer gleichmäßigen Amplifizierung über das gesamte Genom sowie dem Ausschluss eines Klonierungs-, ‚bias‘ wäre somit eine fast 30-fache Abdeckung für jedes der beiden Genome gewährleistet. Dieser Berechnung ist eine durchschnittliche bakterielle Genomgröße von 5 Mb zugrunde gelegt.

Die terminale, beidseitige Insertsequenzierung von 96 zufällig ausgewählten Klonen der Cosmidbank WGA-A4 lieferte aufgrund z.T. geringer DNA-Ausbeuten verwertbare Ergebnisse bei 168 von insgesamt 192 Teilsequenzen. In Abbildung 4-10 ist die Auswertung der BLASTx-Analyse dieser Sequenzen zusammengefasst. So konnten 75 % aller Endsequenzen aufgrund ihrer Homologien eindeutig den Eubakterien zugeordnet werden. Die nächsten Datenbankeinträge umfassten dabei Vertreter von insgesamt zwölf bakteriellen Phyla. Allerdings ist bei der Auswertung der terminalen Insertsequenzierung zu berücksichtigen, dass die Sequenzen nicht bereinigt wurden. Aufgrund limitierter Datenbankeinträge der *Poribacteria* war mit Übereinstimmungen der Cosmidendsequenzen zu diesem Candidatus Phylum nicht zu rechnen. Jedoch konnte zumindest ein Teil der besten BLASTx-Treffer den poribakteriellen Schwesterphyla *Verrucomicrobia* und *Planctomycetes*

zugeordnet werden (zusammen 9 % der eubakteriellen Treffer). Ferner waren 17 % der eubakteriellen besten BLASTx-Treffer den *Chloroflexi* zugehörig.

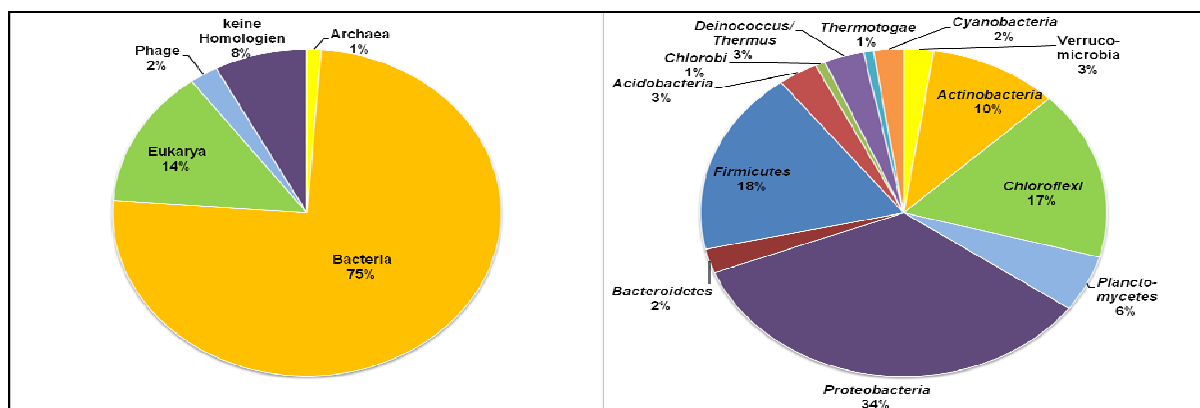


Abb. 4-10: Auswertung der terminalen Insertsequenzierung von 96 Klonen der Cosmidbank WGA-A4. Gezeigt ist die phylogenetische Herkunft der besten BLASTx-Treffer auf Domänenebene (linke Teilabbildung) bzw. auf Phylumebene innerhalb der Eubakterien (rechte Teilabbildung).

Die Cosmidbank WGA-A4 wurde ferner auf das Vorhandensein verschiedener ribosomaler und funktioneller Gene hin untersucht. Aufgrund des *E. coli*-Hintergrunds mussten für das ‚screening‘ nach 16S rRNA-Genen spezifische Primer verwendet werden. Zum Einen wurde dafür das Poribakterien-spezifische Primerpaar 389f/1130r verwendet, zum Anderen aufgrund der im WGA-Produkt nachgewiesenen *Chloroflexi* 16S rRNA-Genesequenz spezifische Primer für diesen Phylotypen konzipiert. Während das ‚screening‘ mit den Poribakterien-spezifischen Primern für alle 23 Pools der Cosmidbank WGA-A4 negativ verlief, konnte bereits innerhalb des Pools #1 ein *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen tragender Klon identifiziert werden (Klon 1i19). Das funktionelle Durchmuster der Bank offenbarte zudem zwei weitere Klone innerhalb des Pools #1: Klon 1k6 kodiert eine Ketosynthase- (KS-) Domäne von Typ I Polyketidsynthase- (PKS-) Genen, während das Insert von Klon 1n22 eine Adenylierungs- (A-) Domäne von nicht-ribosomalen Peptidsynthetase- (NRPS-) Genen trägt. Diese drei Klone wurden im Anschluss einer Komplettssequenzierung unterzogen. In Tabelle 4-3 sind die Ergebnisse des ‚screenings‘ zusammengefasst.

Tabelle 4-3: Identifizierung von Klonen über das PCR- ‚Screening‘ der Cosmidbank WGA-A4.

Klon	Primer	Primerspezifität	Referenz
1i19	TK23for2 / TK23rev2	<i>Chloroflexi</i> WGA-A4 16S rDNA	diese Studie
1k6	KSDPQQF / KSHGTGR	KS-Domäne von Typ I PKS-Genen	Fieseler <i>et al.</i> (2007)
1n22	A3 / A7R	A-Domäne von NRPS-Genen	Ayuso-Sacido und Genilloud (2005)

4.3.4. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1i19 (*Chloroflexi* 16S rRNA Gen)

Die Sequenzierung von Cosmidklon 1i19 führte zum Erhalt von zwei nicht-überlappenden DNA-Fragmenten mit den Größen 20,6 kb und 5,6 kb. Die Sequenzanalyse zeigte jedoch, dass das kürzere Fragment ausschließlich aus invertierten Bereichen des großen Fragments besteht und daher nicht mit diesem aligniert werden konnte. Ferner konnte in dem 20,6 kb großen Fragment ein 5.330 bp großer ‚inverted repeat‘ ausfindig gemacht werden. RFLP-Analysen des Cosmidinserts zeigten außerdem, dass diese Sequenzduplikation noch zwei weitere Male im klonierten Insert vorkommen muss. Mithilfe der Annotation wurde einer der beiden 5,3 kb großen Sequenzbereiche als phi29-Polymerase verursachtes Artefakt identifiziert und manuell aus der Sequenz des 20,6 kb großen Fragments ausgeschnitten.

Das somit rekonstruierte Insert des Cosmidklons 1i19 umfasst einen genomischen Bereich von nunmehr 15,3 kb und weist einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 58 % auf (Abb. 4-11), was konsistent mit dem durchschnittlichen GC-Gehalt von 59,6 % bei Vertretern der *Chloroflexi*-Klasse *Caldilinea* ist (Sekiguchi *et al.* 2003). Neben einem kompletten rRNA-Operon (5S, 16S, 23S) wurden eine tRNA (Ile, Anticodon GAU; Abb. 4-12) sowie sieben Protein-kodierende Gene identifiziert (Abb. 4-11). Neben dem 16S rRNA-Gen selbst besitzen drei offene Leseraster (‚open reading frames‘; ORFs) die höchsten Sequenzähnlichkeiten mit *Chloroflexi* Proteinen (Tabelle 4-4).

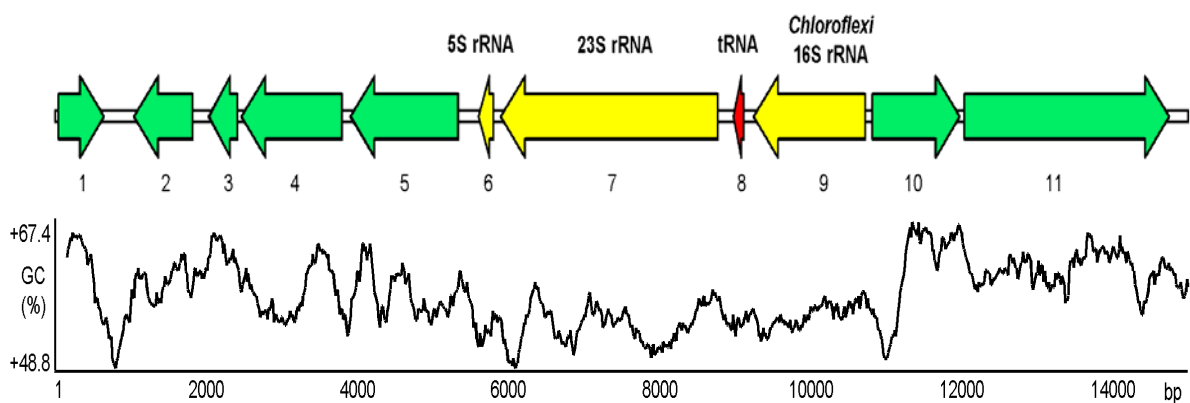


Abb. 4-11: Physikalische Kartierung und Verlauf des GC-Gehalts für Cosmidklon 1i19. Eingezeichnet sind neben den sieben identifizierten ORFs (grün) das *Chloroflexi*-rRNA-Operon (gelb) sowie das tRNA-Gen (rot).



Abb. 4-12: Sekundärstruktur der *in silico* identifizierten tRNA^{Ile} (Anticodon GAU) des Cosmidklons 1i19.

Tabelle 4-4: Allgemeine Eigenschaften des Inserts von Cosmidklon li19 (*Chloroflexi* 16S rRNA Gen) sowie Auflistung aller ORFs, rRNAs sowie der tRNA (Nummerierung analog zu Abb. 4-11). Neben Lokus und Größe des Genprodukts in Aminosäuren (AS) bzw. Nukleotiden (bp) ist das jeweilige Homolog mit höchster Übereinstimmung nach BLAST-Analyse (BLASTp für Proteine; BLASTn für rRNAs und die tRNA) aufgelistet.

Größe	GC-Gehalt	kodierender Bereich	ORFs	rRNAs	tRNA	hypothetische Proteine	konservierte hypothetische Proteine	bekannte Proteine
15 340 bp	58.1%	86.2%	7	3	1	/	2	5

ORF	Lokus	entsp. Größe [AS]	Genprodukt (BLASTp-Analyse)	Organismus / Phylum	Größe [AS]	Identität [%]	E-Wert	Vorhergesagte Funktion / Anmerkungen
1	50-664	205	Aldo/Keto Reduktase, ZP_02011146	Opitutaceae Bakterium TAV2; (Verrucomicrobia)	337	68	7e-76	putative Oxidoreduktase
2	1072-1869	266	konserviertes hypothetisches Protein RRSL_00641, ZP_00946513	<i>Ralstonia solanacearum</i> UW551; (Betaproteobacteria)	751	35	8e-10	Signalpeptid vorhergesagt
3	2086-2469	128	Cytidin Deaminase, NP_622141	<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i> MB4; (Firmicutes)	135	57	3e-30	beteiligt am ‚Pyrimidin Salvage Pathway‘
4	2524-3888	455	CBS-Domäne enthaltendes Protein, ZP_02985519	<i>Chloroflexus</i> sp. Y-400-fl; (Chloroflexi)	447	40	9e-88	Cystathionin beta-Synthase (‚CBS pair‘) Domänen, möglicherweise beteiligt an Transport, 4 Transmembran-Helices und Signalpeptid vorhergesagt
5	4002-5459	486	UDP-N-Acetylglucosamin Pyrophosphorylase, YP_001547247	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i> ATCC 23779; (Chloroflexi)	459	51	6e-122	beteiligt an Biogenese der Zellhülle
6 (rRNA)	5737-5852	116 (bp)	5S rRNA (BLASTn), X_52302	<i>Nannocystis exedens</i> ; (Deltaproteobacteria)	119 (bp)	81	8e-21	5S rRNA

ORF	Lokus	entspr. Größe [AS]	Genprodukt (BLASTp-Analyse)	Organismus / Phylum	Größe [AS]	Identität [%]	E-Wert	Vorhergesagte Funktion / Anmerkungen
7 (rRNA)	6036-8973	2938 (bp)	23S rRNA (BLASTn), BA_000043	<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426; (Firmicutes)	2928 (bp)	76	0.0	23S rRNA
8 (tRNA)	9229-9302	74 (bp)	16S-23S ribosomale RNA ,intergenischer Spacer' (BLASTn), AF_422511	nicht-kultiviertes Bakterium, Klon t1020	546 (bp)	93	9e-23	tRNA-Ile (Isoleucin)
9 (rRNA)	9457-10965	1509 (bp)	16S rRNA (BLASTn), AJ_347038	nicht-kultiviertes Bakterium, Klon TK23	1369 (bp)	98	0.0	16S rRNA
10	11058-12248	397	Peptidase M24, YP_488018	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> HaA2; (Alphaproteobacteria)	399	30	4e-30	Methionin Aminopeptidase
11	12304-15081	926	konserviertes hypothetisches Protein RoseRS_0178, YP_001274564	<i>Roseiflexus</i> sp. RS-1; (Chloroflexi)	972	32	3e-108	putativer ABC- Transporter, Permease Komponente, 11 Transmembran-Helices vorhergesagt

Fortsetzung Tabelle 4-4.

4.3.5. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1n22 (NRPS)

Die Sequenzierung des Cosmidklons 1n22 führte ebenfalls nicht zum Erhalt einer durchgehenden Insertsequenz. Anstatt dessen wurden durch die Assemblierung drei nicht-überlappende DNA-Fragmente mit den Größen 16,4 kb, 11,1 kb und 9,1 kb gewonnen. Die Annotation konnte jedoch hierbei belegen, dass das 9,1 kb große Fragment aus invertierten Bereichen der beiden anderen Fragmente besteht und wurde daher für die Insert-Rekonstruktion nicht verwendet. Die Annotation der beiden verbleibenden Fragmente ist schematisch in Abbildung 4-13 dargestellt.

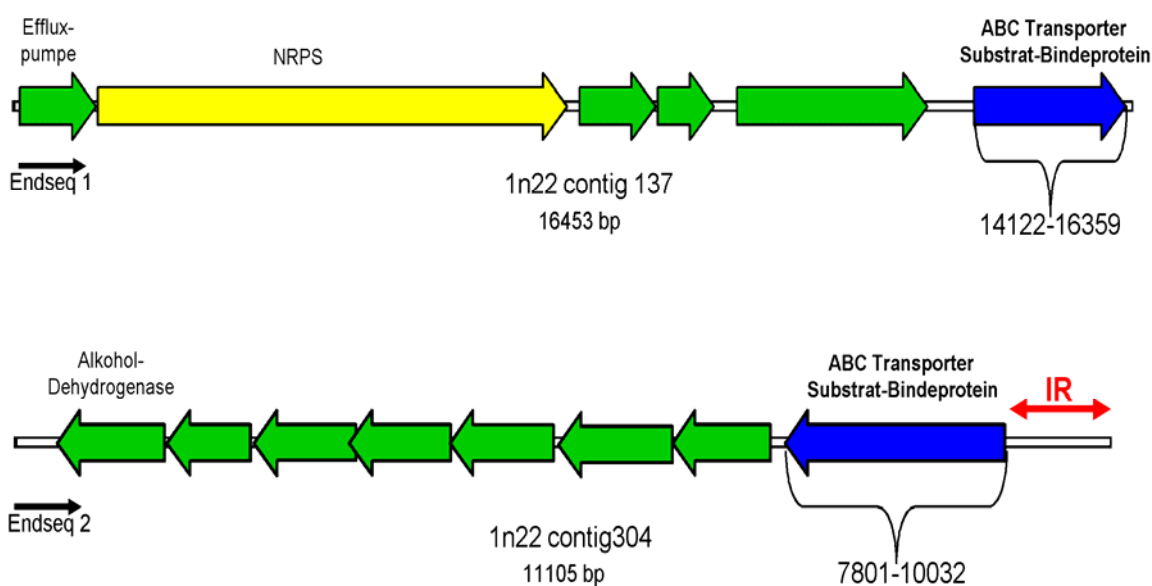


Abb. 4-13: Physikalische Kartierung der ORFs auf den beiden ‚contigs‘ von Klon 1n22. Zusätzlich eingezeichnet ist die Position der beiden Endsequenzen, sowie die Lage des ‚inverted repeats‘ (IR), der aus der Sequenz ausgeschnitten wurde, um ein durchgehendes überlappendes Fragment aus beiden ‚contigs‘ zu erhalten. In blau dargestellt unter Angabe der Position ist ein ORF, der sich auf beiden ‚contigs‘ befindet und den überlappenden Bereich des rekonstruierten Inserts darstellt.

Das Auftreten einer Sequenzwiederholung in ‚contig‘ 304 verhinderte die automatische Assemblierung der beiden ‚contigs‘ 137 und 304. Letztlich konnte durch das manuelle Ausschneiden des ‚repeats‘ in der Sequenz von ‚contig‘ 304 ein überlappendes Fragment aus beiden ‚contigs‘ gewonnen werden. Der daraus resultierende, rekonstruierte genomische Bereich des Cosmidklons 1n22 weist eine Größe von nunmehr rund 24 kb auf und besitzt einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 60 % (Abb. 4-14). Der GC-Gehalt der beiden ORFs 1 und 2 ist dabei etwas höher als beim Rest des DNA-Fragments.

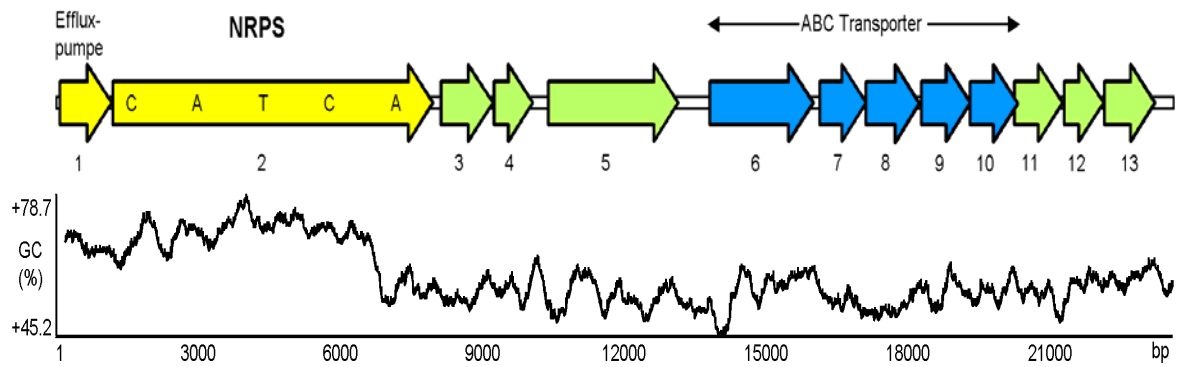


Abb. 4-14: Physikalische Kartierung und Verlauf des GC-Gehalts für das Insert von Cosmidklon 1n22. Eingezeichnet sind neben sechs identifizierten ORFs (grün) das NRPS-Gen sowie die dazugehörige Effluxpumpe (gelb) sowie fünf ABC-Transporter-Komponenten (blau). Abkürzungen der NRPS-Domänen: C: Kondensation; A: Adenylierung; T: Thiolation).

Insgesamt wurden für das Insert von Klon 1n22 13 Protein-kodierende Gene annotiert (Tabelle 4-5). ORF 2 kodiert eine 2.300 Aminosäuren umfassende nichtribosomale Peptidsynthetase (NRPS), welche die einzigartige Domänenstruktur CATCA besitzt (C: Kondensation; A: Adenylierung; T: Thiolation). Die nur 35%ige Identität auf Aminosäureebene zum nächsten Datenbankeintrag (beteiligt an der Synthese von 2,3-Dihydroxybenzoat (DHB) in *Bacillus subtilis*; NP391076) unterstreicht die phylogenetische Eigenständigkeit dieses NRPS-Gens.

Tabelle 4-5: Allgemeine Eigenschaften des Inserts von Cosmidklon In22 (NRPS-Gen) sowie Auflistung aller ORFs (Nummerierung analog zu Abb. 4-14). Neben Lokus und Größe des Genprodukts in Aminosäuren (AS) ist das jeweilige Homolog mit höchster Übereinstimmung nach BLASTp-Analyse aufgelistet.

Größe	GC-Gehalt	kodierender Bereich	ORFs	rRNA	tRNA	hypothetische Proteine	konservierte hypothetische Proteine	bekannte Proteine
24 153 bp	59.7%	92.0%	13	/	/	/	2	11

ORF	Lokus	entspr. Größe [AS]	Genprodukt (BLASTp-Analyse)	Organismus / Phylum	Größe [AS]	Identität [%]	E-Wert	Vorhergesagte Funktion / Anmerkungen
1	78-1196	373	Protein der AcrB/AcrD/AcrF Familie, NP_716574	<i>Shewanella oneidensis</i> MR-1; (Gammaproteobacteria)	1067	50	8e-94	Kationen-/Multidrug ^c Efflux Pumpe, 4 Transmembran-Helices vorhergesagt
2 (NRPS)	1220-8134	2305	beteiligt an Siderophor 2,3-dihydroxybenzoat (DHB) Synthese, NP_391076	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> str. 168; (Firmicutes)	2378	35	0.0	dimodulare nicht-ribosomale Peptid-Synthetase (NRPS), (C A T C A), neuartige A-Domänen Signatur
3	8315-9433	373	mögliche Isomerase, ZP_01625963	marines Gamma-Proteobacterium HTCC2080; (Gammaproteobacteria)	402	48	7e-99	putative Mandelat Racemase/Muconat lactonisierendes Protein, Enolase Superfamilie
4	9467-10294	276	Sorbitol-6-Phosphat 2-Dehydrogenase, YP_002250188	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12; (Dictyoglomi)	265	35	1e-34	möglicherweise involviert in Lipid Transport und Metabolismus
5	10634-13435	934	konserviertes hypothetisches Protein LNTAR_11021, ZP_01873986	<i>Lentisphaera araneosa</i> HTCC2155; (Lentisphaerae)	899	38	0.0	Protein unbekannter Funktion, keine konservierten Domänen

ORF	Lokus	entspr. Größe [AS]	Genprodukt (BLASTp-Analyse)	Organismus / Phylum	Größe [AS]	Identität [%]	E-Wert	Vorhergesagte Funktion / Anmerkungen
6	14122-16353	744	extrazelluläres Substrat-Bindeprotein, YP_001245258	<i>Thermotoga petrophila</i> RKU-1; (Thermotogae)	655	31	3e-71	ABC-Transporter, Substrat Bindeprotein, 1 Transmembran-Domäne vorhergesagt, gram positive Zellwand vermutet
7	16501-17496	332	Oligopeptid ABC-Transporter, Permease Protein, YP_002251413	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12; (Dictyoglomi)	327	53	2e-100	ABC-Transporter, Permease I, 6 Transmembran-Helices vorhergesagt
8	17496-18653	386	Bindeprotein-abhängiges Transportsystems; innere Membran Komponente, YP_001738547	<i>Thermotoga</i> sp. RQ2; (Thermotogae)	367	59	1e-125	ABC-Transporter, Permease II, 6 Transmembran-Helices vorhergesagt
9	18703-19752	350	Oligopeptid ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein, YP_002251411	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12; (Dictyoglomi)	334	60	6e-114	ABC-Transporter, ATPase I
10	19745-20776	344	Oligopeptid ABC-Transporter, ATP-Bindeprotein, YP_002251410	<i>Dictyoglomus thermophilum</i> H-6-12; (Dictyoglomi)	336	59	5e-122	ABC-Transporter, ATPase II
11	20709-21743	345	konserviertes hypothetisches Protein Fnod_0209, YP_001409733	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1; (Thermotogae)	275	30	8e-22	Protein unbekannter Funktion, Mitglied der DUF849 Superfamilie
12	21780-22625	282	Xylose Isomerase Domäne enthaltendes Protein, YP_998173	<i>Verminophrobacter eiseniae</i> EF01-2; (Betaproteobacteria)	303	28	2e-15	Protein unbekannter Funktion
13	22647-23741	365	Alkohol Dehydrogenase GroES Domänen Protein, ZP_02967525	Bakterium Ellin514; (Verrucomicrobia)	342	37	1e-49	mögliche Alkohol Dehydrogenase

Fortsetzung Tabelle 4-5.

Stammbauberechnungen basierend auf den Aminosäuresequenzen der beiden Adenylierungs-Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetase, welche von Cosmidklon 1n22 kodiert wird, bestätigten zusätzlich die phylogenetische Eigenständigkeit dieses NRPS-Typs (Abb. 4-15). Die Sequenzen fallen dabei in ein distinktes Adenylierungs-Domänen-Cluster („Lub“-Cluster; Proksch 2008, Grozdanov *et al.* in Vorbereitung). Sämtliche Sequenzen dieses Clusters stammen aus dem marinen Schwamm *A. aerophoba*. Diesen Adenylierungs-Domänen ist gemein, dass diese neue Signaturen darstellen. Das jeweilige Substrat konnte bioinformatisch nicht eindeutig aufgedeckt werden konnte. Für Adenylierungsdomäne 1 des NRPS von Klon 1n22 konnte lediglich eine Spezifität für Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten festgestellt werden. Dazu zählen Phenylalanin (Phe), Tryptophan (Trp), Phenyl-Glycin (Phg), Tyrosin (Tyr) und beta-Hydroxy-Tyrosin (Bht). Adenylierungsdomäne 2 hingegen scheint spezifisch zu sein für Aminosäuren mit langen, positiv geladenen Seitenketten, wie Ornitin (Orn), Lysin (Lys) und Arginin (Arg). Somit sind auch keine eindeutigen Aussagen zum Endprodukt der Synthetase möglich, zumal auch keine bekannten NRPS-Systeme kultivierter Bakterien in dieses Cluster fallen. Demgegenüber steht ein A-Domänen-Cluster („Seb“-Cluster), dessen Sequenzen größtenteils aus marinen Schwämmen, aber auch aus marinem Sediment stammen (Proksch 2008).

Stromaufwärts des NRPS-Gens befindet sich ein ORF, welcher eine Effluxpumpe kodiert, die möglicherweise am Export des Sekundärmetabolits aus der Zelle beteiligt ist. Weiterhin konnten fünf ORFs identifiziert werden, die zusammen einen ABC-Transporter kodieren, welcher aus einem Substrat-Bindeprotein, zwei Permeasen mit jeweils sechs Transmembrandomänen sowie zwei ATPasen besteht. Die genomische Organisation dieser Gene sowie das Auftreten von überlappenden ORFs ist dabei mit dem *dppABCDF* Dipeptid Transporter in *Helicobacter pylori* konsistent (Weinberg und Maier 2007).

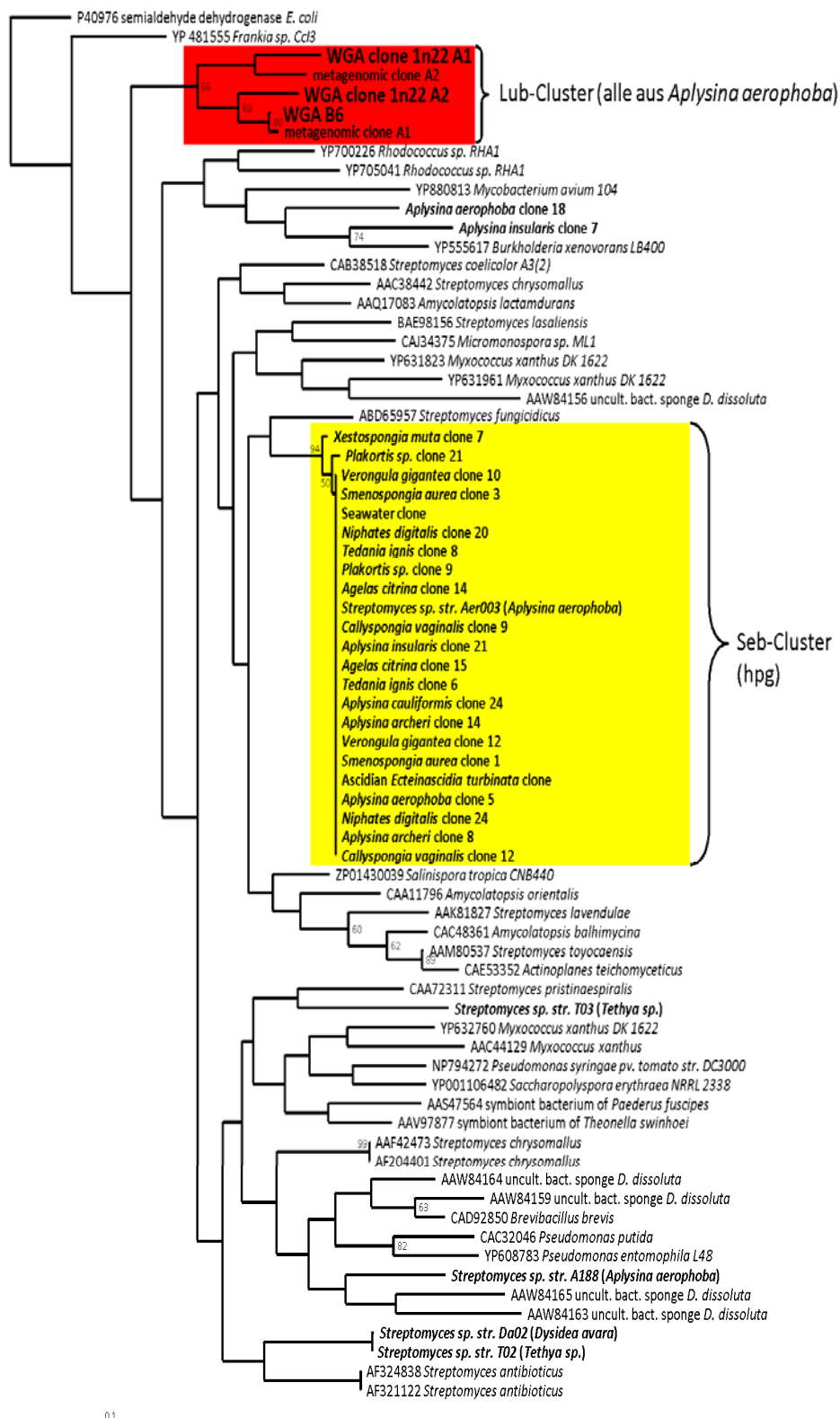


Abb. 4-15: Phylogenetischer Stammbaum von NRPS-Adenylierungsdomänen. Das Alignment wurde adaptiert von Proksch 2008. In fett dargestellt sind Sequenzen, die aus marinen Schwämmen stammen. Rot hinterlegt ist das sog. ‚Lub‘-Cluster, in das auch die beiden A-Domänen der NRPS von Cosmidklon 1n22 fallen. Das gelb hinterlegte ‚Seb‘-Cluster beinhaltet neben Schwamm-abgeleiteten Sequenzen auch einen kultivierten Vertreter der Gattung *Streptomyces*. Hierfür konnte 4-Hydroxy-Phenylglycin (hpg) als A-Domänen-Substrat identifiziert werden.

4.3.6. Sequenzanalyse des Cosmidklons 1k6 (PKS)

Die Sequenzierung des Cosmidklons 1k6 führte zur Assemblierung eines einzelnen ‚contigs‘ mit der Gesamtgröße von 27.001 bp. Die Endsequenzierung führte zunächst zu der Annahme, dass das darauf befindliche Polyketidsynthase- (PKS-) Gen nicht vollständig vorhanden ist. Allerdings konnte die Annotation zusammen mit der Analyse von Sequenzwiederholungen dies widerlegen. Das 27 kb große Insert beherbergt einen ‚inverted repeat‘ mit der Größe von 6.616 bp, welcher einen Teil des PKS-Gens beinhaltet (Abb. 4-16).

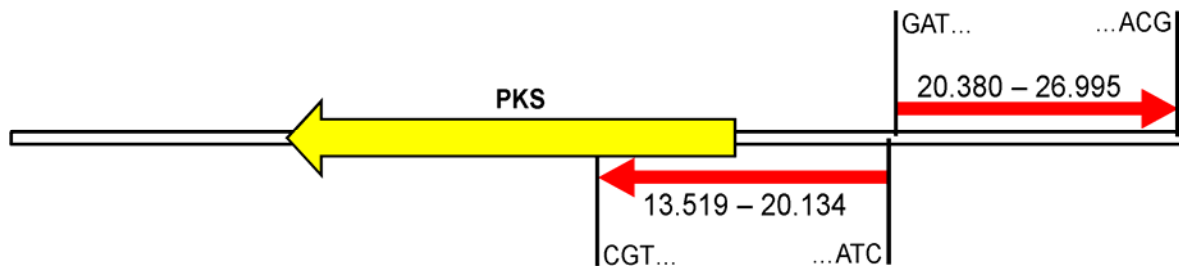


Abb. 4-16: Schematische Darstellung der Sequenzwiederholungen auf Cosmidklon 1k6. Gezeigt sind neben der Lage des PKS-Gens Position und Orientierung des ‚inverted repeats‘ (rote Pfeile).

Das rekonstruierte Insert des Klons 1k6 umfasste nach Ausschneiden des duplizierten Sequenzbereichs rund 20,4 kb an genomischer Information und besitzt einen durchschnittlichen GC-Gehalt von 64 % (Abb. 4-17). Insgesamt konnten 7 ORFs identifiziert werden (Abb. 4-17; Tabelle 4-6).

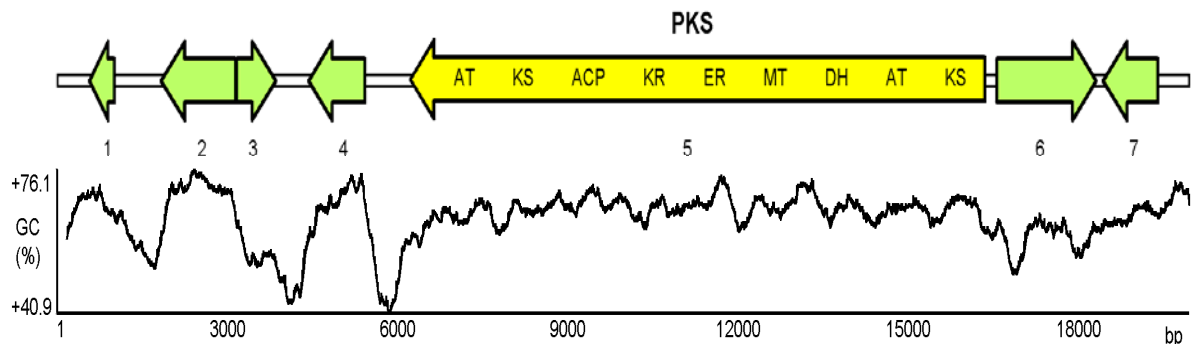


Abb. 4-17: Physikalische Kartierung und Verlauf des GC-Gehalts für das Insert von Cosmidklon 1k6. Eingezeichnet sind neben sechs identifizierten ORFs (grün) das PKS-Gen (gelb). Abkürzungen der PKS-Domänen: KS: β -Keto-Acyl-Synthase; AT: Acyl-Transferase; DH: Dehydratase; MT: C-Methyltransferase; ER: Enoyl Reduktase; KR: β -Keto Reduktase; ACP: Acyl Carrier Protein.

Tabelle 4-6: Allgemeine Eigenschaften des Inserts von Cosmidklon 1k6 (PKS-Gen) sowie Auflistung aller ORFs (Nummerierung analog zu Abb. 4-17). Neben Lokus und Größe des Genprodukts in Aminosäuren (AS) ist das jeweilige Homolog mit höchster Übereinstimmung nach BLASTp-Analyse aufgelistet.

Größe	GC-Gehalt	kodierender Bereich	ORFs	rRNA	tRNA	hypothetische Proteine	konservierte hypothetische Proteine	bekannte Proteine
20 401 bp	64.3%	81.4%	7	/	/	/	3	4

ORF	Lokus	entspr. Größe [AS]	Genprodukt (BLASTp-Analyse)	Organismus / Phylum	Größe [AS]	Identität [%]	E-Wert	Vorhergesagte Funktion / Anmerkungen
1	577-1026	150	IS4 Familie Transposase, YP_158424	<i>Azoarcus</i> sp. EbN1; (Betaproteobacteria)	363	51	7e-21	Transposase, kryptisch
2	1862-3217	452	konserviertes hypothetisches Protein Rcas_0194, YP_001430345	<i>Roseiflexus castenholzii</i> DSM 13941; (Chloroflexi)	452	54	2e-129	hypothetisches Protein; putative Transposase; Inverted Repeats: 1808-1824, 3286-3302 (17 bp)
3	3238-3936	233	Phagen Gp37Gp68 Familien Protein, YP_001864865	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102; (Cyanobacteria)	249	57	2e-64	Phagen Protein Gp38Gp68
4	4522-5541	340	konserviertes hypothetisches Protein AM1_0099, YP_001514501	<i>Acaryochloris marina</i> MBIC11017; (Cyanobacteria)	322	31	4e-25	hypothetisches Protein; putative Transposase; Homologien zu poribakteriellen putativen Transposase (AAW84294); Inverted Repeats: 4395-4420, 5551-5576 (26 bp)
5 (SupA)	6338-16696	3453	SupA, ABE03935	<i>Theonella swinhoi</i> bakterieller Symbionten Klon pSWIH8	3461	62	0.0	Polyketide Synthase (KS AT DH CM ER KR ACP KS AT)
6	16931-18727	599	konserviertes hypothetisches Protein P9303_28481, YP_001018843	<i>Prochlorococcus marinus</i> str. MIT 9303; (Cyanobacteria)	462	26	9e-34	hypothetisches Protein; putatives Tetratricopeptide Repeat (TPR) Domänen Protein
7	18852-19844	331	putative Hydroxylacyl-CoA Dehydrogenase, NP_884000	<i>Bordetella parapertussis</i> 12822; (Betaproteobacteria)	333	49	6e-73	konservierte Domäne AdoHcyase (cd00401): beteiligt an Modulation von Methyltransferasen

Phylogenetische Analysen zeigten auf, dass es sich bei dem, rund 10 kb umfassenden Polyketidsynthase- (PKS-) Gen um ein Mitglied der ‚sponge symbiont ubiquitous‘ Polyketidsysteme (Sup-PKS) vom Typ I handelt (Abb. 4-18). Diese evolutionär distinkte, hochgradig Schwamm-spezifische und in marinen Schwämmen weitverbreitete Klasse von PKS-Systemen spielt eine wichtige, wenn auch unbekannte Rolle bei der Schwamm-Bakterien-Interaktion (Fieseler *et al.* 2007). Die 3.461 Aminosäuren große Polyketidsynthase ist aus neun Domänen aufgebaut, deren Komposition der bereits beschriebener Sup-PKS-Systeme aus den marinen Schwämmen *Theonella swinhoei*, *Aplysina aerophoba*, *Discodermia dissoluta* und *Pseudoceratina clavata* gleicht (Abb. 4-19; Grozdanov und Hentschel 2007, Fieseler *et al.* 2007). Allerdings konnten keine Übereinstimmungen im genomischen Kontext identifiziert werden. Jeweils zwei Kopien der β -Keto-Acyl Synthase- (KS-) Domäne und Acyl-Transferase (AT-) Domäne sind vorhanden. Das Vorhandensein einer C-Methyltransferase- (MT-) Domäne unterstützt die Annahme, dass Sup-PKS-Systeme an der Biogenese von Methyl-verzweigten Fettsäuren beteiligt sind (Fieseler *et al.* 2007).

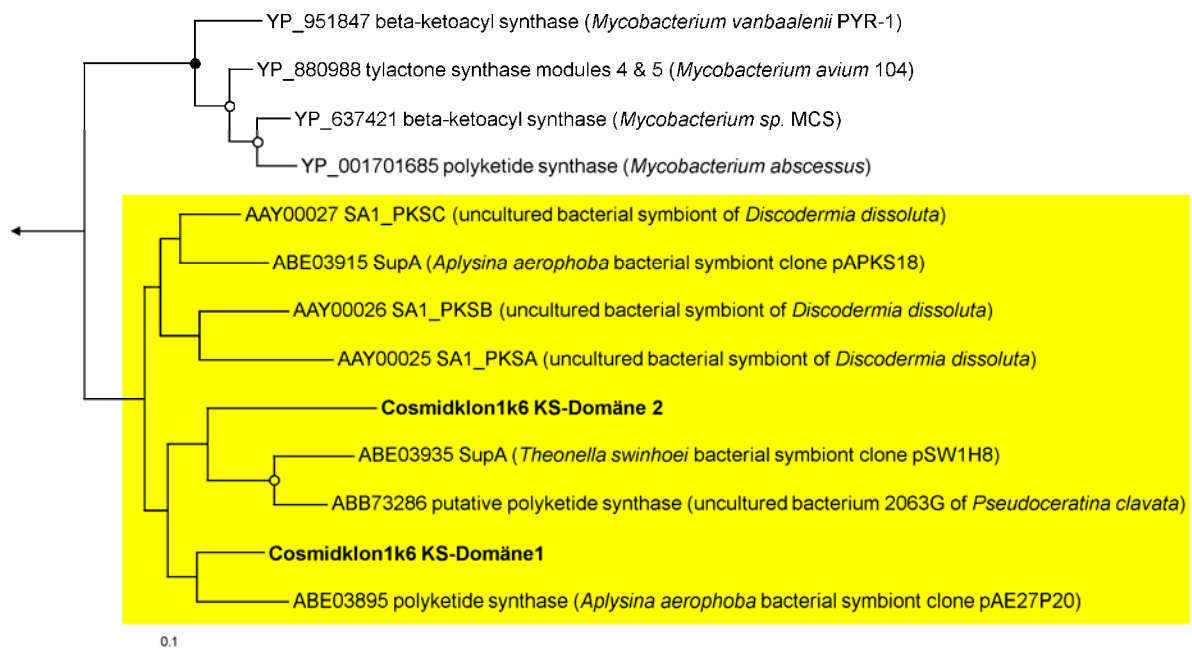


Abb. 4-18: Phylogenetischer Stammbaum basierend auf Aminosäuresequenzen der KS-Domänen von PKS-Genen. Schwarze Kreise an den Knotenpunkten repräsentieren ‚bootstrap‘-Werte von >90 und weiße Kreise von >75. Die Skalierung markiert 10 % Sequenzdivergenz. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe (CAA45043 Beta-Ketoacyl Synthase / Acyl Transferase von *Streptomyces coelicolor*), mit welcher der Baum gewurzelt wurde. Gelb hinterlegt ist ein Cluster von KS-Sequenzen des Sup-Typs aus marinen Schwämmen, welches sich deutlich von mykobakteriellen KS-Domänen abgrenzt. Die beiden KS-Domänen der Polyketidsynthase von Cosmidklon 1k6 sind fett dargestellt.



Abb. 4-19: Konservierte Domänenarchitektur sowie genomischer Kontext von Sup-PKS-Genen aus marinen Schwämmen. Gezeigt ist neben Cosmidklon 1k6 der aus *Theonella swinhoei* stammende Klon pSW1H8 (DQ438988) (a), der aus *Aplysina aerophoba* stammende Klon pAPKS18 (DQ438987) (b), der aus *Discodermia dissoluta* stammende Klon SA_1PKSC (AA00027) (c), der aus *Aplysina aerophoba* stammende Klon pAE27P20 (DQ438986) (d), der aus *Pseudoceratina clavata* stammende Klon 2063G (DQ228487) (e), sowie zwei Polyketidsynthasen aus *Mycobacterium tuberculosis* (CAA17592 und CAB06108) (f) (g), welche keine Methyltransferase-Domäne besitzen. Abbildung modifiziert nach Grozdanov und Hentschel (2007).

Interessanterweise besitzt ORF 7 eine S-Adenosyl-L-Homocystein Hydrolase Domäne (AdoHcyase). Proteine mit dieser funktionellen Domäne besitzen u.a. Methyltransferase-modulierende Eigenschaften. So ist durchaus denkbar, dass dieses Enzym die C-Methyltransferase-Domäne des Sup-PKS reguliert. ORF 6 kodiert ein hypothetisches Protein mit putativen Tetratricopeptid Repeat (TPR) Domänen, welche oftmals an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind. Ferner spielen diese Motive eine Rolle bei Prokaryonten-Eukaryonten-Interaktionen (Mittl und Schneider-Brachert 2007). Der stark schwankende GC-Gehalt im Bereich stromabwärts des *sup*-Gens (ORFs 1-4), die Homologien von ORFs 1, 2 und 4 zu Transposasen, sowie das Vorhandensein von ‚inverted repeats‘, welche die beiden ORFs 2 und 4 flankieren, sprechen für das Auftreten von Rekombinationsereignissen in diesem Bereich oder dessen Erwerb durch lateralen Gentransfer.

4.3.7. PCR-,Screening‘ zur phylogenetischen Zuordnung von NRPS und PKS

Um den phylogenetischen Ursprung der beiden, mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziierten Gene der Cosmidklone 1n22 und 1k6 (Lub-NRPS und Sup-PKS) zu klären, wurden weitere ‚whole genome amplifications‘ an FACS-vereinzelt Schwamm-assoziierten Bakterien durchgeführt. Da die Cosmidbank WGA-A4 mit amplifizierter genomischer DNA von zwei phylogenetisch distinkten Schwamm-assoziierten Bakterien konstruiert wurde, war der jeweilige Ursprung des NRPS-Gen bzw. des PKS-Gen tragenden Klons zunächst nicht eindeutig zu bestimmen. Die zusätzliche FACS-Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Bakterien aus frischem Schwammgewebe mit anschließenden ‚whole genome amplifications‘ führte zum Nachweis einzelner amplifizierter Genome. Klonierungen von rRNA-PCR-Produkten mit anschließender RFLP-Analyse und Sequenzierung zeigten, dass in einem Fall ein einzelner Vertreter der *Poribacteria* gewonnen wurde, in dessen amplifizierter genomischer DNA das Sup-PKS-Gen nachgewiesen werden konnte, nicht aber das NRPS-Gen. Zusätzlich konnte ein Vertreter der *Chloroflexi* TK23-Klade vereinzelt werden, dessen amplifiziertes Genom das Lub-NRPS-Gen trägt, nicht aber das Sup-PKS-Gen. Tabelle 4-7 zeigt die wichtigsten Ergebnisse dieser PCR-Durchmusterung im Überblick.

Tabelle 4-7: Ergebnisse des PCR-,Screenings‘ auf amplifizierte genomische DNA vereinzelter Schwamm-assoziiierter Bakterien unter Angabe der verwendeten Primer.

	<i>Poribacteria</i> (389f/1130r)	<i>Chloroflexi</i> (TK23for2/TK23rev2)	NRPS (A3/A7R)	PKS (KSDPQQF/KSHGTGR)
Cosmidbank WGA-A4	+	+	+	+
WGA-B6	–	+	+	–
WGA-A3	+	–	–	+

Die amplifizierte genomische DNA von ‚well‘ A3, welche von einem einzelnen Poribakterium stammte, wurde einer 454-Pyrosequenzierung unterzogen und wird ausführlich in den folgenden Kapiteln beschrieben. In WGA-B6 konnte ausschließlich das 16S rRNA-Gen eines Vertreters der Schwamm-spezifischen *Chloroflexi* TK23-Klade nachgewiesen werden. In Abbildung 4-20 ist die RFLP-Analyse des klonierten 16S rDNA-PCR-Produkts

aus ‚well‘ B6 dargestellt, welche das Vorhandensein eines einzelnen bakteriellen Phylotyps bestätigt.

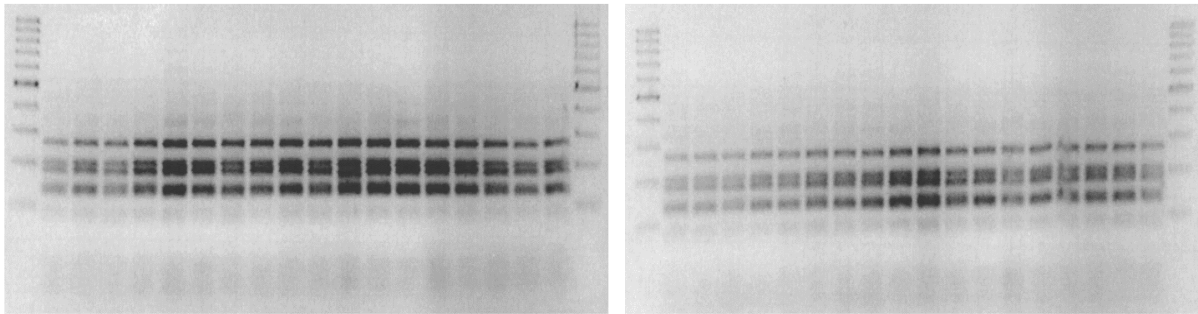


Abb. 4-20: RFLP-Analyse von 36 zufällig ausgewählten Klonen der 16S rDNA-Klonierung von WGA-B6. Es wurde ein Doppelverdau mit den Restriktionsenzymen *Hae*III und *Msp*I durchgeführt. Marker: 100 bp DNA Ladder (Fermentas).

Die Ergebnisse zeigen deutlich das große Potential von WGA-basierten Ansätzen für eine gezielte Verknüpfung von Phylogenie und Funktion nichtkultivierter Bakterien aus Umweltproben. Vor allem bei komplexen mikrobiellen Konsortien ist dieses Ziel über metagenomische Ansätze nur schwer zu erreichen. Das PCR-‚Screening‘ von WGAs vereinzelter Schwammsymbionten erlaubte die phylogenetische Zuordnung zweier funktioneller Gene. Im Rahmen dieses Projekts konnte eine Polyketidsynthase vom Sup-Typ dem Schwamm-spezifischen Candidatus Phylum *Poribacteria* zugewiesen werden. Eine neuartige nichtribosomale Peptidsynthetase (Lub-NRPS) wurde einer ebenfalls Schwamm-spezifischen Klade innerhalb der *Chloroflexi* zugeordnet. Zusätzlich gewährte die Cosmidklonierung von WGA-Produkten einen Einblick in den genomischen Kontext dieser Sekundärmetabolismus-assoziierten Gene.

4.4. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms

4.4.1. Phylogenetische Klassifizierung der Ausgangs-DNA

Für die 454-Sequenzierung wurde das Produkt einer ‚whole genome amplification‘ ausgewählt, das mittels PCR positiv auf das Vorhandensein eines poribakteriellen 16S rRNA Gens, aber negativ auf andere eubakterielle und archaeale 16S rDNA sowie eukaryontische 18S rDNA getestet wurde (Abb. 4-21). Die Sequenzierung des, mit dem Primerpaar 389f/ 1130r erhaltenen PCR-Produkts bestätigte das Vorhandensein von poribakterieller 16S rDNA im Amplikon A3 (Abb. 4-22; Tabelle 4-8). Ferner konnte in der amplifizierten DNA aus diesem ‚well‘ ein Sup-PKS-Genfragment amplifiziert werden (Abb. 4-21).

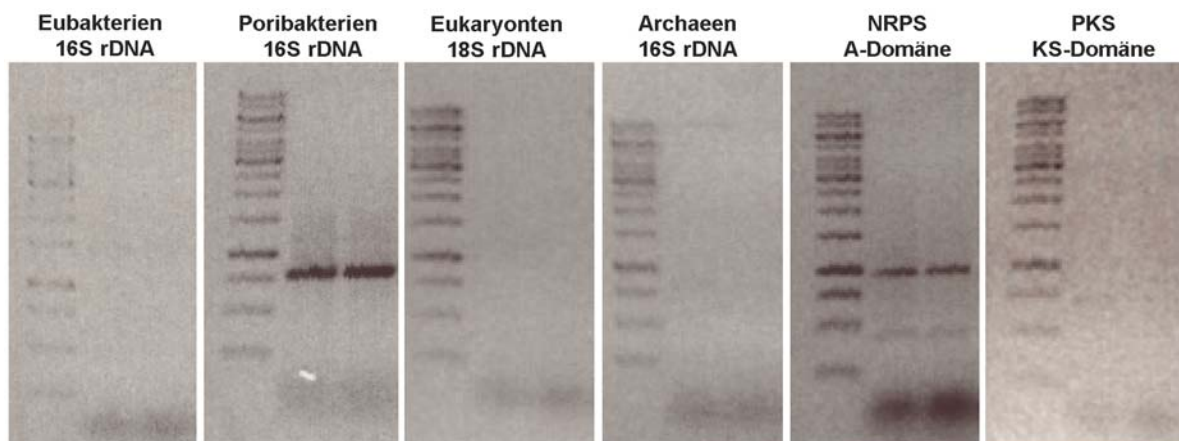


Abb. 4-21: PCR-, ‚Screening‘ von WGA-A3. Als ‚template‘ dienten hierfür die beiden Eluate des aufgereinigten ‚whole genome amplification‘-Produkts. Getestet wurde sowohl auf ribosomale Gene, als auch auf NRPS- bzw. PKS-Gene. Probenauftragung von links nach rechts: GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1. Eluat; 2. Eluat. Deutlich erkennbar ist, dass nur ein poribakterielles rRNA-Genfragment amplifiziert wurde. Zusätzlich weist die schwache Bande der PKS-PCR die richtige Größe auf, wohingegen die NRPS-PCR kein PCR-Produkt der korrekten Größe, sondern nur unspezifische Banden lieferte.

Tabelle 4-8: BLASTn-Analyse des poribakteriellen 16S rDNA-Fragments von WGA-A3. Verwendet wurde hierbei das durch die 454-Sequenzierung erhaltene, 1.339 bp große Fragment des 16S rRNA-Gens.

bester BLASTn Treffer	Identität	E-Wert
nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium Klon 64K2 (Fieseler <i>et al.</i> 2006; AY713479)	1314/1342 (97 %)	0,0

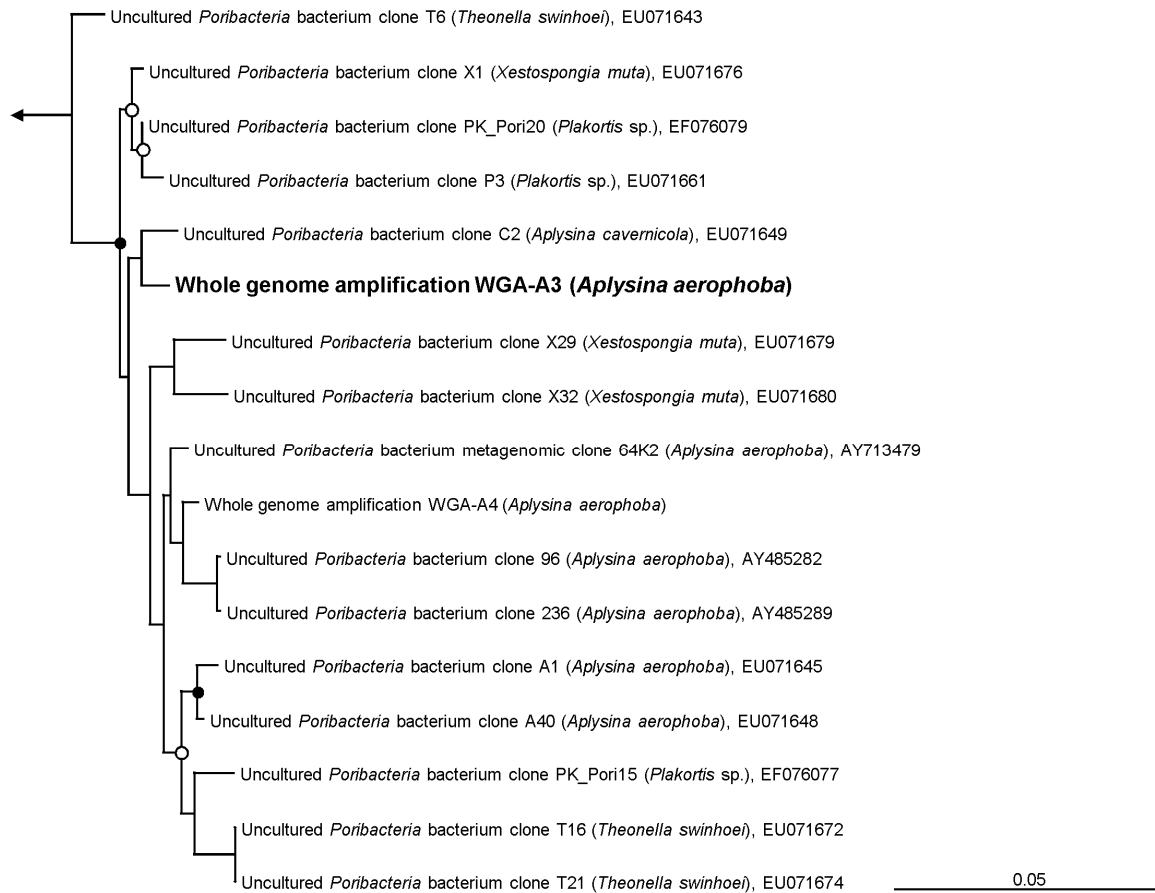


Abb. 4-22: Phylogenetischer Stammbaum („neighbor joining“) basierend auf 16S rRNA-Genen (801 bp Alignment Länge) des bakteriellen, Schwamm-spezifischen Candidatus Phylums *Poribacteria*. Die, von der 454-Sequenzierung des ‚wells‘ WGA-A3 abgeleitete Sequenz ist fett dargestellt. Es wurde das gleiche Alignment verwendet wie für die Stammbaumberechnung für Abbildung 4-7, somit ist auch die poribakterielle 16S rDNA-Sequenz von WGA-A4 enthalten. Angegeben ist bei Referenzsequenzen neben der ‚accessionnummer‘ auch die Schwammart, aus der die Sequenz stammte. Der Pfeil zeigt zur Außengruppe (*Escherichia coli*; X80725), mit welcher der Baum gewurzelt wurde. Schwarze Kreise an den Knotenpunkten repräsentieren ‚bootstrap‘-Werte von >90 und weiße Kreise von >75. Die Skalierung markiert 5 % Sequenzdivergenz.

Nach Aufreinigung des WGA-Produkts von ‚well‘ A3 wurden die beiden Eluate (je 200 µl) erneut mittels PCR überprüft. Unter Verwendung der universellen 16S rDNA-spezifischen Primer 27f und 1492r und 40 Zyklen wurden hierbei in beiden Eluaten sehr schwache, kaum sichtbare Banden der korrekten Größe nachgewiesen. Sowohl die direkte Sequenzierung des PCR-Produkts als auch die Auswertung der Klonierung ergab, dass es sich hierbei um einen Vertreter der Gattung *Delftia* handelte. Im Rahmen vorhergehender Studien konnten bereits mehrmals Kontaminationen von kommerziell erhältlichen WGA-Kit-Komponenten verschiedener Hersteller mit DNA des Betaproteobakteriums *Delftia acidovorans* beobachtet werden (vertrauliche persönliche Mitteilung). Da es sich somit um keine Laborkontamination handelte und ferner eine öffentlich zugängliche Genomsequenz von *Delftia acidovorans*

vorhanden ist, wurde WGA-A3 für die 454-Sequenzierung ausgewählt. Gegebenenfalls hätten später von *Delftia* abgeleitete 454-Sequenzen bioinformatisch von poribakterieller Sequenz getrennt werden können. Allerdings lassen Statistiken der automatischen Annotation die Schlussfolgerung zu, dass die Daten der 454-Sequenzierung nicht mit *Delftia*-DNA kontaminiert sind bzw. diese stark unterrepräsentiert ist. So ist *Delftia* bei der GenomesDB-Statistik in ‚JCoast‘ auf Gattungsebene nicht vertreten (siehe Anhang, Kapitel 8.8.), obwohl das Genom von *Delftia acidovorans* SPH-1 (CP000884) komplettsequenziert ist. Ferner konnten neben dem Poribakterien 16S rRNA-Gen keine weiteren rRNA-Gene identifiziert werden, was eine Kontamination des 454-Datensatzes vermuten ließe. Auch die Analyse von ‚single copy‘ Genen lässt keinen Rückschluss auf eine etwaige Kontamination zu, da keines der hierbei untersuchten 55 Gene in mehrfacher Kopie vorlag (siehe Kapitel 4.4.4.). Zusammengenommen sprechen die Daten dafür, dass die amplifizierte und pyrosequenzierte genomischen DNA ausschließlich poribakteriellen Ursprungs ist.

4.4.2. Maximierung der DNA-Ausbeute

Durch die Verwendung des REPLI-g Midi Kits (Qiagen) wurde die für die Pyrosequenzierung benötigte Menge an amplifizierter, genomischer DNA gewonnen. Nach der Aufreinigung der Amplikons aus ‚well‘ A3 mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) wurde die DNA-Ausbeute beide Eluate (je 200 μ l) zunächst separat spektrophotometrisch bestimmt und die Eluate danach vereint. Das erste Eluat enthielt 20 μ g amplifizierter DNA, das zweite Eluat 7,8 μ g (Abb. 4-23).

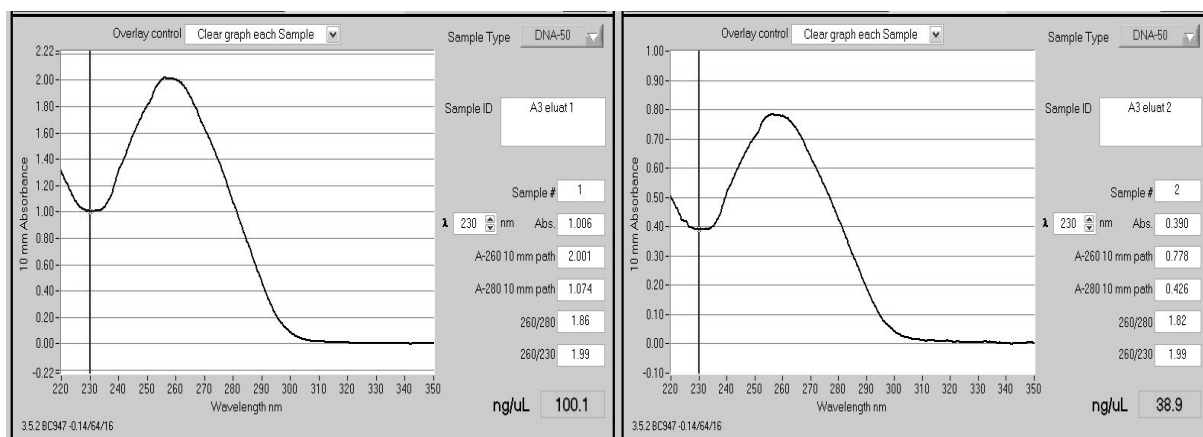


Abb. 4-23: Ergebnisse der spektrophotometrischen Messung beider aufgereinigten Eluate (je 200 μ l) von WGA-A3. Linke Teilabbildung: erstes Eluat mit einer Gesamtausbeute von 20 μ g DNA. Rechte Teilabbildung: zweites Eluate mit einer Gesamtausbeute von 7,8 μ g DNA.

Die erneute spektrophotometrische Messung der vereinten Eluate ergab schließlich eine Gesamtausbeute von 23,5 µg DNA. Ein typisches bakterielles Chromosom enthält nur wenige Femtogramm (10^{-15} g) DNA (Hutchison III und Venter 2006). Somit wurde in ‚well‘ A3 das poribakterielle Genom um das ca. 10 Milliarden- (10^{10} -) fache amplifiziert. Alle berechneten Ratios lagen innerhalb der Soll-Bereiche und belegen die Reinheit der amplifizierten genomischen DNA.

4.4.3. Rohdaten der 454-Sequenzierung

Das poribakterielle WGA-Produkt aus ‚well‘ A3 wurde zur Qualitätssicherung zunächst einem 454-Titrationslauf unterzogen. Dabei wurden insgesamt 610 kb sequenziert und eine durchschnittliche ‚read‘-Länge von 288 bp erreicht. Die Eckdaten des eigentlichen 454-Sequenzierlaufs sind in Tabelle 4-9 aufgelistet, eine vollständige Darstellung aller Informationen über die Pyrosequenzierung sowie die Assemblierung sind im Anhang (Kapitel 8.8.) dargestellt. Insgesamt wurden rund 105 Mb an Sequenzdaten generiert, was in der Theorie einer 21-fachen Abdeckung eines 5 Mb umfassenden bakteriellen Chromosoms entspricht.

Tabelle 4-9: Eckdaten der 454-Sequenzierung von amplifizierter genomischer DNA aus ‚well‘ WGA-A3.

Anzahl an ‚reads‘	durchschnittliche ‚read‘-Länge [bp]	Basenpaare insgesamt
456.103	230	105.233.784

Insgesamt konnten 87 % (395.363) aller ‚reads‘ vollständig assembliert werden. Die assemblierten Sequenzdaten wurden dabei basierend auf der ‚contig‘-Länge in zwei Datensätze aufgeteilt. Der Datensatz ‚454AllContigs‘ enthält dabei alle ‚contigs‘ mit einer Länge von mehr als 100 bp, wohingegen der Datensatz ‚454LargeContigs‘ nur ‚contigs‘ mit einer Sequenzlänge von mehr als 500 bp umfasst. In Tabelle 4-10 sind die wichtigsten Informationen zur Assemblierung zusammengefasst. Insgesamt konnten rund 2 Mb an genomischer Information assembliert werden, wobei 80 % davon in 555 Contigs mit einer Länge von mehr als 500 bp organisiert sind. Beide Datensätze wurden im Multi-FASTA-Dateiformat an die Firma Ribocon zur automatischen Annotation übermittelt.

Tabelle 4-10: Informationen zur Assemblierung der 454-Sequenzdaten von amplifizierter genomischer DNA aus ‚well‘ WGA-A3. Abkürzung n.b.: nicht bestimmt. Der N50-Wert gibt an, ab welcher ‚contig‘-Länge 50 % der assemblierten Daten vorzufinden sind.

Datensatz	Anzahl an ‚contigs‘	Anzahl an bp	durchschnittl. ‚contig‘-Länge	N50 ‚contig‘-Länge	Länge des größten ‚contigs‘
‚454AllContigs‘ (>100 bp)	2255	1.989.425	n.b.	n.b.	n.b.
‚454LargeContigs‘ (>500 bp)	555	1.594.285	2.872 bp	7.234 bp	46.669 bp

4.4.4. Eckdaten der automatischen Annotation

Die beiden Datensätze mit den assemblierten Sequenzdaten wurden von der Firma Ribocon auf der Basis ihrer kodierenden Bereiche in zwei Datenbanken gegliedert. Die Datenbank ‚POR_CDs‘ enthält alle Fragmente, auf denen mindestens ein vollständiger ORF kodiert ist, wohingegen die DNA-Fragmente des Datensatzes ‚POR_Contigs‘ meist aufgrund ihrer geringen Größe keine vollständigen ORFs enthalten. Die DNA-Sequenzen dieser ‚contigs‘ wurden daher in alle sechs Leseraster übersetzt und diese auf Homologien zu Datenbankeinträgen hin untersucht. Die Kerndaten der automatischen Annotation beider Datenbanken sind in Tabelle 4-11 dargestellt. Aufgrund der begrenzten Aussagekraft des Datensatzes ‚POR_Contigs‘ liegt das Hauptaugenmerk der folgenden Ergebnisse auf dem Datensatz ‚POR_CDs‘. Dieser Datensatz beinhaltet 462 Fragmente mit insgesamt rund 1,5 Mb Sequenzinformation. Der durchschnittliche GC-Gehalt liegt bei 53 %. Kodierende Bereiche machen 78 % der Sequenzinformation aus. Insgesamt wurden innerhalb des Datensatzes ‚POR_CDs‘ 1.604 kodierende Gene mit einer durchschnittlichen Länge von 742 bp vorhergesagt. Für 76 % dieser ORFs konnten Homologien zu NCBI-Datenbankeinträgen festgestellt werden (‚cutoff‘ 1e-05). Der Datensatz ‚POR_CDs‘ beinhaltet zudem insgesamt 19 tRNAs. Zusätzlich konnte ein poribakterielles 16S rRNA-Gen identifiziert werden. Allerdings ist dieses mit einer Länge von 1.339 bp nicht vollständig auf dem entsprechenden ‚contig‘ vorhanden siehe Kapitel 4.4.5.).

Tabelle 4-11: Allgemeine Eigenschaften der beiden Datenbanken, welche aus der automatischen Annotation resultierten. Nur Fragmente des Datensatzes ‚POR_CDS‘ enthalten vollständige ORFs. In der Spalte ‚POR_All‘ sind die Ergebnisse der beiden Datensätze zusammengefasst. Fußnoten: # = unvollständig; * = Übersetzung der Nukleotidsequenzen in alle sechs Leseraster.

	POR_CDS	POR_Contigs	POR_All
>10000	36	0	36
>5000	78	0	78
>3000	115	1	116
>2000	160	3	163
>1000	283	23	306
<1000	179	1770	1949
Fragments	462	1793	2255
Size [bp]	1512514	476911	1989425
A	354720 [23.45%]	109627 [22.99%]	464347 [23.34%]
T	351947 [23.27%]	107360 [22.51%]	459307 [23.09%]
C	392852 [25.97%]	127100 [26.65%]	519952 [26.14%]
G	412760 [27.29%]	131089 [27.49%]	543849 [27.34%]
N	235 [0.02%]	1735 [0.36%]	1970 [0.1%]
Coding [%]	78	-	-
Predicted coding genes	1604	1189*	-
Average CDS length [bp/aa]	742/246	-	-
Number of tRNAs	19	0*	-
Number of rRNAs	1#	0*	-
Genes with similarity to nr (< 1e-05)	1220	943*	-
Genes with similarity to genomesDB	1144	806*	-

Bei der Analyse von 55 ‚single copy‘ Genen wurden insgesamt 37 (67 %) in jeweils einem der beiden Datensätze gefunden. Unter anderem wird eine Vielzahl ribosomaler Proteine nur von einer einzigen Kopie des jeweiligen Gens kodiert. Keines der untersuchten Gene trat dabei in mehrfacher Kopie auf (Tabelle 4-12), was als Beleg für die Reinheit der poribakteriellen DNA gewertet werden kann.

Tabelle 4-12: Bioinformatrisches ‚screening‘ der beiden Datenbanken auf das Vorhandensein bekannter ‚single copy‘ Gene. Angegeben ist die Anzahl identifizierter Kopien.

Model	POR Contigs	POR CDS
B3_4	1	0
B5	0	0
DUF143	0	0
DUF150	0	1
DUF173	0	0
DUF177	0	0
EF_TS	0	1
Exonuc_VII_S	0	0
FDX-ACB	1	0
GlutR_dimer	0	0
GlutR_N	1	0
Glu-tRNAGln	0	0
HrcA	0	0
IF2_N	0	1
IGPD	0	1
NusG	0	1
Phe_tRNA-synt_N	0	0
PNPase	0	1
RBFA	0	1
RecO	1	0
RecR	0	0
Ribonuclease_P	0	0
Ribosomal_L12	0	1
Ribosomal_L15	1	0
Ribosomal_L16	0	1
Ribosomal_L17	1	0
Ribosomal_L19	0	1
Ribosomal_L20	0	0
Ribosomal_L21p	0	0
Ribosomal_L27	0	0
Ribosomal_L29	1	0
Ribosomal_L9_C	0	0
Ribosomal_L9_N	0	0
Ribosomal_S16	0	0
Ribosomal_S20p	0	0
Ribosomal_S3_C	1	0
Ribosomal_S3_N	0	1
Ribosomal_S6	0	0
RimM	0	1
RNA_pol_Rpb6	0	0
RRF	0	1
RuvA	0	0
RuvB_N	1	0
RuvC	0	0
SecE	0	1
SecG	0	0
SmpB	0	0
SRP_SPB	0	1
Trigger_C	0	1
tRNA_m1G_MT	0	1
tRNA_synt_2e	0	0
tRNA_synt_2f	0	1
Tyr_Deacylase	0	0
UPF0054	0	1
YgbB	1	0

Die 22 größten ‚contigs‘ wurden zudem einer Tetranukleotidfrequenz-Analyse unterzogen. Die vollständige Tabelle mit den Korrelationswerten ist im Anhang (Kapitel 8.8.) wiedergegeben. Hierbei wurden allerdings nur mäßige Korrelationen zwischen den untersuchten ‚contigs‘ festgestellt. Allerdings ist bekannt, dass die Verwendung von Oligonukleotiden innerhalb eines Genoms stark variieren kann. Interessanterweise wurde dieses Phänomen vermehrt bei Wirt-assoziierten Bakterien festgestellt (Bohlin *et al.* 2008).

Ferner wurde eine Einteilung der annotierten ORFs in funktionelle Kategorien durchgeführt (Tabelle 4-13). Diese Statistik beruhte auf der COG-Datenbank (‚clusters of orthologous groups‘; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>). Rund der Hälfte aller ORFs wurde eine Kategorie mit bekannter Funktion zugewiesen.

Tabelle 4-13: Verteilung von COGs (cutoff $1e-4$) in den beiden Datensätzen der automatischen Annotation. Angegeben ist die Anzahl identifizierter ORFs, die den jeweiligen funktionellen Gruppen zugeordnet wurden.

Code	POR_Contigs	POR_CDS
[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	58	57
[K] Transcription	31	32
[L] DNA replication, recombination and repair	55	104
[D] Cell division and chromosome partitioning	2	17
[O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones	11	60
[M] Cell envelope biogenesis, outer membrane	18	41
[N] Cell motility and secretion	11	30
[P] Inorganic ion transport and metabolism	29	50
[T] Signal transduction mechanisms	16	19
[C] Energy production and conversion	45	55
[G] Carbohydrate transport and metabolism	22	26
[E] Amino acid transport and metabolism	68	84
[F] Nucleotide transport and metabolism	23	22
[H] Coenzyme metabolism	26	41
[I] Lipid metabolism	16	16
[Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	30	33
[R] General function prediction only	76	122
[S] Function unknown	12	67
ORFs with COGs	497	810
ORFS	1189	1604
COGS	549	876

Anhand von Tabelle 4-13 ist erkennbar, dass alle funktionellen Kategorien des Primärstoffwechsels abgedeckt sind. Zusätzlich konnten insgesamt 63 Gene bzw. Genfragmente identifiziert werden, die mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziiert sind.

Zusätzlich wurden alle identifizierten ORFs einem Pfam-Datenbank-Abgleich unterzogen (Tabelle 4-14). Diese Datenbank umfasst derzeit mehr als 10.000 Proteindomänen-Familien (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

Tabelle 4-14: Analyse der Proteindomänen-Familien (‚Pfam model count‘; ‚cutoff‘ 1e-4). Dargestellt sind die 15 am meisten vertretenen ‚Pfams‘ des Datensatzes POR_CDs. Die vollständige Tabelle ist im Anhang (Kapitel 8.8.) dargestellt.

Model	POR_Contigs (abs)	POR_CDS (abs)
TPR_1	20	37
TPR_2	16	30
WD40	14	24
ABC_tran	12	23
PIN	1	10
HTH_3	0	9
rve	7	8
GFO_IDH_MocA	2	8
UPF0150	0	7
GTP_EFTU	1	7
PhyH	3	7
Surf_Ag_VNR	0	6
CbiA	0	6
Redoxin	1	6
Transposase_35	0	6

Die am häufigsten identifizierten Proteindomänen des poribakteriellen Datensatzes stellen Domänen mit Sequenzwiederholungen dar. Dazu zählen TPR_1, TPR_2 sowie WD40. ‚Tetratricopeptid repeats‘ (TPRs) sind strukturelle Proteinmotive, die in einer Vielzahl von prokaryontischen und eukaryontischen Organismen vorzufinden sind und dabei unterschiedlichste Funktionen (z.B. bei der Transkriptionsregulation) einnehmen. Interessanterweise sind TPRs ebenfalls am mitochondrialen und peroxisomalen Transport beteiligt. Somit wäre eine Beteiligung von TPR-haltigen Proteinen bei Transportprozessen des poribakteriellen intrazellulären Kompartiments denkbar. WD40-Domänen sind ebenfalls durch sich wiederholende Sequenzeinheiten charakterisiert und an einer Reihe von Funktionen beteiligt. Gemein ist jedoch allen WD40-Proteinen ihre Rolle beim Aufbau von Multiprotein-Komplexen. Interessanterweise können auch TPR- und WD40-Domänen untereinander interagieren. Ebenfalls in Form von ‚repeats‘ tritt die Domäne ‚Surf_Ag_VNR‘ auf, die in erster Linie bei bakteriellen Oberflächenantigenen vorzufinden ist.

Insgesamt 23 ORFs des Datensatzes ‚POR_CDs‘ konnte eine ABC-Transporter-Domäne (ABC_tran) zugewiesen werden. Ebenfalls zahlreich vorhanden sind Domänen, welche DNA-bindende Eigenschaften besitzen (HTH_3; rve; Transposase_35). UPF0150-Domänen sind hingegen zwar weitgehend nicht charakterisiert, allerdings wird eine RNA-bindende Funktion vermutet. Insgesamt 15 ORFs des Datensatzes ‚POR_CDs‘ besitzen Domänen mit einer Oxidoreduktase-Aktivität (GFO_IDH_MocA; Redoxin). Zu den häufigsten Domänen, welche im poribakteriellen 454-Datensatz gefunden wurde, zählen ferner PIN (unbekannte Funktion, evtl. beteiligt an Signalkaskaden), GTP_EFTU (Elongationsfaktoren), PhyH (u.a. bakterielle Deoxygenasen) sowie CbiA (Amidasen).

Zusätzlich wurde ein Abgleich der annotierten ORFs mit GenomesDB (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>) durchgeführt. Diese Datenbank enthält im Gegensatz zu NCBI-nr nur veröffentlichte Komplet-Genom-Sequenzen. Somit ist eine phylogenetische Zuordnung der besten Treffer möglich. Tabelle 4-15 zeigt die Auswertung auf Domänenebene, Tabelle 4-16 auf Phylumebene. Die Auswertungen auf den Ebenen Klasse, Familie, Ordnung, Gattung und Art sind im Anhang (Kapitel 8.8.) aufgelistet.

Anhand von Tabelle 4-15 wird zudem deutlich, dass basierend auf einem Datenbankabgleich mit GenomesDB 95 % aller ORFs aus dem Datensatz ‚POR_CDs‘ ein bakterieller Ursprung zugewiesen wurde. Wiederum 54 % dieser ORFs besitzen größte Homologien zu proteobakteriellen ORFs aus GenomesDB. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass GenomesDB keine poribakteriellen Referenzsequenzen beinhaltet. Zudem sind die meisten GenomesDB-Einträge den *Proteobacteria* zugehörig. Dies könnte auch erklären, warum die poribakteriellen Schwesterphyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* und *Chlamydiae* in Tabelle 4-16 stark unterrepräsentiert sind. Andererseits könnte die beobachtete Verteilung auch die phylogenetische und somit auch genomische Eigenständigkeit der *Poribacteria* widerspiegeln.

Tabelle 4-15: GenomesDB Statistik auf Domänen-Ebene (,cutoff² 1e-4). Angegeben ist die Anzahl von ORFs, die den jeweiligen Domänen zugeordnet wurden.

Model	POR_Contigs	POR_CDS
Bacteria	838	1112
Archaea	27	47
Unbekannt	5	13

Tabelle 4-16: GenomesDB Statistik auf Phylum-Ebene (cutoff $1e-4$). Angegeben ist die Anzahl von ORFs, die den jeweiligen bakteriellen Phyla bzw. den archaealen Abstammungslinien zugeordnet wurden.

Model	POR_Contigs	POR_CDS
<i>Proteobacteria</i>	471	600
<i>Firmicutes</i>	110	142
<i>Cyanobacteria</i>	70	108
<i>Chloroflexi</i>	24	56
<i>Acidobacteria</i>	30	51
<i>Bacteroidetes</i>	44	42
<i>Actinobacteria</i>	39	37
<i>Euryarchaeota</i>	21	35
<i>Chlorobi</i>	20	29
<i>Aquificae</i>	2	14
unbekannt	5	13
<i>Spirochaetes</i>	10	12
<i>Crenarchaeota</i>	5	9
<i>Verrucomicrobia</i>	4	7
<i>Thermotogae</i>	7	5
<i>Planctomycetes</i>	1	3
<i>Korarchaeota</i>	1	3
<i>Deinococcus-Thermus</i>	2	3
<i>Chlamydiae</i>	3	2
<i>Fusobacteria</i>	1	1

Den, in den folgenden Kapiteln beschriebenen Ergebnissen der poribakteriellen 454-Sequenzierung liegt, sofern nicht anders vermerkt, ausschließlich die automatische Annotation zugrunde. Auf eine manuelle Korrektur der Annotation wurde nur in einzelnen Fällen zurückgegriffen.

4.4.5. ‚Contig‘ c00110 (*Poribacteria* 16S rDNA-positiv)

Im 454-Datensatz ‚POR_CDs‘ konnte ein 2,8 kb umfassender ‚contig‘ identifiziert werden (Abb. 4-24; Tabelle 4-17), der das poribakterielle 16S rRNA-Gen beherbergt. Allerdings ist dieses mit einer Länge von 1.339 bp nicht vollständig vorhanden. Der GC-Gehalt liegt bei 48,1 %. Weitere rRNA-Gene konnten in keinem der beiden Datensätze gefunden werden. Vom Referenzklon 64K2 (Fieseler *et al.* 2006) ist jedoch bekannt, dass das poribakterielle rRNA-Operon getrennt vorliegt. Neben dem 16S rRNA-Gen kodiert ‚contig‘ c00110 eine Isoleucin-tRNA (Antikodon GAU) und zumindest partiell eine DNA Modifikations-Methylase (Tabelle 4-18).

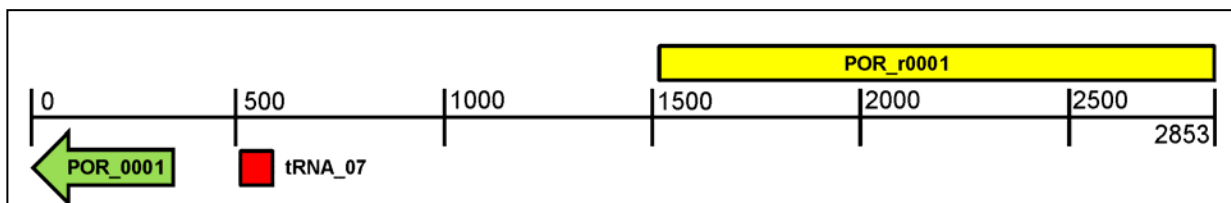


Abb. 4-24: Physikalische Genkarte des Poribakterien 16S rRNA-Gen kodierenden ‚contigs‘ c00110.

Tabelle 4-17: Allgemeine Eigenschaften des Poribakterien 16S rRNA-Gen kodierenden ‚contigs‘ c00110.

Contig-ID	Länge [bp]	ORFs	rRNAs	tRNAs	kodierender Bereich [%]
c00110	2853	1	1	1	60

Tabelle 4-18: Identifizierte Gene des Poribakterien 16S rRNA-Gen kodierenden ‚contigs‘ c00110.

Gen-ID	Länge	Produkt	Start	Stop	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_0001	109 AS	DNA Methylase N-4/N-6 (partiell)	348	19	<i>Chlorobium limicola</i> DSM 245	<i>Chlorobi</i>	69
tRNA_07	72 bp	Ile-tRNA (Antikodon: GAU)	590	519	nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	94
POR_r0001	1339 bp	16S rRNA (partiell)	1515	2853	nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	97

Das 16S rRNA-Gen des poribakteriellen Metagenomklons 64K2 umfasst 1.547 Nukleotide (Fieseler *et al.* 2006). Somit fehlen ca. 13 % des 16S rRNA-Gens von ‚contig‘ c00110. Die DNA-Modifikations-Methylase (109 Aminosäuren) scheint ebenfalls nicht vollständig auf dem ‚contig‘ kodiert zu sein. Der Datenbankeintrag des besten Blast-Treffers ist mit 293

Aminosäuren wesentlich größer. Allerdings existieren auch DNA-Modifikations-Methylasen vergleichbarer Größe (z.B. aus *Chloroflexus sp.* Y-400-fl; ZP02987363; 124 Aminosäuren).

4.4.6. Analyse des poribakteriellen Primärmetabolismus

Für die Rekonstruktion von Stoffwechselwegen der Poribakterien wurden die Daten der automatischen Annotation auf ‚KEGG pathways‘ kartiert. Dabei ist zu beachten, dass im Rahmen dieses ‚mappings‘ nur ORFs verwendet wurden, denen automatisch eine EC-Nummer zugewiesen wurde. Somit ist die hier diskutierte Analyse von Stoffwechselwegen als unvollständig anzusehen und soll dazu dienen, einen groben Überblick des poribakteriellen Metabolismus zu verschaffen. Im Folgenden werden einige Stoffwechselwege des Kohlenstoffmetabolismus heterotropher Bakterien (Glykolyse, Pentosephosphatweg, Citratzyklus) ausführlich beschrieben, für die eine manuelle Überprüfung und Erweiterung der automatischen Annotation stattfand. Die Ergebnisse zeigen hierbei deutlich, dass eine rein automatische Annotation ein nur unvollständiges Bild der metabolischen Kapazitäten liefern kann. In keinem der beiden Datensätze nachweisbare, an Stoffwechselwegen beteiligte Enzyme können unterschiedliche Ursachen haben: (i) das entsprechende Gen ist tatsächlich nicht im Genom vorhanden, es handelt sich also um kryptische, nicht funktionsfähige Stoffwechselwege; (ii) die entsprechenden ORFs wurden aufgrund von DNA-Strangbrüchen oder das Auftreten eines ‚bias‘ nicht durch die WGA amplifiziert oder von der 454-Sequenzierung erfasst; (iii) die jeweiligen ORFs wurden fehlerhaft automatisch annotiert; (iv) einzelne Reaktionen könnten durch alternative oder neuartige Enzyme ohne Homologien zu Datenbankeinträgen übernommen worden sein.

Glykolyse

Die Glykolyse (Emden-Meyerhof-Weg) stellt den wichtigsten Abbauweg von Kohlenhydraten im Primärstoffwechsel dar. Die Kartierung der automatisch annotierten 454-Daten auf den KEGG-Stoffwechselweg ko00010 (Glykolyse) lieferte sieben beteiligte ORFs. Die manuelle Überprüfung mit Hilfe des ‚JCoast Observation Search Tools‘ führte zur zusätzlichen Identifizierung von drei weiteren ORFs. Lediglich vier, der an der Glykolyse beteiligten Enzyme konnten in keinem der beiden Datensätze identifiziert werden (Hexokinase, 6-Phosphofruktokinase, Triose-phosphat Isomerase, Phosphoglycerat Kinase).

Eine Übersicht über die Glykolyse und der daran beteiligten Enzyme ist in Abbildung 4-25 wiedergegeben.

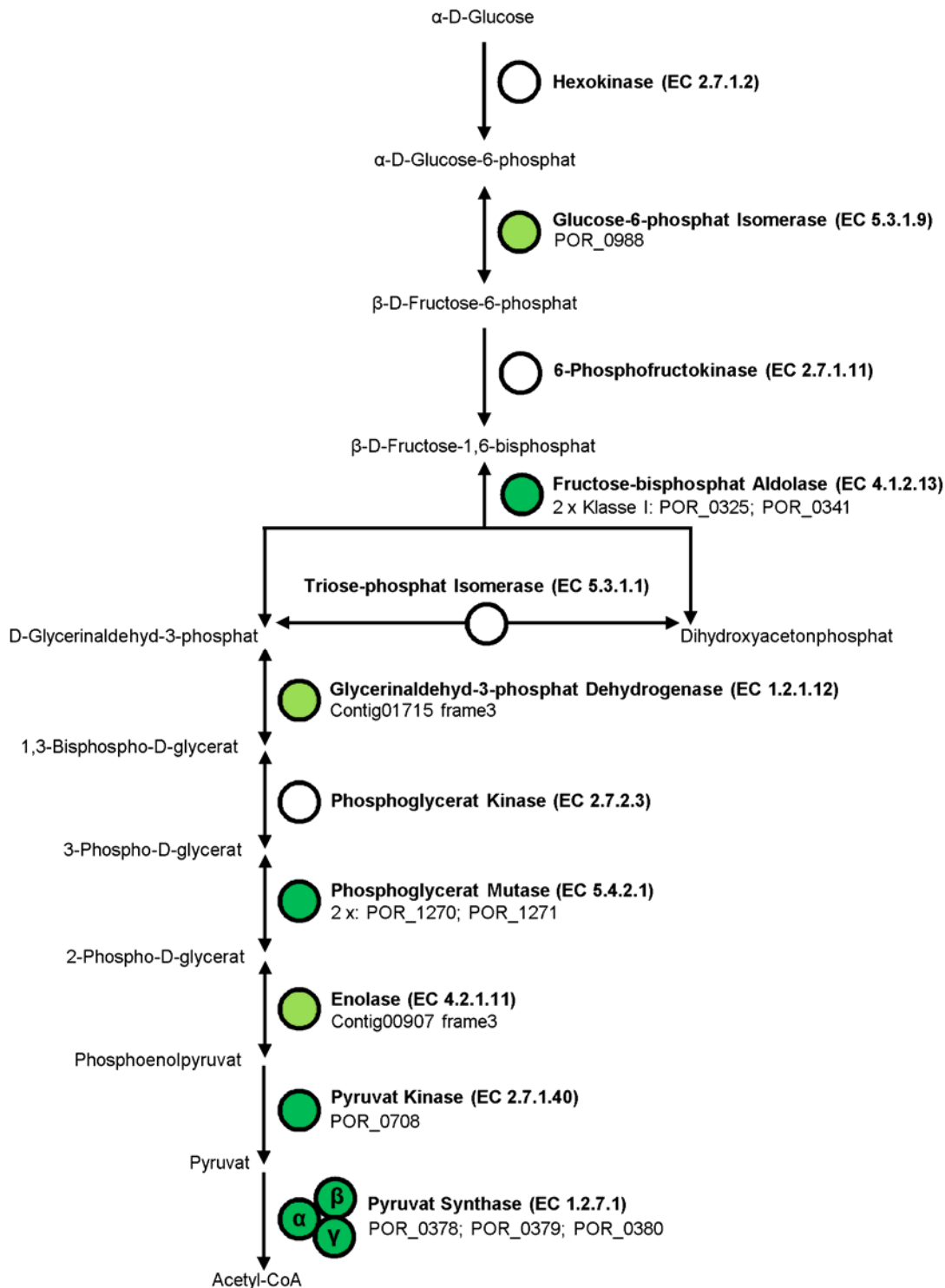


Abb. 4-25: Schematische Darstellung der Glykolyse. Angegeben sind neben den Substraten die jeweiligen Enzyme, deren EC-Nummern sowie die ORF-Identifikation, bzw. die Bezeichnung der ‚contigs‘ mit jeweiligem Leseraster bei Teilfragmenten. Weiße Kreise: Enzyme, die in keinem der beiden Datensätze identifiziert werden konnten; dunkelgrüne Kreise: Enzyme, die über die automatische Annotation identifiziert wurden; hellgrüne Kreise: Enzyme, die zusätzlich durch manuelle Überprüfung der Annotation gefunden wurden.

Pentosephosphatweg

Der Pentosephosphatweg (Hexosemonophosphatweg; Transaldolase- / Ketolase-Weg; Phosphogluconatweg) stellt einen alternativen glykolytischen Stoffwechselweg dar, der in erster Linie der Produktion von Reduktionsäquivalenten in Form von NADPH/H⁺ dient. Zusätzlich können die intermediär gebildeten Pentosen für die Nukleotidbiosynthese genutzt werden. Insgesamt konnten vier der sechs am Pentosephosphatweg beteiligten Enzyme in einem der beiden 454-Datensätze nachgewiesen werden. Die Gene für die Transaldolase und die Ribose-5-phosphat Isomerase liegen benachbart auf einem DNA-Fragment. In Abbildung 4-26 ist ein Überblick über den Pentosephosphatweg mit den daran beteiligten Enzymen dargestellt.

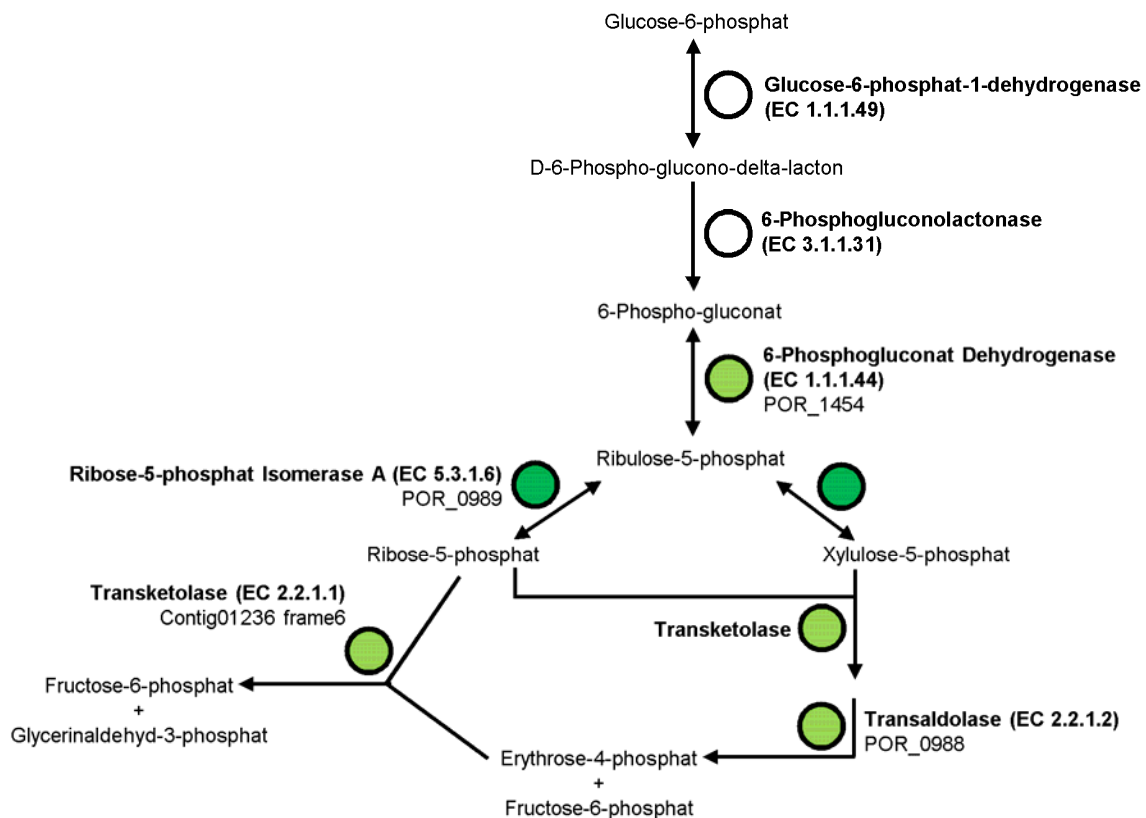


Abb. 4-26: Schematische Darstellung des Pentosephosphatwegs. Angegeben sind neben den Substraten die jeweiligen Enzyme, deren EC-Nummern sowie die ORF-Identifikation, bzw. die Bezeichnung der ‚contigs‘ mit jeweiligem Leseraster bei Teilfragmenten. Weiße Kreise: Enzyme, die in keinem der beiden Datensätze identifiziert werden konnten; dunkelgrüne Kreise: Enzyme, die über die automatische Annotation identifiziert wurden; hellgrüne Kreise: Enzyme, die zusätzlich durch manuelle Überprüfung der Annotation gefunden wurden.

Citratzyklus

Der Citratzyklus (Trikarbonsäurezyklus; Krebs-Zyklus) ist der zentrale Kreislauf des Primärmetabolismus. Er dient in erster Linie dem oxidativen Abbau organischer Stoffe, die meist in Form von Acetyl-CoA in den Zyklus eingespeist werden. Zusätzlich liefert der Citratzyklus Zwischenprodukte für eine Vielzahl von Biosynthesen. Mit Ausnahme der Citrat Synthase konnten alle beteiligten Enzyme in einem der beiden poribakteriellen 454-Datensätze nachgewiesen werden. Die beiden Untereinheiten der Succinyl-CoA Hydrolase werden von zwei benachbarten Genen desselben DNA-Fragments kodiert. Eine Übersicht über den Citratzyklus und der daran beteiligten Enzyme ist in Abbildung 4-27 wiedergegeben.

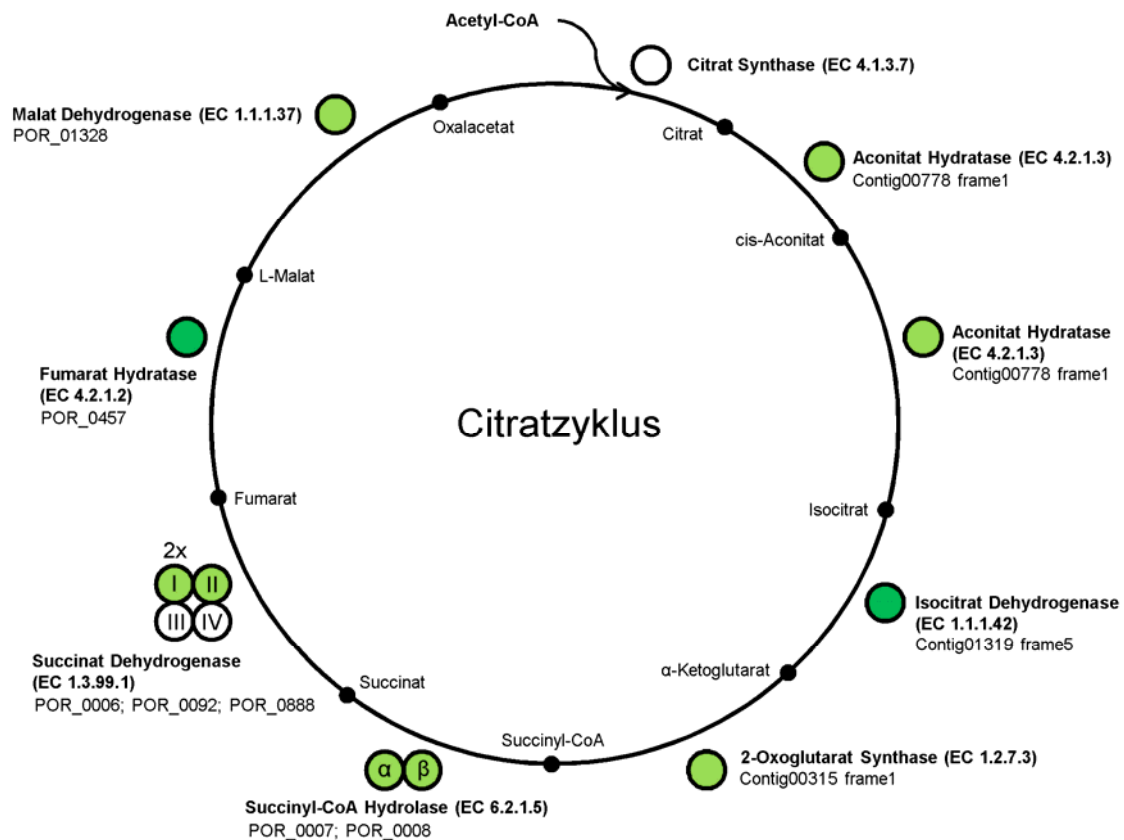


Abb. 4-27: Schematische Darstellung des Citratzyklus. Angegeben sind neben den Substraten die jeweiligen Enzyme, deren EC-Nummern sowie die ORF-Identifikation, bzw. die Bezeichnung der ‚contigs‘ mit jeweiligem Leseraster bei Teilfragmenten. Weiße Kreise: Enzyme, die in keinem der beiden Datensätze identifiziert werden konnten; dunkelgrüne Kreise: Enzyme, die über die automatische Annotation identifiziert wurden; hellgrüne Kreise: Enzyme, die zusätzlich durch manuelle Überprüfung der Annotation gefunden wurden.

Weitere Stoffwechselwege des Primärmetabolismus

Basierend auf der automatischen Annotation und des ‚mappings‘ von EC-Nummern auf ‚KEGG pathways‘ konnte eine Vielzahl bakterieller Stoffwechsel- und Biosynthesewege identifiziert werden. Eine vollständige Auflistung von ‚KEGG pathways‘ sowie der daran beteiligten Enzyme mit EC-Nummern ist im Anhang (Kapitel 8.8) wiedergegeben. Dabei ist jedoch generell zu beachten, dass zahlreiche Enzyme multifunktional sind, d.h. bei unterschiedlichen Stoffwechselwegen involviert sein können. So ließe z.B. die Kartierung von automatisch annotierten EC-Nummern den Rückschluss zu, dass Poribakterien zur CO₂-Fixierung (‚KEGG pathways‘ ko00710 und ko00720) befähigt sein könnten. Eine genauere Betrachtung der beteiligten Enzyme zeigte jedoch, dass diese allesamt ebenfalls an einer Reihe anderer Stoffwechselwege beteiligt sind. Dieses Beispiel veranschaulicht deutlich die Notwendigkeit der manuellen Überprüfung von automatischen Annotationen.

Im Folgenden soll eine kurze Auswahl von Stoffwechselwegen des bakteriellen Primärmetabolismus wiedergegeben werden, welche durch die automatische Annotation aufgedeckt wurden. Die Identifizierung des Ubiquinon / Quinon Systems (EC: 1.6.5.3 und EC: 1.6.99.5) sowie einer anorganischen Diphosphatase (EC: 3.6.1.1) lässt auf das Vorhandensein der oxidativen Phosphorylierung (ko00190) schließen. Ebenso wurden zahlreiche Enzyme der Purin- und Pyrimidinbiosynthese gefunden (ko00230 und ko00240). Desweiteren wurden Enzyme identifiziert, die an der Aminoacyl-tRNA Biosynthese beteiligt sind (ko00970), so z.B. die Alanin-tRNA Ligase, die Arginin-tRNA Ligase, die Aspartat-tRNA Ligase sowie die Histidin-tRNA Ligase. Außerdem deuten die Daten darauf hin, dass Poribakterien zumindest einen Großteil der essentiellen Aminosäuren selbst synthetisieren können. So konnte Enzyme gefunden werden, die an folgenden Biosynthesewegen beteiligt sind: Valin, Leucin und Isoleucin Biosynthese (ko00290), Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan Biosynthese (ko00400) sowie Lysin Biosynthese (ko00300). Insgesamt betrachtet deuten die Ergebnisse der Kartierung von ‚KEGG pathways‘ darauf hin, dass Poribakterien einen autonomen Stoffwechsel besitzen. Jedoch kann aufgrund der lückenhaften Genomsequenz eine mögliche Auxotrophie nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4.4.7. Analyse des poribakteriellen Sekundärmetabolismus

Der Sequenzabgleich mit der COG-Datenbank führte zur Identifikation von insgesamt 63 Genen, die mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziiert sind (siehe Tabelle 4-13). Dazu zählen unter anderem diverse Resistenzgene (z.B. gegen Acriflavin), eine Reihe von Glycosyl- und Methyltransferasen, sowie eine Polyketidzyklase. Im folgenden Kapitel soll explizit auf die vorgefundenen Polyketidsynthasen sowie deren genomischen Kontext eingegangen werden.

Sup-PKS

Bereits das PCR-,Screening‘ der amplifizierten genomischen DNA von ‚well‘ A3 konnte das Vorhandensein einer Ketosynthase- (KS-) Domäne von Polyketidsynthasen im poribakteriellen Genom bestätigen. Dieses Ergebnis konnte zusätzlich durch die Pyrosequenzierung verifiziert werden. Insgesamt wurden dabei neun Genfragmente mit Homologien zum SupA-PKS-Gen identifiziert (Abb. 4-28; Tabelle 4-19). Zusammengenommen decken diese ca. 45 % des 10,3 kb großen SupA-Gens ab. Contig c00478 kodiert neben der AT-Domäne der Sup-Polyketidsynthase noch ein Rieske- (2 Fe - 2 S) Domänen Protein, das vermutlich an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt ist. Homologe dieses Gens konnten jedoch in keinem der bereits beschriebenen SupA-kodierenden Metagenomklone identifiziert werden.

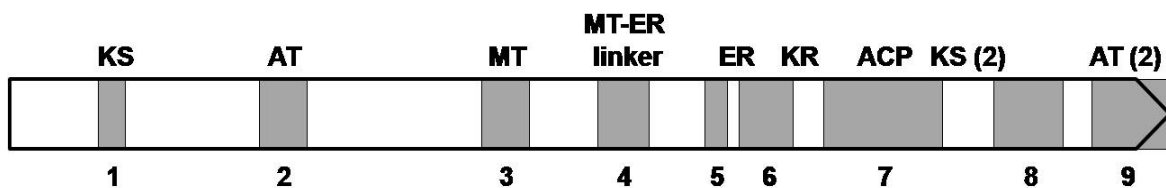


Abb. 4-28: Maßstabsgetreue Darstellung des 10 kb großen SupA-Gens von Metagenomklon pSW1H8 aus *Theonella swinhoei* sowie der neun homologen Genfragmente des 454-Datensatzes aus *Aplysina aerophoba* (graue Blöcke). Angegeben sind ferner die Domänen, welche durch die 454-Sequenzierung abgedeckt wurden. Abkürzungen der funktionellen Domänen: KS: β -Keto-Acyl Synthase; AT: Acyl-Transferase; MT: Methyltransferase; ER: Enoyl Reduktase; KR: β -Keto Reduktase; ACP: Acyl-Carrier-Protein.

Tabelle 4-19: Vergleich der SupA-Genfragmente des 454-Datensatzes mit *supA* von pSW1H8. Angegeben sind die Abkürzungen der jeweiligen funktionellen Domänen sowie deren Abdeckung unter Angabe der Nukleotidpositionen.

Fragment	Lokus	Domäne	Identität	Abdeckung	E-Wert
1	c01436 frame4	KS	73%	817-1053	2,0E-23
2	c00839 frame4	AT	68%	2233-2664	1,0E-47
3	c01240 frame1	MT	75%	4228-4662	6,0E-48
4	c01654 frame2	MT-ER Linker	66%	5263-5724	4,0E-45
5	c01213 frame6	ER	83%	6229-6432	3,0E-24
6	c01512 frame3	ER-KR	78%	6517-7011	8,0E-70
7	c00502 frame6	ACP-KS(2)	68%	7282-8346	2,0E-122
8	c00663 frame3	KS(2)	63%	8803-9423	4,0E-63
9	POR_0183 c00478	AT(2)	51%	9676-10344	6,0E-41

Neben den SupA-Genfragmenten konnten zusätzlich ‚contigs‘ identifiziert werden, die Homologien zu weiteren Sup-Genen aufweisen (Tabelle 4-20). Diese wurden ursprünglich im genomischen Kontext des SupA-Gens von Metagenomklonen aus marinen Schwämmen gefunden (Fieseler *et al.* 2007). Dazu zählen SupD, welches Ähnlichkeiten zu Enzymen der α,β -Hydrolase Superfamilie aufweist, sowie SupE, bei dem es sich vermutlich um eine Permease handelt. Die beiden SupD-Fragmente wiesen dabei höchste Ähnlichkeiten zum Metagenomklon pSW1H8 auf, der aus dem marinen Schwamm *Theonella swinhoei* stammt (Fieseler *et al.* 2007). Der beste BLASTp-Treffer aller fünf SupE-Fragmente hingegen ist der Metagenomklon pAPKS18 aus *Aplysina aerophoba* (Fieseler *et al.* 2007).

Desweiteren wurden drei weitere ORFs gefunden, die Homologien zu SupA-kodierenden Metagenomklonen aufweisen. POR_0797 weist eine 44%ige Identität zu einem putativen LuxR-ähnlichen Transkriptionsregulator des *Aplysina aerophoba* Klons pAE27P20 (Fieseler *et al.* 2007) auf. POR_1407 besitzt eine 30%ige Identität mit SupC des *Theonella swinhoei* Klons pSW1H8. SupC ist homolog zu 5'-Phosphopantetheinyl Transferasen, die an der Konversion von Apo-Acyl-Carrier-Proteinen zu Holo-Proteinen beteiligt sind. POR_1542 zeigt Homologien zu einer Sulfatase des *Aplysina aerophoba* Klons pAPKS18 auf (50 % Identität). Insgesamt konnten so neben den SupA-Genfragmenten weitere Gene bzw. Genfragmente des Sup-Genclusters im poribakteriellen 454-Datensatz aufgedeckt werden, welche möglicherweise an der Biosynthese des Polyketids beteiligt sind.

Tabelle 4-20: Genfragmente des 454-Datensatzes mit Homologien zu *supD* (921 bp) des *Theonella swinhoei* Klons pSW1H8 und *supE* (1.749 bp) des *Aplysina aerophoba* Klons pAPKS18. Angegeben ist der beste BLASTp-Treffer, die Abdeckung unter Angabe der Nukleotidpositionen sowie die Identität auf Aminosäureebene.

Lokus	bester BLASTp Treffer	Identität	Abdeckung
Contig01777 frame4	SupD	75%	133-294
Contig01801 frame3	SupD	62%	496-912
Contig00844 frame1	SupE	63%	25-228
Contig00490 frame5	SupE	61%	424-786
Contig00883 frame5	SupE	56%	817-1260
Contig00755 frame1	SupE	66%	1009-1407
Contig01053 frame3	SupE	61%	1504-1731

Typ I Polyketidsynthase WcbR

Zusätzlich zum Sup-PKS-System konnte ein weiteres PKS-Gencluster im poribakteriellen 454-Datensatz identifiziert werden. Der rund 26 kb umfassende Contig c00157 kodiert insgesamt 17 Proteine, von denen mindestens vier an der Synthese eines Polyketids beteiligt sind (Abb. 4-29; Tabelle 4-21). Die beiden benachbarten ORFs POR_547 und POR_548 weisen Homologien zu WcbR Polyketidsynthasen vom Typ I auf. Diese Enzyme werden in *Nitrosomonas europaea* und *Burkholderia thailandensis* von nur einem Gen kodiert, das folgende Domänenstruktur aufweist: β -Keto-Acyl Synthase, Acyl-Transferase, Dehydratase, Enoyl Reduktase, β -Keto Reduktase, Acyl-Carrier-Protein (KS-AT-DH-ER-KR-ACP). Die WcbR Polyketidsynthase des 454-Datensatzes hingegen scheint von zwei ORFs kodiert zu werden. Dabei konnten alle Domänen identifiziert werden, mit Ausnahme des Acyl-Carrier-Proteins (ACP). Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass ACP-Domänen nicht essentiell für die Polyketid-Synthese sind (Pereda *et al.* 1998). POR_0549 gehört zur sog. ‚radical SAM‘ Superfamilie, welche an der Biosynthese zahlreicher Antibiotika beteiligt sind und weist Homologien zu Methyltransferasen auf. Somit ist denkbar, dass neben SupA auch dieses Gencluster an der Biosynthese von methylverzweigten Fettsäuren beteiligt ist. Erstaunlicherweise besitzt POR_0550 Ähnlichkeiten zu eukaryontischen Typ I Fettsäuresynthase-Genen und zeichnet sich durch den Besitz einer Dehydrogenasen-Domäne aus, welche u.a. bei multifunktionalen NRPS-Genen eine wichtige Rolle einnimmt. Interessanterweise weist POR_0548 ebenfalls Homologien zu Polyketidsynthasen auf, die im marinen Schwamm *Discodermia dissoluta* nachgewiesen wurden (Schirmer *et al.* 2005).

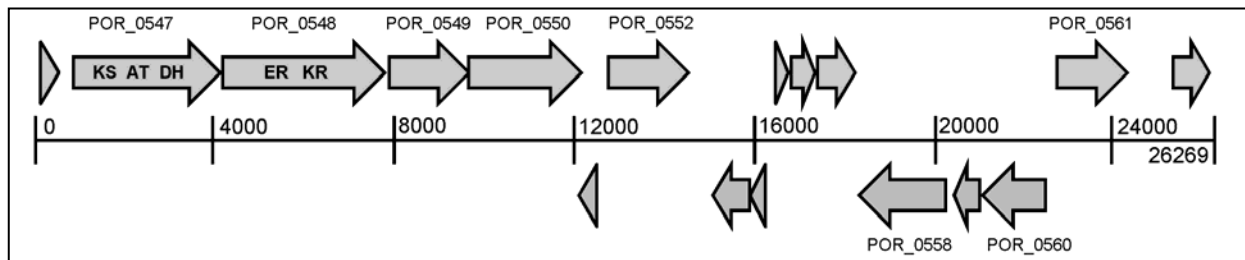


Abb. 4-29: Physikalische Genkarte des 26 kb umfassenden Contigs c00157. Dargestellt ist die Domänenarchitektur der beiden Polyketidsynthese-Gene POR_0547 und POR_0548. Abkürzungen: KS: β -Keto-Acyl Synthase; AT: Acyl-Transferase; DH: Dehydratase; ER: Enoyl Reduktase; KR: β -Keto Reduktase.

Tabelle 4-21: Identifizierte Gene des Contigs c00157. Angegeben sind die korrespondierenden besten Treffer der BLASTp-Analyse.

Gen-ID	Länge [AS]	Produkt	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_0546	94	Unnamed protein product	<i>Tetraodon nigroviridis</i>	(Eukaryota)	39
POR_0547	1127	Putative Typ I Polyketidsynthase WcbR	<i>Nitrosomonas europaea</i> ATCC 19718	Proteobacteria	32
POR_0548	1228	Putative Typ I Polyketidsynthase WcbR	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264	Proteobacteria	34
POR_0549	582	Radical SAM Domänen Protein	<i>Desulfococcus oleovorans</i> Hxd3	Proteobacteria	44
POR_0550	835	Putative Typ I Fettsäuresynthase	<i>Toxoplasma gondii</i> RH	(Eukaryota)	35
POR_0551	87	Protein unbekannter Funktion DUF1499	<i>Chlorobium ferrooxidans</i> DSM 13031	Chlorobi	47
POR_0552	584	Sulfat Adenylyltransferase, große Untereinheit	<i>Thauera</i> sp. MZ1T	Proteobacteria	54
POR_0553	250	Klasse I Glutamin Amidotransferase Familien Protein	<i>Myxococcus xanthus</i> DK 1622	Proteobacteria	39
POR_0554	134	Transkriptionsregulator, ICIR Familie	<i>Rhodococcus</i> sp. RHA1	Actinobacteria	40
POR_0555	56	Twin-Arginin Translokations Protein, TatA/E Familie	<i>Geobacter sulfurreducens</i> PCA	Proteobacteria	60
POR_0556	184	Polyprotein	Virus	--	37
POR_0557	283	Prognostiziertes Signaltransduktions-Protein mit Nacht-Domäne	<i>Anabaena variabilis</i> ATCC 29413	Cyanobacteria	37
POR_0558	665	TrkA-N: TrkA-C: Natrium/Wasserstoff Austauscher	<i>Geobacter</i> sp. FRC-32	Proteobacteria	45
POR_0559	207	Isopropylmalat Isomerase, kleine Untereinheit	<i>Psychrobacter</i> sp. PRwF-1	Proteobacteria	54
POR_0560	467	Isopropylmalat Isomerase, große Untereinheit	<i>Methylobacillus flagellatus</i> KT	Proteobacteria	69
POR_0561	540	COG0517: FOG: CBS Domäne	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	Cyanobacteria	27
POR_0562	293	Exporter der RND Superfamilie	<i>Beggiatoa</i> sp. PS	Proteobacteria	40

Diese Studie erlaubte erstmalig Einblicke in den Sekundärmetabolismus des Candidatus Phylums *Poribacteria*. Die Auswertung der 454-Sequenzierung verifizierte nicht nur den poribakteriellen Ursprung der Sup-Polyketidsynthasen, sondern konnte weitere PKS-Systeme identifizieren. Die funktionelle Charakterisierung dieser Synthasen, die Aufklärung deren Substrate und Endprodukte sowie die Bewertung einer möglichen biotechnologischen Relevanz werden die Themen zukünftiger Forschung darstellen.

5. Diskussion

5.1. Kultivierung Schwamm-assoziiertes Bakterien mittels ‚dilution-to-extinction‘

Die Mikroorganismensammlung der ‚Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH‘ (DSMZ) umfasst derzeit Vertreter von mehr als 1.400 bakteriellen Gattungen (Quelle: http://www.dsmz.de/microorganisms/bacteria_catalogue.php). Zudem wurden bislang mehr als 800 mikrobielle Genome vollständig sequenziert (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=genome>). Dem gegenüber stehen allein über 70 Candidatus Phyla innerhalb der Eubakterien (Quelle: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?name=Eubacteria>), die aufgrund des Fehlens eines kultivierbaren Vertreters nur unzulänglich beschrieben sind. Waren im Jahr 1987 noch zwölf bakterielle Phyla bekannt, sind es heute bereits über 100 (Achtman und Wagner 2008). Zu den Phyla ohne kultivierte Repräsentanten zählt auch das Schwamm-spezifische Candidatus Phylum *Poribacteria*.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten mit Hilfe einer neuen, auf dem ‚dilution-to-extinction‘-Prinzip beruhenden Kultivierungs-Strategie Mitglieder des Schwamm-spezifischen Konsortiums kultiviert werden. Das Hauptaugenmerk dieser Studie lag dabei auf den Poribakterien. Im Verlauf von zwei Experimenten wurden insgesamt 3.840 ‚wells‘ im Hochdurchsatz-Verfahren auf mikrobielles Wachstum hin getestet. Trotz extensiver Inkubationsphasen von bis zu zehn Monaten, oligotropher Wachstumsbedingungen und Ausdünnung des Inokulums gelang es jedoch nicht, einen Vertreter der *Poribacteria* oder ein anderes Mitglied des Schwamm-spezifischen Konsortiums in Reinkultur zu gewinnen. Phylogenetische Klassifizierungen konnten zeigen, dass der Großteil an Isolaten den α -Proteobakterien, gefolgt von den *Bacteroidetes* zugehörig ist. Mitglieder dieses Phylums zählen zu den häufigsten Mikroorganismen in marinen Küstengewässern und tragen dort wesentlich zur Degradation komplexer und polymerer organischer Verbindungen bei (Alonso *et al.* 2007). BLASTn-Analysen konnten einen marinen Ursprung für ca. 75 % aller gewonnenen Isolate ausmachen. Darunter zählen neben pelagischen Bakterien auch Isolate, die bereits aus marinen Schwämmen oder Korallen isoliert wurden. Daher scheint die Mehrheit der gewonnenen Isolate Meerwasserbakterien zu repräsentieren, welche in den Schwamm eingestrudelt wurden. Sämtliche Isolate wiesen eine mehr als 95%ige Homologie innerhalb des 16S rRNA-Gens zu Datenbankeinträgen bereits kultivierter Bakterien auf.

Somit konnte auch innerhalb der gewonnenen *Bacteroidetes*-Isolate keine neue Art postuliert werden. Die Medienkomposition zeigte keinerlei Korrelation mit dem Wachstum von *Bacteroidetes*-Isolaten. Ferner konnten sämtliche Isolate auf das nährstoffreiche Zobell-Medium transferiert werden. Aus diesen Gründen liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den gewonnenen Isolaten um keine obligat oligotrophen Spezialisten, sondern um Generalisten handelte. Lediglich die Art des Inokulums schien einen Einfluss auf die Kultivierungs-Effizienz zu haben. Während unter der Verwendung von Kryo-SAPs im ersten Versuchsdurchgang nur 0,3 % aller ‚wells‘ positiv auf mikrobielles Wachstum hin getestet worden waren, konnte die Kultivierungsrate unter Verwendung von frischem Schwammmaterial ohne Kryolagerung der SAPs um den Faktor sechs gesteigert werden (auf 1,8 %). Offensichtlich ist ein Teil der SAPs trotz Zugabe von Glycerin nach Lagerung bei -80 °C nicht überlebensfähig. Die prinzipiell sehr geringe Ausbeute an Isolaten ist jedoch generell mit der sog. ‚great plate count anomaly‘ (Staley und Konopka 1985) konform, welche die große Diskrepanz zwischen der eigentlichen Zellzahl in einer Umweltprobe und den daraus erhaltenen Kolonien auf Kultivierungsmedien beschreibt. In der Regel sind weniger als 1 % aller Umweltbakterien unter Standard-Laborbedingungen kultivierbar (Amann *et al.* 1995).

In den letzten Jahren wurden verstärkt Anstrengungen unternommen, um diesen Anteil durch das Angleichen von *in vivo* und *in vitro* Bedingungen zu erhöhen (Nichols 2007, sowie darin zitierte Referenzen). Dazu zählen auch Strategien, welche im Rahmen dieser Studie verfolgt wurden, so die Verwendung von oligotrophen Medien, die Ausdünnung des Inokulums und extensive Inkubationsphasen. Die Notwendigkeit der Verwendung von Minimalmedien zur Anpassung an die natürlichen Lebensbedingungen wird z.B. an der Kultivierung des obligat oligotrophen, zur SAR11 Klade gehörigen, Candidatus *Pelagibacter ubique* ersichtlich. Diese α -proteobakterielle Klade ist wesentlicher Bestandteil mikrobiellen Planktons und kann nicht in der Gegenwart von Konzentrationen organischen Kohlenstoffs kultiviert werden, welche sich in den meisten Standardmedien finden (Giovannoni und Stingl 2007). Gelöster organischer Kohlenstoff liegt im Meerwasser in Konzentrationen von meist unter 1 mg / l vor, wohingegen das marine Zobell-Medium eine 170-fache Menge davon beinhaltet.

Generell wird die Kultivierung Schwamm-assoziiierter Bakterien durch das unvollständige Wissen über Habitat und metabolisches Potential der darin lebenden Bakterien erschwert. So ist weder die Darreichungsform, noch die erforderliche Konzentration von Nährstoffen, Vitaminen und Cofaktoren bekannt, welche das Wachstum von Schwamm-assoziierten

Bakterien in Kultur fördern würde. Ferner kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Wachstum von Schwammsymbionten von Zellsignal-Komponenten abhängig ist. So konnte bereits für marine Bakterien die Kultivierungseffizienz durch Zugabe von ‚quorum sensing‘-Signalmolekülen gesteigert werden (Bruns *et al.* 2002). Andere Bakterien konnten nur durch Co-Inkubation mit anderen, in Diffusionskammern befindlichen Bakterien in Reinkultur gewonnen werden (Kaeberlein *et al.* 2002). Diese sog. ‚Helferstämme‘ können in etwa durch die Sekretion kurzer Peptide dazu beitragen, bislang nicht-kultivierbare Bakterien zu domestizieren (Nichols *et al.* 2008). Die extrem hohen bakteriellen Zelldichten im Mesohyl mariner Schwämme lassen zumindest eine generelle Bedeutung von Zell-Zell-Interaktionen, sezernierten Wachstumsfaktoren oder anderen, allgemeinen Synergismen vermuten. Sogenannte ‚autoinducer‘-Moleküle sind dabei nicht auf innerartliche Kommunikation beschränkt, sondern können ebenso der Interaktion zwischen verschiedenen Arten dienen (Henke und Bassler 2004). Derartige Wechselwirkungen könnten auch bei der, im Rahmen dieser Doktorarbeit erhaltenen Mischkultur aus Vertretern der Phyla *Deinococcus/Thermus* und *Proteobacteria* eine Rolle gespielt haben. Obligate Synergismen könnten zudem das Auftrennen dieser Mischkultur in die jeweiligen Reinkulturen verhindert haben.

In der Mikrobiologie stellt die Kultivierung trotz aller Schwierigkeiten den ‚Goldstandard‘ zur detaillierten Studie von Bakterien dar. Reinkulturen können dabei nicht nur der Genomsequenzierung dienen, sondern erlauben auch physiologische und biochemische Analysen des zu untersuchenden Isolats. Die Kultivierungs-unabhängige Metagenomik hingegen erlaubt i.d.R. nur physiologische und biochemische Rückschlüsse basierend auf der erhaltenen Sequenzinformation. Nur selten können einzelne Genome innerhalb eines komplexen Metagenoms geschlossen werden. Grund hierfür ist u.a. die auftretende genomische Mikroheterogenität, welche selbst bei Bakterien mit identischen 16S rRNA-Genen auftritt (Welch *et al.* 2002, Hahn und Pockl 2005, Davelos Baines *et al.* 2007). Selbst wenn intensive Sequenzierungsanstrengungen zum Schließen des Genoms führen, können typischerweise 40 % der Proteine keinerlei Funktionen zugeordnet werden. Jedoch können von der Metagenomik abgeleitete Daten zum bakteriellen Stoffwechsel herangezogen werden, um geeignete Nährmedien für bislang nicht-kultivierte Bakterien zu kreieren. Auch in Zukunft müssen kultivierungs-unabhängige Studien durch neue Kultivierungsstrategien komplementiert werden, da nur durch ein Zusammenspiel beider Konzepte ein vollständiges Bild über die Physiologie von Bakterien aus komplexen mikrobiellen Konsortien erhalten werden kann.

5.2. Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Mikroorganismen mittels FACS

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte parallel zu Kultivierungsstrategien die kultivierungsunabhängige Methode der ‚whole genome amplification‘ (WGA) zur genomischen Charakterisierung einzelner Schwammsymbionten angewendet werden. Dafür wurde das mikrobielle Konsortium des Schwamms *Aplysina aerophoba* zunächst einer FACS-Analyse unterzogen, um vereinzelte Schwamm-assoziierte Bakterien zu gewinnen. Zellvereinzelungsstudien mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden bereits erfolgreich an Bakterioplankton durchgeführt (Stepanauskas und Sieracki 2007), ihre Anwendung für die Charakterisierung von einzelnen Bakterien aus dem hochkomplexen mikrobiellen Konsortium mariner Schwämme ist jedoch neu.

Die Ergebnisse zeigen deutlich das hohe Potential FACS-basierter Techniken für die Charakterisierung einzelner Schwamm-assoziiierter Bakterien. Die Durchflusszytometrie erlaubte die Auftrennung der hochdiversen mikrobiellen Lebensgemeinschaft aus *A. aerophoba*. Dadurch konnten einzelne bakterielle Phylotypen Einzelzell-basierten Studien zugänglich gemacht werden. Ferner können diese FACS-basierten Studien herangezogen werden, um Aussagen zur Quantität bestimmter Bakteriengruppen innerhalb des Konsortiums zu treffen. So konnte während des ersten WGA-Versuchs in ca. 25 % aller ‚wells‘ mit FACS-sortierten Schwammbakterien ein poribakterielles 16S rRNA-Gen detektiert werden. Diese Ergebnisse sind konsistent mit früheren FISH-Experimenten, mit deren Hilfe die Poribakterien auf ca. 30 % des mikrobiellen Konsortiums aus *A. aerophoba* geschätzt wurden (Fieseler 2005). Zusammengenommen zeigen beide Studien, dass es sich bei den *Poribacteria* um hochabundante Vertreter der Schwamm-assoziierten Mikroflora handelt.

Die FACS-Analyse von ‚sponge associated prokaryotes‘ (SAPs) aus der Außenschicht des Schwamms (Cortex) offenbarte eine autofluoreszente, abundante Population, die bei SAPs aus dem Kernbereich des Schwamms fehlte. Cyanobakterien sind ein verbreiteter Bestandteil der mikrobiellen Konsortien mariner Schwämme und bilden mehrere monophyletische, Schwamm-spezifische Cluster (Hentschel *et al.* 2002, Taylor *et al.* 2007). Die dominierende Gruppe Schwamm-spezifischer Cyanobakterien stellt die Gattung *Synechococcus* dar (Erwin und Thacker 2008). Die Anregung mit einem 488 nm Argonlaser resultiert bei Cyanobakterien in einer grünen (515-545 nm) und orangen (564-606 nm) Fluoreszenz, welche in erster Linie durch Phycoerythrin verursacht werden. Zusätzlich ist dabei rote Fluoreszenz (> 670 nm) zu beobachten, die vor allem aus der Anregung von Chlorophyll

resultiert (Collier und Palenik 2003). Die autofluoreszente Population der Cortex-SAPs wies alle drei Fluoreszenzeigenschaften auf, was für das Vorhandensein von *Synechococcus* spricht, da diese z.B. im Gegensatz zu *Prochlorococcus* Phycoerythrin besitzen (Toledo *et al.* 1999). Die Autofluoreszenzeigenschaften von marinen Cyanobakterien wurden bereits für die spezifische FACS-Anreicherung von *Synechococcus*-Zellen genutzt, um das Metagenom dieser Population zu sequenzieren (Palenik *et al.* 2009). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführten FACS-Analysen bestätigen, dass Schwamm-assoziierte Cyanobakterien in erster Linie den licht-exponierten Außenbereich des Schwamms besiedeln, das Mesohyl des Schwamms hingegen weitestgehend frei von diesen autofluoreszenten Zellen ist.

Generell zeigte sich ein Unterschied zwischen Kryo-SAPs und frisch isolierten SAPs bezüglich der Effizienz an Einzelzell-Sortierungen. Unter Verwendung von Kryo-SAPs für die FACS-Sortierung wurden keine Einzelzellen gewonnen, wohingegen frisch isolierte und umgehend weiterverarbeitete SAPs zur gewünschten Vereinzelnung führten. Abbildung 5-1 zeigt dabei die Effizienz der FACS-Vereinzelnung von Schwamm-assoziierten Bakterien anhand von RFLP-Studien.

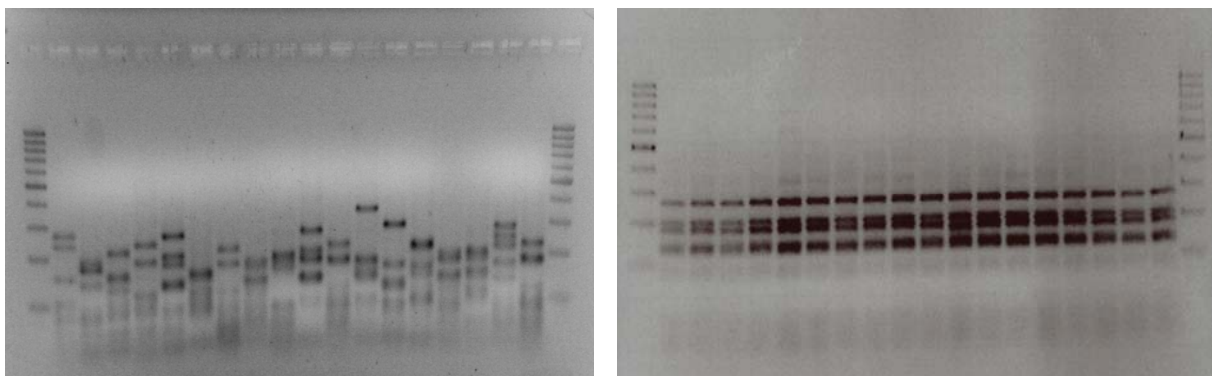


Abb. 5-1: Veranschaulichung der Effizienz von FACS-Sortierungen. Dargestellt ist die Auswertung von RFLP-Analysen klonierter 16S rRNA-Genfragmente (Primer 27f/1492r). Als ‚template‘ für die PCR diente eine SAP-Fraktion (linke Teilabbildung) bzw. die amplifizierte genomische DNA eines FACS-vereinzelteten Schwamm-assoziierten *Chloroflexi* (rechte Teilabbildung). Deutlich erkennbar ist die 16S rDNA-Diversität in der Schwammbakterienfraktion. Demgegenüber steht eine einzelne ‚operational taxonomic unit‘ (OTU) nach erfolgreicher Zellvereinzelnung.

Vermutlich trägt der Zusatz von Glycerin zur Kryolagerung von SAPs zusätzlich zur Zellaggregation bei, welche selbst durch ausgiebiges Waschen nicht vollständig aufgelöst werden können. Ein vergleichbares Bild zeigt sich ebenfalls vermehrt bei ‚fluorescent *in situ* hybridization‘ (FISH-) Experimenten (Abb. 5-2). Die extrem hohen Zelldichten innerhalb des Schwamm-spezifischen Konsortiums lassen zudem starke Zell-Zell-Interaktionen sowie

Adhäsionen vermuten, die selbst durch die Zugabe von Calcium- und Magnesium-freiem Meerwasser nicht vollständig aufgelöst werden können.

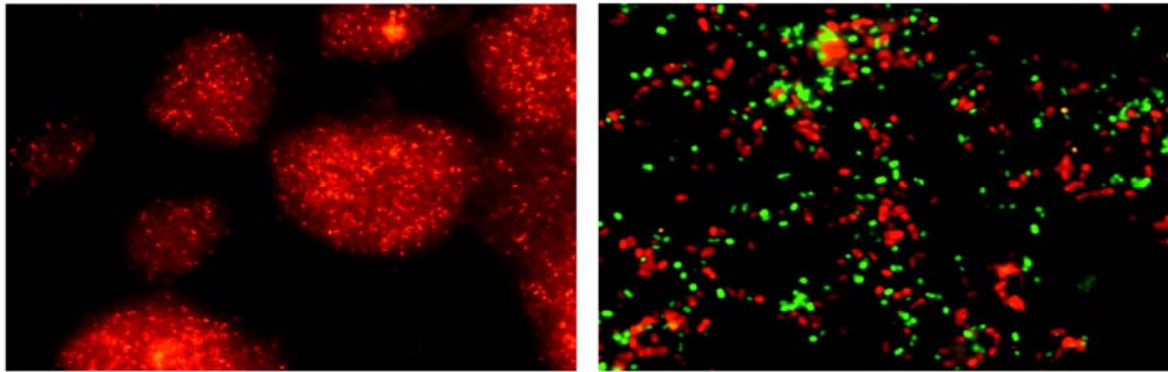


Abb. 5-2: Fluoreszenzmikroskopie von SAPs aus *A. aerophoba* nach einem etablierten Protokoll (Fieseler 2005). In der linken Teilabbildung sind die mikrobiellen Zellaggregate deutlich erkennbar. Verwendet wurde die Cy3-markierte Poribakterien-spezifische Sonde POR1130 (beide Abbildungen), sowie die FITC-markierte *Chloroflexi*-spezifische Sonde GNS934 (rechte Teilabbildung; aus Fieseler *et al.* 2004).

Neben dem Auftreten von Zellaggregaten treten bei der FACS-Sortierung von Schwamm-assoziierten Bakterien weitere methodische Limitierungen auf. So sind FACS-Geräte prinzipiell für die Analyse von Eukaryontenzellen konzipiert, welche einen in etwa zehnfach größeren Durchmesser einnehmen als Schwammbakterien. Aus diesem Grund ist bei der FACS-Sortierung von ca. 1 μm großen Bakterien verstärkt mit Streulichtphänomenen zu rechnen. Dabei stößt die Menge des gestreuten Lichts (FSC und SSC) bei sehr kleinen Partikeln an die Auflösungsgrenze der Detektoren. Normalerweise kommen für die Durchflusszytometrie fluoreszenz-markierte Antikörper zum Einsatz, welche zur Signalverstärkung beitragen und die FACS-Sortierung bestimmter Zellpopulationen ermöglichen. Allerdings sind derzeit keine spezifischen Antikörper gegen phylogenetische Gruppen Schwamm-spezifischer Bakterien verfügbar. Zwar sind diverse FISH-Sonden mit verschiedenen Spezifitäten erhältlich, allerdings schränkt die Verwendung von dafür nötigen Fixantien nachfolgende molekulare Arbeiten stark ein (Wallner *et al.* 1997). Ferner erlaubt die Kombination von FISH und FACS nur die Anreicherung von Populationen, welche sich aufgrund genomischer Heterogenität stark unterscheiden können (z.B.: Palenik *et al.* 2009). Aus diesen Gründen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit Schwamm-assoziierte Bakterien unspezifisch vereinzelt, um einzelne bakterielle Phylotypen detailliert zu beschreiben. Die erfolgreiche FACS-Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Bakterien legte den Grundstein für Einzelzell-basierte Studien. Die Gesamt-Genom-Amplifizierung einzelner Schwammsymbionten sowie die Ergebnisse der weiterführenden Anwendungen (Cosmidklonierung, Pyrosequenzierung) werden in den nachfolgenden Kapiteln diskutiert.

5.3. Die Cosmidbank WGA-A4

Ein erster Versuch der FACS-Vereinzelung von Schwamm-assoziierten Bakterien in Kombination mit ‚whole genome amplifications‘ (WGAs) führte zum Erhalt von amplifizierter genomischer DNA zweier Schwamm-spezifischer Bakterien in ‚well‘ A4. Phylogenetische Analysen zeigten, dass es sich hierbei um ein Mitglied der *Chloroflexi* zusammen mit einem Vertreter der *Poribacteria* handelte. Deren amplifizierte Genome dienten der Konstruktion der Cosmidbank WGA-A4, welche aus über 8.000 Klonen besteht. PCR-, Screenings‘ der Cosmidbank führten zur Identifizierung und Komplet-Sequenzierung von drei Klonen, dem *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen tragenden Klon 1i19, dem Sup-PKS kodierenden Klon 1k6 und dem Lub-NRPS-Gen tragenden Klon 1n22.

Aufgrund des Fehlens von kultivierten Repräsentanten des Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortiums wurde zur funktionellen Charakterisierung von Schwammbakterien in den letzten Jahren verstärkt auf die kultivierungs-unabhängige Metagenomik gesetzt. Speziell bei hochgradig diversen Lebensgemeinschaften tritt jedoch meist das Problem auf, dass sich über die Metagenomik identifizierte funktionelle Gene nur phylogenetisch zuordnen lassen, wenn der jeweilige Klon zusätzlich einen phylogenetischen Marker (z.B. die 16S rRNA) kodiert. Diese Studie an FACS-vereinzelten, nicht-kultivierten Bakterien erlaubte hingegen erstmalig die gezielte Verknüpfung von Phylogenie und Funktion. Die Klonierung von amplifizierter genomischer DNA in Cosmide erlaubte zudem weitreichende Einblicke in den genomischen Kontext von Genen, die mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziiert sind.

Die Arbeit mit einzelnen Chromosomen als Matrize für Gesamt-Genom-Amplifizierungen birgt jedoch trotz des großen Potentials einige methodische Limitierungen. Zu diesen zählen in erster Linie der bei allen DNA-Amplifizierungen auftretende ‚bias‘, sowie der Verlust an genomischer Information durch DNA-Strangbrüche, aber auch mögliche DNA-Kontaminationen und das Problem der Chimärenbildung durch die strangverdrängende Eigenschaft der phi29-Polymerase (Lasken und Stockwell 2007). Der Verlust an genomischer Information durch eine nicht gleichmäßig über das gesamte Chromosom verlaufende Amplifizierung (‚bias‘) wurde bereits von Raghunathan und Kollegen (2005) anhand von WGA-Produkten vereinzelter *E. coli*-Zellen beobachtet. Zusätzlich führen DNA-Strangbrüche, welche während der Einzelzell-Lyse auftreten können, zu einem zunehmenden Verlust an genetischer Information während des WGA-Prozesses. Etwaige chromosomale

Lücken vergrößern sich bei jeder Runde der milliardenfachen Amplifizierung, da zunehmend potentielle Primerbindestellen verloren gehen. Aus diesem Grund darf bei einem negativ verlaufenden ‚screening‘ von WGA-Produkten nicht automatisch darauf geschlossen werden, dass der zu untersuchende Organismus das entsprechende Gen nicht besitzt. Neben dem Amplifizierungs-‚bias‘ können zudem weitere ‚bias‘-Ereignisse bei der Klonierung von WGA-Produkten auftreten. So wurde in dieser Studie ein poribakterielles 16S rRNA-Gen im Amplikon von WGA-A4 detektiert, allerdings konnte später kein entsprechender Klon in der Cosmidbank WGA-A4 identifiziert werden. Generell kann beim Arbeiten mit einzelnen Bakterienzellen eine Kontamination mit Fremd-DNA, so z.B. extrazellulär vorliegende DNA, nicht vollständig ausgeschlossen werden. Allerdings wurde in dieser Studie das Risiko durch folgende Maßnahmen minimiert: (i) Arbeiten unter möglichst sterilen Bedingungen, (ii) Reduzierung des Reaktionsvolumens während der WGA, (iii) PCR-‚Screening‘ der Amplikons mit Hilfe von rDNA-spezifischen Primern verschiedener Spezifität (Eukaryonten 18S rDNA; Eubakterien 16S rDNA; Poribakterien 16S rDNA; Archaeen 16S rDNA). Das größte, im Rahmen der Cosmidklonierung von WGA-Produkten auftretende Problem stellte jedoch die Bildung von chimären Sequenzen durch die Verwendung der phi29-Polymerase dar. Hierbei ist die phi29-vermittelte Amplifizierung als eine Art nicht-kontrollierte DNA-Replikation aufzufassen. Trotz diverser Enzymbehandlungen wiesen alle drei komplettsequenzierten Cosmide Chimären auf. Generell ist die bei WGAs am häufigsten auftretende Chimärenart das intramolekulare ‚rearrangement‘ in Form von ‚inverted repeats‘ (Lasken und Stockwell 2007). Dies scheint auch bei den in dieser Studie klonierten WGA-Produkten der Fall gewesen zu sein, was zu erheblichen Problemen bei der Assemblierung der Sequenzierungsdaten führte. Letztlich konnten diese Artefakte in Form von Sequenzwiederholungen im Rahmen der Insert-Rekonstruktion manuell entfernt werden.

Die eben genannten methodischen Schwierigkeiten von Einzel-Genom-Amplifizierungen bedürfen weiterer Optimierung im Rahmen zukünftiger Studien. Dennoch offenbarte diese Arbeit das große Potential von Einzelzell-basierten Experimenten und ermöglichte erstmalig die Klonierung von hochmolekularen WGA-Produkten in Cosmide. Dieser Ansatz erlaubte die Verknüpfung von Phylogenie und Funktion Schwamm-assoziiierter Bakterien. Die Ergebnisse der phylogenetischen Zuordnung der beiden, mit dem bakteriellen Sekundärmetabolismus assoziierten Gene *sup*-PKS und *lub*-NRPS werden in den folgenden Kapiteln diskutiert.

5.3.1. Lub-NRPS und *Chloroflexi*

Die Cosmidbank WGA-A4 wurde mit der amplifizierte, genomischen DNA von zwei phylogenetisch distinkten Schwamm-assoziierten Bakterien, einem Poribakterium und einem *Chloroflexi* konstruiert. Daher konnte der Ursprung der von Cosmidklon 1n22 kodierten nicht-ribosomalen Peptidsynthetase vom Lub-Typ zunächst nicht eindeutig geklärt werden. Im Verlauf weiterer WGAs mit anschließenden PCR-, Screenings konnte jedoch ‚well‘ B6 identifiziert werden, das exklusiv amplifizierte genomische DNA eines *Chloroflexi* der TK23-Klade enthielt. Poribakterielle 16S rDNA konnte in diesem ‚well‘ nicht nachgewiesen werden. Dieses Amplikon wurde jedoch positiv auf das Vorhandensein eines Lub-NRPS-Gens getestet. Somit belegen diese Ergebnisse, dass tatsächlich ein Schwamm-spezifischer Vertreter der *Chloroflexi* TK23-Klade das Lub-NRPS-System kodiert.

Stromaufwärts des NRPS-Gens wird eine Effluxpumpe kodiert, welche höchstwahrscheinlich für den Export des Synthetase-Endprodukts zuständig ist. Aus einer Metagenombank des Schwamms *A. aerophoba* wurden bereits zwei überlappende Fosmidklone sequenziert, die ebenfalls ein Lub-NRPS-Gen beherbergen (Grozdanov *et al.* in Vorbereitung). Dieses besitzt die gleiche Domänenarchitektur wie das NRPS-Gen von Cosmidklon 1n22 und wird ebenfalls von einem Effluxpumpen-Gen flankiert. Der restliche genomische Kontext des rund 60 kb großen ‚contigs‘ zeigte jedoch keine weiteren Gemeinsamkeiten mit dem in dieser Studie untersuchten Cosmidklon 1n22.

Eine Reihe weiterführender Sequenzanalysen sollte dazu dienen, die im Rahmen dieser Arbeit vollzogene Verknüpfung von *Chloroflexi* und Lub-NRPS zusätzlich zu untermauern. Der GC-Gehalt des NRPS-kodierenden Cosmidklons 1n22 (59,7 %) stimmt in etwa mit dem des *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen tragenden Cosmidklons 1i19 (58,1 %), sowie dem durchschnittlichen GC-Gehalt des *Chloroflexi* Subphylums *Caldilinea* (59,0 %; Sekiguchi *et al.* 2003) überein. Die Schwamm-spezifische TK23-Klade ist diesem Subphylum zugehörig. Die einzig verfügbare poribakterielle Referenz zu Beginn dieser Doktorarbeit stellt der aus *A. aerophoba* stammende Metagenomklon 64K2 dar (AY713479; Fieseler *et al.* 2006). Das rund 39 kb umfassende Fosmidinsert besitzt einen GC-Gehalt von 50,5 % und liegt somit deutlich darunter. Die Analyse der Verwendung von Tetranukleotiden ließ aufgrund niedriger Korrelationswerte keine eindeutige Zuordnung zu (Tabelle 5-1). Hierbei wurde neben den drei Cosmidklonen 1i19 (*Chloroflexi* 16S rRNA), 1n22 (NRPS) und 1k6 (PKS) auch der Metagenomklon 64K2 als poribakterielle Referenzsequenz verwendet (AY713479; Fieseler *et*

al. 2006). Die höchste Korrelation an Tetranukleotidfrequenzen wurde zwischen dem *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen tragenden Klon 1i19 und dem NRPS-Gen tragenden Klon 1n22 festgestellt (0,47; Abb. 5-3). Allerdings kann der festgestellte Koeffizient nur als schwaches Indiz für eine Korrelation zwischen *Chloroflexi* und NRPS gedeutet werden. Generell ist jedoch zu beachten, dass sowohl GC-Gehalt, als auch Tetranukleotid-Frequenzen innerhalb eines Genoms variieren können. Die Verwendung des bioinformatischen Online-Programms ‚PhyloPythia‘ (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/phylopythia.html>) lieferte keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich des phylogenetischen Ursprungs des Cosmidklons 1n22 (NRPS). Hierbei war nur eine Zuordnung bis auf die Domänenebene der Bacteria möglich.

Tabelle 5-1: Ergebnisse der vergleichenden Tetranukleotidfrequenz-Analyse. Angegeben sind die Korrelationen zwischen den drei sequenzierten Cosmidklonen dieser Studie sowie dem poribakteriellen Metagenomklon 64K2 (AY713479; Fieseler *et al.* 2006). Je größer der Wert (max. 1), desto ähnlicher ist die Verwendung von Tetranukleotiden. In fett dargestellt ist der höchste hierbei gefundene Korrelations-Koeffizient.

	1i19 (<i>Chloroflexi</i> 16S rRNA)	1k6 (PKS)	1n22 (NRPS)	64K2 (<i>Poribacteria</i> 16S rRNA)
1i19	1	0,21942	0,47328	0,15539
1k6	0,21942	1	0,19303	0,08662
1n22	0,47328	0,19303	1	0,16841
64K2	0,15539	0,08662	0,16841	1

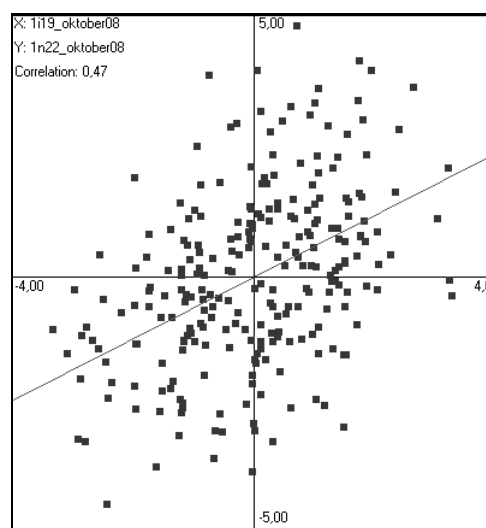


Abb. 5-3: Korrelations-Plot der Verteilung von Tetranukleotiden bei den beiden Cosmidklonen 1i19 (*Chloroflexi* 16S rRNA) und 1n22 (NRPS).

Die Analyse des von Cosmidklon 1n22 (NRPS) kodierten ABC-Transporter-Operons sollte ebenfalls zur Verifizierung der Hypothese dienen, dass dieser Klon von einem Vertreter der *Chloroflexi* abstammt. Ob dieser ABC-Transporter indirekt an der nicht-ribosomalen Peptidsynthese beteiligt ist, in etwa durch den Transport von Substraten, bleibt zu untersuchen. Für das Substrat-Bindeprotein des ABC-Transporters wurde eine Transmembran-Domäne vorhergesagt (Abb. 5-4). Eine Verankerung des Substrat-Bindeproteins ist nur bei Bakterien mit einer Gram-positiven Zellwand nötig. Bei einer Gram-negativen Bakterienzelle liegt das Substrat-Bindeprotein frei im Periplasma vor. Vertreter des *Chloroflexi* Subphylums *Caldilinea* sind jedoch als Gram-negativ beschrieben worden (Sekiguchi *et al.* 2003). Allerdings sind auch Gram-positive Vertreter der *Chloroflexi* bekannt, so z.B. die Gattungen *Oscillochloris* und *Sphaerobacter*. Ferner sind bislang alle Vertreter der *Caldilinea* als thermophile multizelluläre Filamente beschrieben worden (Sekiguchi *et al.* 2003). Diese Eigenschaften dürften für die Schwamm-Klade nicht zutreffen, da mikroskopische Studien nicht für das Vorhandensein von filamentösen Bakterien innerhalb des Schwammkonsortiums sprechen. Somit ist denkbar, dass sich die TK23-Klade morphologisch wesentlich von den bereits beschriebenen *Caldilinea* unterscheidet.

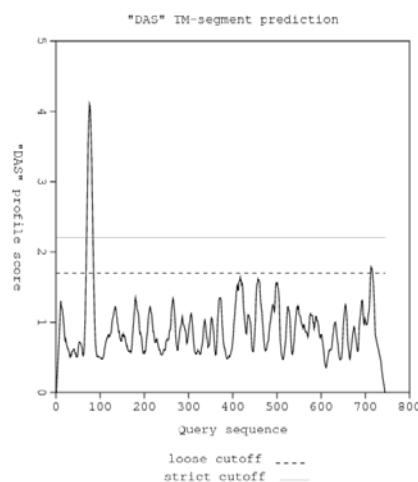


Abb. 5-4: *In silico* Analyse des von 1n22 kodierten Substrat-Bindeproteins basierend auf einer „DAS transmembrane prediction“-Untersuchung (Cserzo *et al.* 1997). Die Ergebnisse konnten mit dem TMHMM Server bestätigt werden und sagen eine alpha-helikale Transmembrandomäne voraus. Dieser, ca. 20 Aminosäuren umfassende Bereich wird durch den ‚peak‘ im Graphen wiedergegeben und dient als Membran-Anker für das insgesamt 744 Aminosäuren lange Protein. Der Hauptteil des Proteins liegt im Periplasma vor und ist direkt an der Substratbindung beteiligt.

Das Gram-Färbeverhalten der Poribakterien ist bislang nicht beschrieben worden. Lediglich durch die moderate phylogenetische Verwandtschaft mit den Planktomyceten kann auf eine Peptidoglykan-freie Zellwand geschlossen werden. Ferner wird spekuliert, dass das PVC-Superphylum, welches auch die *Poribacteria* beinhaltet, ursprünglich von einem Gram-

negativen Vorfahren abstammt (Wagner und Horn 2006). Aufgrund fehlender Information über die Zellwandbeschaffenheit von Poribakterien und Vertretern der *Chloroflexi* TK23-Klade konnte die *in silico* Analyse des Substrat-Bindeproteins nicht dazu dienen, die Verknüpfung von *Chloroflexi* und Lub-NRPS weiter zu untermauern. Allerdings belegt diese Studie, dass die NRPS-kodierende Zelle eine Gram-positive Zellwand ohne Periplasma aufweist.

Derzeit ist nur wenig über den Sekundärmetabolismus von Vertretern des bakteriellen Phylums *Chloroflexi* bekannt. Zwar wurden bereits hunderte bakterielle Genome auf das Vorhandensein von PKS- und NRPS-Genen hin untersucht (Donadio *et al.* 2007), allerdings sind Vertreter der *Chloroflexi* dabei nicht berücksichtigt worden. Bislang sind keine *Chloroflexi*-NRPS-Sequenzen in der NCBI-Datenbank abgelegt. Somit konnte diese Studie erstmalig zeigen, dass Vertreter dieses Phylums nicht-ribosomale Peptidsynthetasen kodieren können. Jedoch scheint ein gemeinsames Charakteristikum von gleitenden Bakterien das Vorhandensein von PKS- sowie NRPS-Genen zu sein (Nett und König 2007). Zu diesen zählen neben Vertretern der *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* und *Cyanobacteria* auch Mitglieder der *Chloroflexi*.

Über das mögliche Endprodukt der phylogenetisch distinkten nicht-ribosomalen Peptidsynthetase vom Lub-Typ kann nur spekuliert werden, da dieses Cluster keine NRPS-Systeme kultivierter Bakterien beinhaltet. Die Substrate der beiden Adenylierungsdomänen konnten ebenfalls nicht eindeutig geklärt werden. Denkbar ist jedoch, dass Lub-NRPS an der Biosynthese von Siderophoren oder Alkaloiden beteiligt ist.

Der beste Treffer der BLASTp-Analyse ist tatsächlich ein Enzym, das an der Siderophor 2,3-dihydroxybenzoat (DHB) Synthese beteiligt ist. *Stigmatella aurantiaca* (Phylum *Myxobacteria*) synthetisiert über ein NRPS-System in mehreren Reaktionsschritten aus Lysin und 2,3-Dihydroxybenzoat die Siderophore Myxochelin A und B (Silakowski *et al.* 2000, Gaitatzis 2004). Interessanterweise produzieren Vertreter der Gattung *Herpetosiphon* (Phylum *Chloroflexi*) eine dem Myxochelin strukturell sehr ähnliche Substanz (Abb. 5-5; Nett und König 2007). Da die Adenylierungsdomäne 2 des auf Cosmidklon 1n22 kodierten NRPS-Systems eine Spezifität für Aminosäuren mit positiv geladenen Seitenketten (z.B. Lysin) hat, ist durchaus denkbar, dass das von Cosmidklon 1n22 kodierte Lub-NRPS-System für die Synthese eines Myxochelin-ähnlichen Stoffes verantwortlich ist.

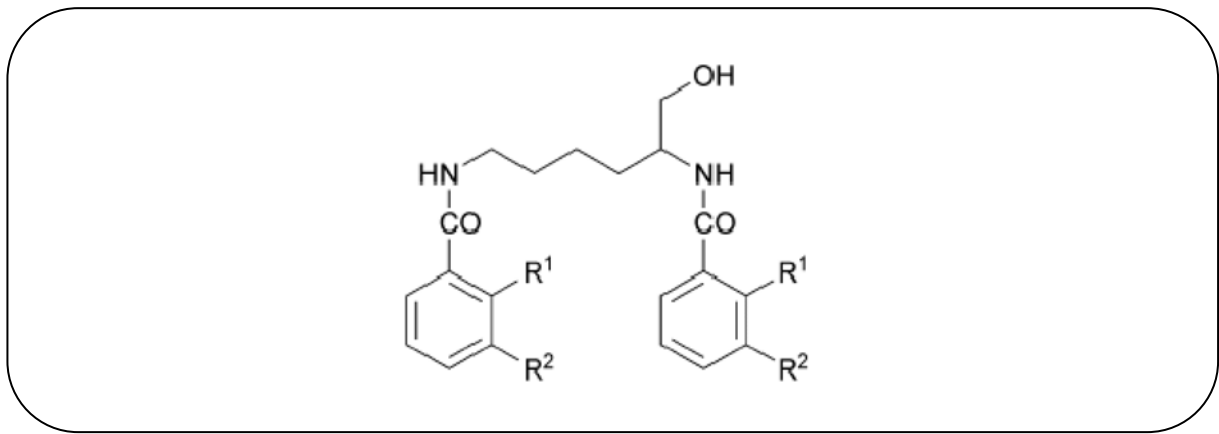


Abb. 5-5: Chemische Struktur des myxobakteriellen Siderophors Myxochelin A ($R^1=OH$, $R^2=OH$) bzw. seines strukturellen Homologs aus *Herpetosiphon* ($R^1=H$, $R^2=F$). Abbildung aus Nett und König (2007).

Die Adenylierungsdomäne 1 des von Cosmidklon 1n22 kodierten Lub-NRPS-Systems hat eine Spezifität für Aminosäuren mit aromatischen Seitenketten (u.a. Tyrosin). Interessanterweise sind etliche, von Tyrosin abgeleitete bromierte Alkaloide aus *Aplysina aerophoba* und anderen Verongida-Schwämmen bekannt (Abb. 5-6; Thoms *et al.* 2006). Diesen Naturstoffen wird dabei eine Funktion beim Schutz der Schwämme vor Fraßfeinden zugewiesen. Prinzipiell ist somit durchaus denkbar, dass das neue NRPS-System vom Lub-Typ für die Biosynthese dieser kurzen Peptide verantwortlich ist. Speziell Aerothionin (Moody *et al.* 1972) könnte ein mögliches Produkt der Synthetase sein, da dieses sowohl aus Tyrosin, als auch aus Lysin aufgebaut ist (Abb. 5-6 C). Die beiden Adenylierungsdomänen des von Cosmidklon 1n22 kodierten NRPS könnten für eben diese Aminosäuren spezifisch sein.

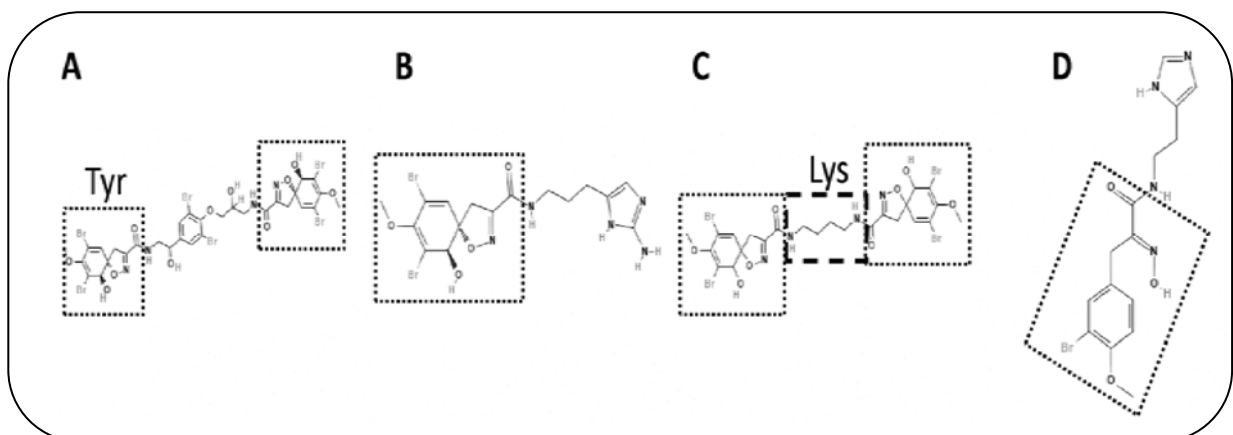


Abb. 5-6: Bromierte Alkaloide der Verongida. A: Isofistularin; B: Aerophobin-1; C: Aerothionin; D: Verongamin. Gepunktet umrahmt sind Tyrosin-Bausteine (Tyr), gestrichelt umrahmt ist der mögliche Lysin-Bestandteil (Lys) des Aerothionins.

Weiterführende Experimente sind jedoch nötig, um die interessanten Hypothesen einer möglichen Beteiligung von Lub-NRPS an Siderophor- bzw. Alkaloidbiosynthese zu überprüfen. Dazu zählt u.a. eine mögliche Bestimmung der Adenylierungsdomänen-Spezifität, welche durch ATP/PP(i)-Austausch Assays klonierter A-Domänen erreicht werden kann (Otten et al. 2007).

Während dieser Doktorarbeit gelang erstmalig die phylogenetische Zuordnung einer nicht-ribosomalen Peptidsynthetase zu einem nicht-kultivierten, Schwamm-spezifischen Vertreter des Phylums *Chloroflexi*. Die Ergebnisse der Cosmidklonierung wurden durch ein PCR-„Screening“ mit WGA-Produkten vereinzelter Schwammbakterien bestätigt. Der fast identische GC-Gehalt sowie die beste Korrelation bezüglich der Verwendung an Tetranukleotiden zwischen dem *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen tragenden Cosmidklon 1i19 und dem NRPS-kodierenden Cosmidklon 1n22 wurden als weitere, wenn auch schwache Indizien bei dieser gezielten funktionellen Zuordnung gewertet. Die Ergebnisse dieser Studie können dabei als Grundlage für eine Vielzahl weiterführender Experimente angesehen werden. PCR-Durchmusterungen amplifizierter Genome von FACS-vereinzelteten Schwammbakterien können in Zukunft auch auf eine Reihe von Schlüsselgenen des bakteriellen Primärstoffwechsels erweitert werden. So konnte bereits im Rahmen einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit gezeigt werden, dass Schwamm-assoziierte *Chloroflexi* der TK23-Klade das genetische Repertoire zur Stickstofffixierung und assimilatorischen Nitratreduktion aufweisen (Stangel 2008). Zusammengenommen belegen die Ergebnisse das große Potential von „whole genome amplification“-basierten Studien für die Charakterisierung von nur unzureichend beschriebenen bakteriellen Taxa, zu denen auch das Phylum *Chloroflexi* zählt.

5.3.2. Sup-PKS und *Poribacteria*

Ebenso wie das Lub-NRPS-System konnte die Sup-Polyketidsynthase zunächst nicht eindeutig phylogenetisch zugeordnet werden, da die Cosmidbank WGA-A4 aus amplifizierter genomischer DNA von zwei phylogenetisch distinkten Bakterien konstruiert wurde. Allerdings konnte im Rahmen von weiteren WGAs ein „well“ identifiziert werden, welches exklusiv die amplifizierte genomische DNA eines Vertreters des Candidatus Phylums *Poribacteria* beinhaltet und ferner positiv auf das Vorhandensein eines Sup-PKS-Gens getestet wurde. Ein *Chloroflexi* 16S rRNA-Gen wurde nicht detektiert. Diese Ergebnisse ließen die Schlussfolgerung zu, dass tatsächlich ein Vertreter der Schwamm-exklusiven

Poribacteria die Sup-Polyketidsynthase kodiert. Das gesamte Amplikon von ‚well‘ A3 wurde einer 454-Sequenzierung unterzogen. Die Annotation führte zur Identifizierung mehrerer Fragmente des Sup-PKS-Gens in den poribakteriellen 454-Daten (vgl. Kapitel 4.4.7.).

Die phylogenetische Zuordnung von Sup-PKS zu den *Poribacteria* sollte zudem, wie bereits für das Lub-NRPS-System beschrieben, durch weitere bioinformatische Analysen bestätigt werden. Da jedoch kein Poribakterien 16S rRNA-Gen tragender Klon in der Cosmidbank WGA-A4 gefunden wurde, diente für die im Folgenden beschriebenen Studien der poribakterielle Referenzklon 64K2 (Fieseler *et al.* 2006) aus dem Metagenom von *A. aerophoba*. Die vergleichende Analyse von GC-Gehalt und Verwendung von Tetranukleotiden zwischen dem Sup-PKS kodierenden Cosmidklon 1k6 und dem poribakteriellen Referenzklon 64K2 konnte jedoch die Verknüpfung von Sup-PKS und *Poribacteria* nicht weiter untermauern. Der GC-Gehalt von Cosmidklon 1k6 liegt bei 64,3 % und ist damit wesentlich höher als der GC-Gehalt von Fosmidklon 64K2 (50,5 %). Allerdings können sowohl GC-Gehalt, als auch Tetranukleotidfrequenzen innerhalb eines Genoms oder innerhalb nahe verwandter Arten stark variieren (Reva und Tummler 2005). Die poribakteriellen 16S rRNA-Gene von Klon 64K2 und aus WGA-A4 besitzen eine 98%ige Identität. Somit ist denkbar, dass die beiden entsprechenden Genome bereits einer gewissen Heterogenität bzgl. GC-Gehalt und Verwendung von Tetranukleotiden unterlegen sind und somit nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Zusätzlich kann spekuliert werden, dass die poribakterielle Sup-Polyketidsynthase ursprünglich durch horizontalen Gentransfer erworben wurde. Das Vorhandensein von Transposasen mit flankierenden ‚inverted repeats‘ sowie der stark schwankende GC-Gehalt von Klon 1k6 lassen dies zumindest vermuten. ‚Phylopythia‘ (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/phylopythia.html>) ordnete Klon 1k6 dem Phylum *Actinobacteria* zu. Da jedoch bislang kaum genomische Information zum Candidatus Phylum *Poribacteria* vorhanden war, sind solche phylogenetischen Einordnungen nur bedingt aussagekräftig. Wiederum gestützt wird die Hypothese des poribakteriellen Ursprungs der Sup-Polyketidsynthasen durch das Vorhandensein eines putativen Transposase-Gens auf dem Sup-PKS kodierenden Cosmidklon 1k6. Das entsprechende Protein besitzt Sequenzhomologien zu einer putativen Transposase (AAW84294), welche vom poribakteriellen Referenzklon 64K2 (Fieseler *et al.* 2006) kodiert wird (Abb. 5-7). Ein weiteres Indiz für einen poribakteriellen Ursprung des Inserts von Cosmidklon 1k6 stellt ein TPR-Domänen-Protein dar, welches ebenfalls vom Sup-PKS-Gen tragenden Klon 1k6 kodiert wird. Interessanterweise konnte im poribakteriellen 454-Datensatz eine Vielzahl an TPR-Proteinen identifiziert werden.

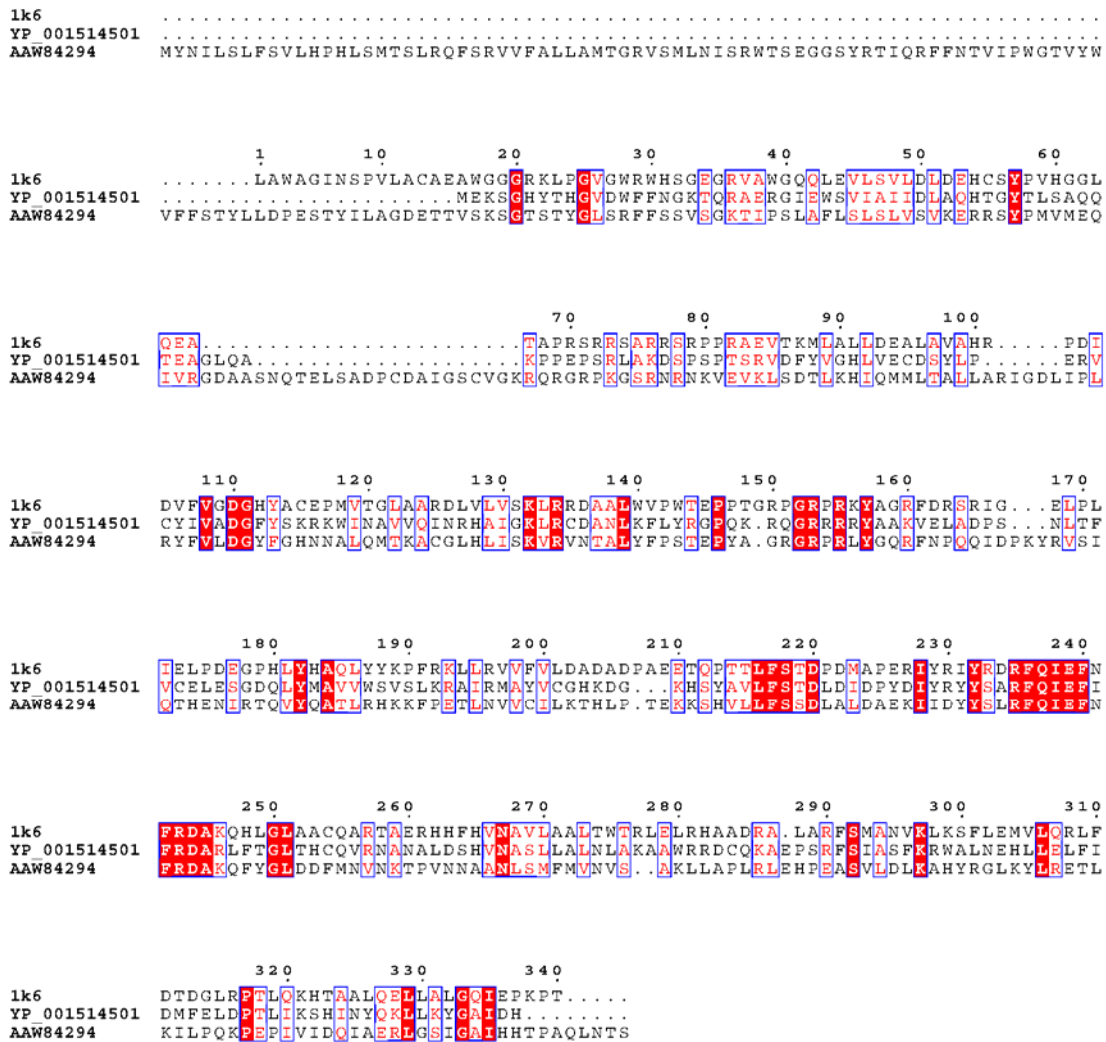


Abb. 5-7: Sequenz-Alignment der putativen Transposasen von Cosmidklon 1k6, dessen besten BLASTp-Hits YP_001514501 (aus *Acaryochloris marina*), sowie des poribakteriellen Homologs AAW84294 (Fieseler *et al.* 2006). Darstellung mittels Online-Tool Esript 2.2 (<http://esript.ibcp.fr/ESript/cgi-bin/ESript.cgi>). Hochkonservierte Aminosäuren sind in roten Blöcken zusammengefasst.

Bis zu Beginn dieser Studie konnten die, exklusiv in marinen Schwämmen gefundenen Sup-Polyketidsynthasen nicht eindeutig bestimmten Bakterien zugeordnet werden. Lediglich die Analyse von *nuo*-Haushaltsgenen führte zu der Vermutung, dass zumindest der aus *Theonella swinhoei* abgeleitete, *supA*-tragende Klon pSW1H8 dem bakteriellen Phylum *Deinococcus/Thermus* zuzuordnen ist (Fieseler *et al.* 2007). Allerdings spekulieren die Autoren dieser Arbeit ebenfalls über einen möglichen Erwerb der Sup-Gene via horizontalen Gentransfer, zumal Vertreter dieses Phylums nicht dem hochkonservierten bakteriellen Konsortium mariner Schwämme zuzurechnen sind (Vgl. Abb. 2-5). Sup-PKS-Gene wurden jedoch in verschiedensten Vertretern der Demospongiae gefunden. Dies lässt prinzipiell vermuten, dass Mitglieder der hochkonservierten Signaturgemeinschaft mariner Schwämme

für dessen Ursprung verantwortlich sind. Zu diesem Konsortium zählt das Candidatus Phylum *Poribacteria*. Als mögliches Endprodukt der Sup-Polyketidsynthesen gelten Methylverzweigte Fettsäuren (Fieseler *et al.* 2007). Gegenwärtig wird eine mögliche Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Poribakterien, Sup-PKS und Methylverzweigten Fettsäuren in diversen Schwammarten untersucht. Der Vergleich zwischen Sup-PKS-Genen aus verschiedenen Schwämmen zeigt deutlich die konservierte Domänenarchitektur auf, wohingegen der genomische Kontext hochvariabel zu sein scheint.

Die Sequenzierung des Sup-PKS-kodierenden Cosmidklons 1k6 belegt eindrucksvoll das große Potential der Kombination aus Zellvereinzellung, ‚whole genome amplification‘ und Cosmidklonierung. Ursprünglich ausgehend von nur einer Kopie des Sup-Gens konnte dieses letztlich komplett über eine Länge von mehr als 10 kb mit angrenzender genomischer Zusatzinformation kloniert werden. Durch die Identifizierung eines weiteren Sup-PKS-Gens im Amplikon einer vereinzelt Poribakterienzelle mit anschließender Pyrosequenzierung konnte die Verknüpfung von Sup-PKS mit dem Candidatus Phylum *Poribacteria* verifiziert werden. Die Studie eines TPR-Proteins sowie einer Transposase wurden als zusätzliche Indizien für den poribakteriellen Ursprung der Sup-Polyketidsynthesen gewertet. Die Analyse von GC-Gehalt und Tetranukleotidfrequenzen zeigte sich für eine weitere Bestätigung als nicht geeignet, da der poribakterielle Metagenomklon 64K2 vermutlich eine ungeeignete Referenz darstellt. Die Studie erlaubte erstmalig eine fundierte phylogenetische Verknüpfung von Sup-Polyketidsynthesen und gewährte erste Einblicke in den Sekundärmetabolismus der nichtkultivierten Poribakterien. Eine Weiterführung dieser Studie stellt die 454-Sequenzierung eines amplifizierten poribakteriellen Genoms dar, dessen Ergebnisse in den folgenden Kapiteln diskutiert werden.

5.4. Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms

Im Rahmen der Pyrosequenzierung eines ‚whole genome amplification‘ Produkts, das von einer FACS-vereinzelten Poribakterien-Zelle abstammte, konnten rund zwei Megabasen an Sequenzinformation über dieses Candidatus Phylum erhalten werden. Der durchschnittliche GC-Gehalt der poribakteriellen ‚contigs‘ lag bei rund 53 % und ist somit dem des poribakteriellen Referenzklons 64K2 (50,5 %; Fieseler *et al.* 2006) sehr ähnlich. Welcher Anteil des poribakteriellen Genoms durch die WGA und die nachfolgende 454-Sequenzierung abgedeckt wurde, bleibt jedoch ungeklärt. Eine Kartierung der Genomgröße mittels ‚optical mapping‘ wurde bereits an einzelnen *Beggiatoa*-Filamenten vorgenommen (Mussmann *et al.* 2007). Jedoch sind diese Filamente um ein vielfaches größer als die Mehrheit des mikrobiellen Schwamm-spezifischen Konsortiums, was eine Vermessung von einzelnen Schwammbakterien-Chromosomen deutlich erschweren dürfte. Zur groben Abschätzung der poribakteriellen Genomgröße wurde daher auf eine Analyse von ‚single copy‘-Genen, Amino-acyl tRNA Synthasen und tRNA-Genen zurückgegriffen. 67 % der 55 untersuchten ‚single copy‘-Gene konnten in einem der beiden 454-Datensätze gefunden werden, keines davon jedoch in mehrfacher Kopie. Dabei ist allerdings zu beachten, dass nicht alle 55 dieser Gene essentiell sind (Mussmann *et al.* 2007). Ferner konnten 14 von 24 (58 %) Amino-acyl tRNA Synthase-Gene (Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Tyr, Val) gefunden werden, keines davon jedoch in doppelter Kopie, was als weiteres Indiz für die Reinheit der poribakteriellen DNA gewertet werden kann. Zusätzlich wurden insgesamt 14 der 20 tRNAs (70 %) für kanonische Aminosäuren identifiziert, manche davon in mehrfacher Kopie (Ala, Arg, Asn, Glu, 2 x Gly, Ile, 3 x Leu, Lys, 2 x Met, Pro, 2 x Ser, Thr, Trp, Tyr). Lediglich für Glutamin konnte weder die entsprechende tRNA noch die tRNA Synthase gefunden werden. Ausgehend von diesen Verhältnissen kann abgeschätzt werden, dass vermutlich 60-70 % des Genoms in dieser Studie abgedeckt wurden. Somit könnte sich die tatsächliche Genomgröße der *Poribacteria* auf mehr als vier Megabasen belaufen. Hierbei handelt es sich allerdings nur um Schätzungen. Daher sind weiterführende Analysen für die Bestimmung der Genomgröße nötig, welche jedoch durch die poribakterielle Zellgröße sowie deren Vorkommen in einem komplexen, nicht-kultivierten mikrobiellen Konsortium erschwert werden.

5.4.1. Das genomische Repertoire der *Poribacteria*

Für rund 25 % der poribakteriellen ORFs konnten keinerlei Homologien zu Datenbankeinträgen ausfindig gemacht werden. Ferner sind ca. 50 % der identifizierten Proteine keiner bestehenden COG-Gruppe zuzuordnen. Dieser hohe Prozentsatz an neuartigen, vollkommen unbeschriebenen Proteinen spiegelt die distinkte phylogenetische Position der *Poribacteria* wider. Ferner sind diese Erkenntnisse konsistent mit genomischen Erstbeschreibungen von Bakterien anderer Phyla (Fraser *et al.* 2000, Glöckner *et al.* 2003). Dadurch bleibt jedoch ein Großteil des metabolischen Potentials der *Poribacteria* zunächst im Verborgenen und wird sicherlich eine Vielzahl von weiterführenden Studien nach sich ziehen. Erste Analysen im Rahmen dieser Doktorarbeit konnten dennoch zeigen, dass Poribakterien einige Stoffwechselwege des zentralen Metabolismus aufweisen. Hierbei konnte ein Großteil an Enzymen aufgedeckt werden, die an Glykolyse, Pentosephosphat-Weg und Citratzyklus beteiligt sind. Desweiteren erlaubte diese Studie erstmalig Einblicke in den poribakteriellen Sekundärmetabolismus. Als wichtigste Erkenntnis hierbei ist die Identifizierung von Sup-Polyketidsynthase-Genfragmenten im poribakteriellen Genom anzusehen.

5.4.2. Vergleich mit dem poribakteriellen Metagenomklon 64K2

Zu Beginn dieser Doktorarbeit war sämtliche genomische Information über das Candidatus Phylum *Poribacteria* von der Sequenzierung eines einzelnen Metagenomklons abgeleitet worden. Das ca. 38 kb große Fosmidinsert von Klon 64K2 beherbergte neben dem poribakteriellen 16S rRNA Gen und einer tRNA insgesamt 29 ORFs (Fieseler *et al.* 2006). Insgesamt konnten innerhalb des poribakteriellen 454-Datensatzes vier ‚contigs‘ (Abb. 5-8) identifiziert werden, die homologe Bereiche zum poribakteriellen Referenzklon 64K2 aufweisen. Wie bereits in Kapitel 4.4.5. beschrieben, kodiert ‚contig‘ c00110 ebenfalls eine poribakterielle 16S rRNA und eine tRNA^{Ile}. Der restliche genomische Kontext ist jedoch nicht mit Fosmidklon 64K2 identisch, was deutlich für eine genomische Mikroheterogenität innerhalb der *Poribacteria* spricht. Das Phänomen von genomischer Mikroheterogenität innerhalb einer Bakterienpopulation derselben Art wurde bereits für *Cenarchaeum symbiosum* beschrieben (Schleper *et al.* 1998). Hierbei konnte eine genomische Varianz zwischen nahe verwandten Phylotypen (> 99 % Identität innerhalb des 16S rRNA Gens) aufgedeckt werden.

Interessanterweise konnten drei weitere ‚contigs‘ identifiziert werden, welche teilweise Übereinstimmungen mit dem Transmembranprotein-Gencluster von Metagenomklon 64K2 aufweisen. Die alternierende Abfolge zweier paraloger Gene innerhalb dieses Clusters bedingt dabei die auftretenden Homologien zu unterschiedlichen Genen. Zusätzlich konnte für ‚contig‘ c00325 ein ORF identifiziert werden, der Homologien zu einem Transposase-Gen von Klon 64K2 aufweist.

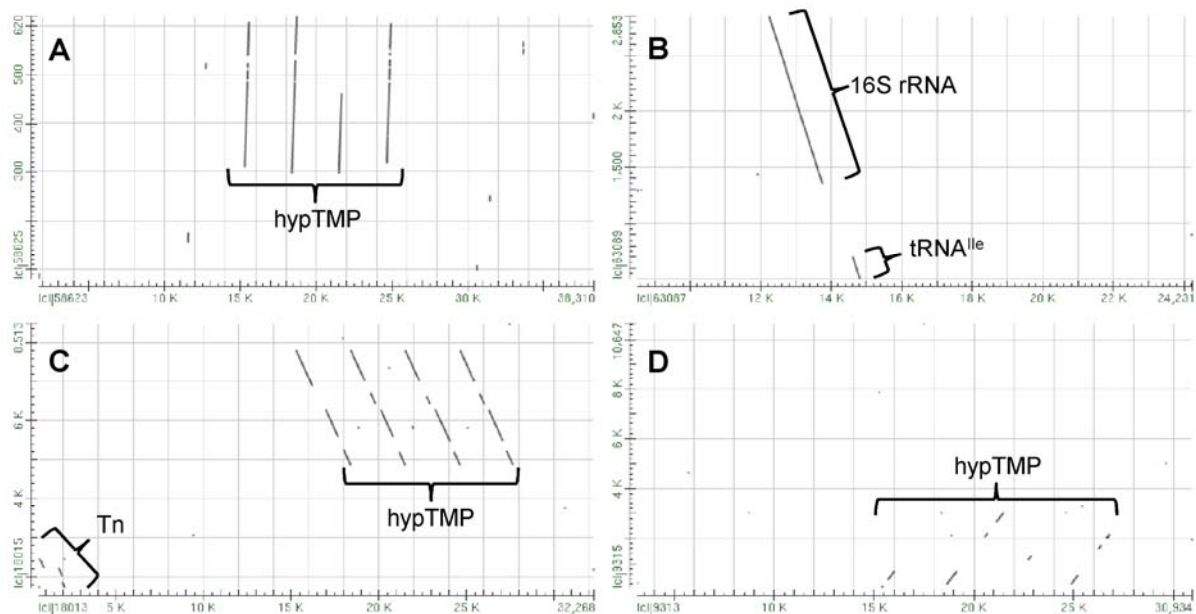


Abb. 5-8: Ergebnisse der ‚Blast 2 Sequences‘-Analyse des poribakteriellen Referenzklons 64K2 mit homologen ‚contigs‘ des 454-Datensatzes. Im Plot sind alignierte homologe Bereiche als Linien dargestellt. Die X-Achse repräsentiert Klon 64K2, auf der Y-Achse sind folgende ‚contigs‘ des poribakteriellen 454-Datensatzes dargestellt: c01903 (A), c00110 (B), c00325 (C), c00342 (D). Plus-Strang-Übereinstimmungen verlaufen von unten links nach oben rechts, Minus-Strang-Übereinstimmungen von oben links nach unten rechts. Die Anzahl an Linien spiegelt die Anzahl an identifizierten Alignments wieder. Abkürzungen: Tn: Transposase; hypTMP: hypothetische Transmembranproteine.

Eine detaillierte Analyse des Poribakterien 16S rRNA-Gen tragenden ‚contigs‘ c00110 erfolgte bereits in Kapitel 4.4.5. In den folgenden Abbildungen und Tabellen sind die allgemeinen Eigenschaften sowie die Analyse der identifizierten ORFs auf den drei verbleibenden ‚contigs‘ mit Homologien zum Fosmidklon 64K2 dargestellt: c01903 (Abb. 5-9; Tabellen 5-2 und 5-3); c00342 (Abb. 5-10; Tabellen 5-4 und 5-5); c00325 (Abb. 5-11; Tabellen 5-6 und 5-7).

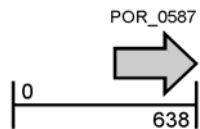


Abb. 5-9: Physikalische Genkarte von ,contig' c01903.

Tabelle 5-2: Allgemeine Eigenschaften von ,contig' c01903.

Contig-ID	Länge [bp]	ORFs	rRNAs	tRNAs	kodierender Bereich [%]
c01903	638	1	0	0	44

Tabelle 5-3: Identifizierter ORF auf ,contig' c01903.

Gen-ID	Länge [AS]	Produkt	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_0587	94	hypothetisches Protein AAW84300	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	65

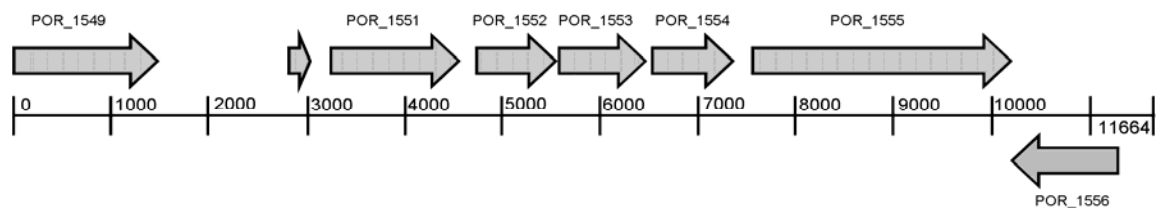


Abb. 5-10: Physikalische Genkarte von ,contig' c00342.

Tabelle 5-4: Allgemeine Eigenschaften von ,contig' c00342.

Contig-ID	Länge [bp]	ORFs	rRNAs	tRNAs	kodierender Bereich [%]
c00342	11664	8	0	0	79

Tabelle 5-5: Identifizierte ORFs auf ,contig' c00342.

Gen-ID	Länge [AS]	Produkt	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_1549	489	Hypothetisches Protein AAW84304	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	49
POR_1550	77	Hypothetisches Protein AAW84303	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	61
POR_1551	444	Thioredoxin Familien Protein	<i>Pedobacter</i> sp. BAL39	<i>Bacteroidetes</i>	34
POR_1552	277	Selenoprotein N, 1	<i>Danio rerio</i>	---	31
POR_1553	290	Alkyl-Hydroperoxid Reduktase	<i>Opitutus terrae</i> PB90-1	<i>Verrucomicrobia</i>	40
POR_1554	274	Hypothetisches Protein GobsU_38508	<i>Gemmata obscuriglobus</i> UQM 2246	<i>Planctomycetes</i>	55
POR_1555	876	LmbE Familien Protein	<i>Solibacter usitatus</i> Ellin6076	<i>Acidobacteria</i>	40
POR_1556	366	Oxidoreduktase Familien Protein	<i>Opitutus terrae</i> PB90-1	<i>Verrucomicrobia</i>	35

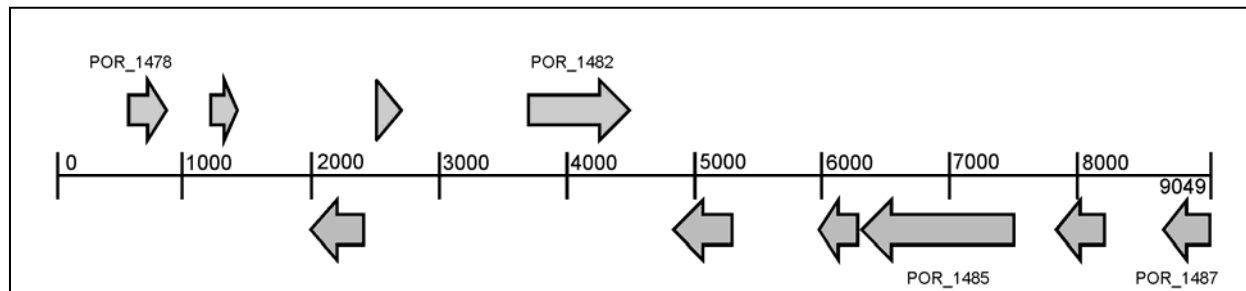


Abb. 5-11: Physikalische Genkarte von ‚contig‘ c00325.

Tabelle 5-6: Allgemeine Eigenschaften von ‚contig‘ c00325.

Contig-ID	Länge [bp]	ORFs	rRNAs	tRNAs	kodierender Bereich [%]
c00325	9049	10	0	0	50

Tabelle 5-7: Identifizierte ORFs auf ‚contig‘ c00325.

Gen-ID	Länge [AS]	Produkt	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_1478	96	‘Reactivating factor‘ für Ethanolamin Ammonium Lyase	<i>Marinobacter algicola</i> DG893	<i>Proteobacteria</i>	35
POR_1479	70	Hypothetisches Protein	---	---	---
POR_1480	142	Putative Transposase AAW84294	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	76
POR_1481	51	GCN5-verwandte N-Acetyltransferase	<i>Fervidobacterium nodosum</i> Rt17-B1	<i>Thermotogae</i>	44
POR_1482	263	Selenoprotein N, 1 Isoform 2 Vorstufe	<i>Homo sapiens</i>	---	28
POR_1483	150	Hypothetisches Protein AAW84307	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	66
POR_1484	98	Hypothetisches Protein AAW84303	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	62
POR_1485	400	Hypothetisches Protein AAW84300	Nicht-kultiviertes <i>Poribacteria</i> Bakterium 64K2	<i>Poribacteria</i>	53
POR_1486	124	Hypothetisches Protein Daro_2954	<i>Dechloromonas aromatica</i> RCB	<i>Proteobacteria</i>	29
POR_1487	123	Ornithin Carbamoyltransferase	<i>Dehalococcoides</i> sp. VS	<i>Chloroflexi</i>	33

In Abbildung 5-12 sind die zum poribakteriellen Referenzklon 64K2 homologen Sequenzbereiche schematisch zusammengefasst. Neben dem poribakteriellen 16S rRNA-Gen und der Isoleucin-tRNA konnte zusätzlich eine Transposase sowie Teile des hypothetischen Transmembranprotein-Genclusters von Fosmidklon 64K2 auch in den 454-Daten wiedergefunden werden. Die Anordnung der hierbei identifizierten ORFs veranschaulicht die

im Rahmen dieser Studie gefundene genomische Mikroheterogenität innerhalb des Candidatus Phylums *Poribacteria*.

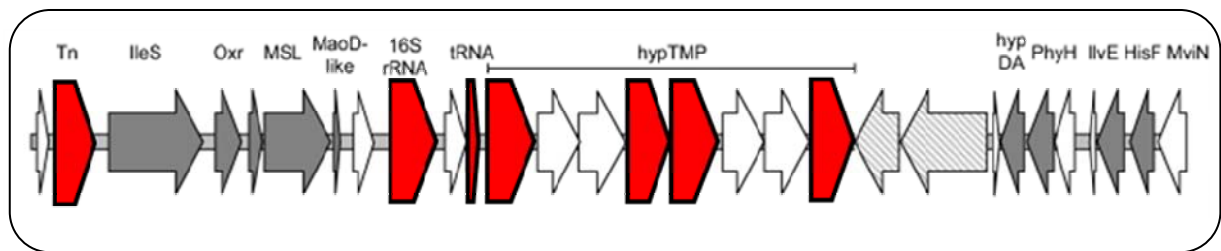


Abb. 5-12: Überblick über die homologen Bereiche zum poribakteriellen Metagenomklon 64K2, die auf insgesamt vier ‚contigs‘ des poribakteriellen 454-Datensatzes lokalisiert wurden. Innerhalb des hypothetischen Transmembranprotein-Genclusters (hypTMP) sind nur die besten Blast-Treffer markiert.

Die gezeigte genomische Mikroheterogenität innerhalb der *Poribacteria* spiegelt sich zudem auch bei den tRNAs von Metagenomklon 64K2 und dem poribakteriellen 454-‚contig‘ c00110 wider. Eine vergleichende Darstellung der Sekundärstruktur beider Isoleucin-tRNAs ist in Abbildung 5-13 wiedergegeben.

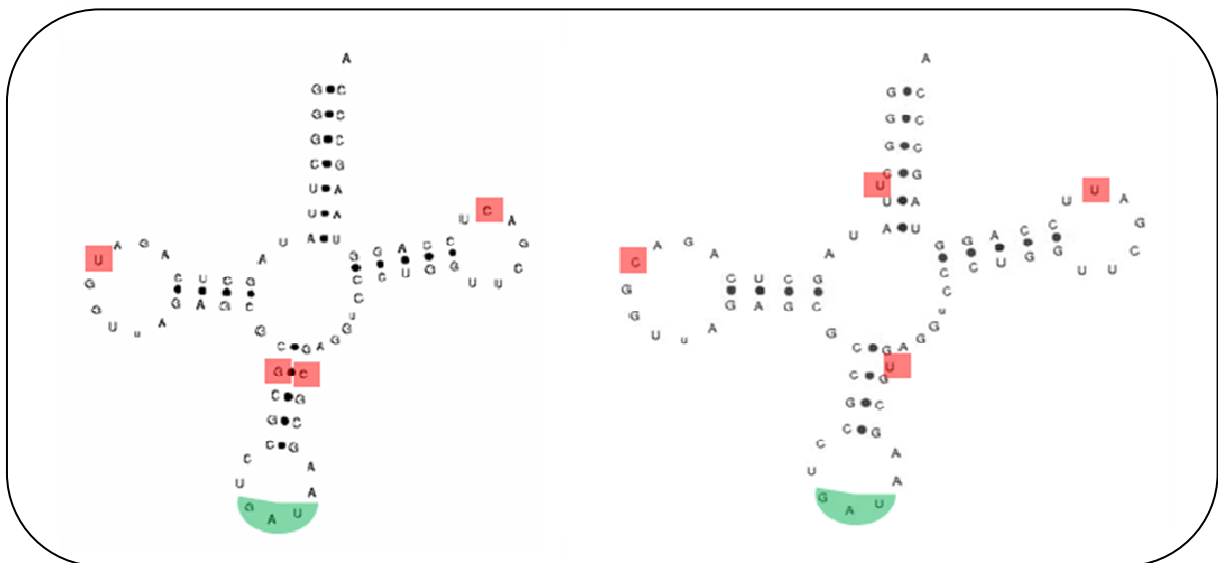


Abb. 5-13: Vergleich der tRNA des poribakteriellen Metagenomklons 64K2 (linke Teilabbildung) mit der tRNA des poribakteriellen 454-‚contigs‘ c00110 (rechte Teilabbildungen). Unterschiede sind rot markiert, das Antikodon (GAU) ist grün markiert.

Der poribakterielle Fosmidklon 64K2 kodiert ferner eine neuartige Molybdän-haltige Oxidoreduktase unbekannter Funktion (Fieseler *et al.* 2006). Diese konnte zwar im poribakteriellen 454-Datensatz nicht nachgewiesen werden, dafür jedoch interessanterweise drei Komponenten eines Molybdän-ABC-Transporter (POR_0532 bis POR_0534) und drei Molybdopterin-bindende Oxidoreduktasen (POR_0635; POR_0865; POR_0903).

Die 16S rRNA-Gene des Fosmidklons 64K2 und des 454-,contigs‘ c00110 besitzen eine 97%ige Identität. Dennoch unterscheiden sich die entsprechenden Poribakterien bereits deutlich in ihrem genomischen Kontext. Die Ähnlichkeit der 16S rDNA innerhalb des Candidatus Phylums *Poribacteria* liegt bei ca. 93 % („in cluster similarity“; Fieseler *et al.* 2004). Aus diesem Grund ist von einer noch größeren genomischen Varianz innerhalb dieses Phylums auszugehen als sie im Rahmen dieser Studie gezeigt wurde.

5.4.3. *Poribacteria* versus PVC-Superphylum

Das PVC-Superphylum umfasst die vier bakteriellen Phyla *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae* und *Lentisphaerae*. Zusätzlich werden dieser monophyletischen Gruppe die beiden Candidatus Phyla OP3 und *Poribacteria* zugerechnet (Wagner und Horn 2006). Interessanterweise beinhalten alle Phyla der PVC-Gruppe Vertreter, die mit Eukaryonten assoziiert sind. So konnten u.a. Vertreter der Planctomyceten aus Garnelen (Fuerst *et al.* 1997), Termiten (Shinzato *et al.* 2005) und marinen Schwämmen (Hentschel *et al.* 2002) isoliert werden. Vertreter der Poribakterien konnten bislang exklusiv in marinen Schwämmen nachgewiesen werden. Eine gesonderte Stellung in diesem Kontext nehmen die Chlamydien mit ihrer obligat intrazellulären Lebensweise ein.

Rhodopirellula baltica ist der erste Planctomycet, dessen Genom vollständig sequenziert wurde (Glöckner *et al.* 2003). Überraschenderweise beinhaltet das 7,15 Mb große Genom nur einen relativ kleinen Pool an Transkriptionsregulatoren (2,4 % aller Gene; Lombardot *et al.* 2005). Die automatische Annotation des poribakteriellen 454-Datensatzes offenbarte 20 Transkriptionsregulatoren. In neun Proteinen konnten DNA-bindende Helix-Turn-Helix-Domänen (Pfam: HTH_3) festgestellt werden. Somit liegt der Anteil an identifizierten Transkriptionsregulatoren mit ca. 1,2 % ähnlich niedrig wie bei *R. baltica*. Ob dies auf relativ stabile Lebensbedingungen innerhalb des Schwamm-Mesohyls zurückzuführen ist, könnte ein Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Nichtsdestotrotz kann die absolute Anzahl an Regulatoren durch die Unvollständigkeit der Genomsequenz nicht abgeschätzt werden. Ein weiteres Charakteristikum des *R. baltica*-Genoms ist das massive Vorhandensein von Sulfatase-kodierenden Genen. Insgesamt konnten 110 Sulfatasen in *R. baltica* identifiziert werden, denen eine wichtige Rolle beim Abbau von sulfatierten Glykopolymeren in Detritus-Flocken („marine snow“) zugewiesen wurde (Glöckner *et al.* 2003). Interessanterweise wurde auf dem poribakteriellen Metagenomklon 64K2 ebenfalls ein Sulfatase-kodierender ORF

entdeckt, welcher Homologien zu einer putativen Sulfatase aus *R. baltica* aufweist (Fieseler *et al.* 2006). Im Rahmen dieser Studie konnten insgesamt neun Sulfatasen im 454-Datensatz ‚POR_CDs‘ identifiziert werden (Tabelle 5-8). Zusätzlich wurden vier weitere Sulfatase-Genfragmente im Datensatz ‚POR_contigs‘ gefunden. Umgerechnet auf die Genomgröße entspricht dies ca. sechs Sulfatasen pro Megabase. Zwar besitzt *R. baltica* mit 15 Sulfatasen pro Megabase eine wesentlich höhere Dichte, allerdings konnte im Vergleich dazu im Genom von Candidatus *Pelagibacter ubique* HTCC1062 keine Sulfatase annotiert werden. Dieses, der SAR11-Klade zugehörige, marine Bakterium gehört zu den abundantesten Prokaryonten weltweit. Innerhalb des PVC-Phylums scheinen Sulfatasen hingegen weitverbreitet zu sein. So konnten für das Genom *Lentisphaera araneosa* HTCC2155 insgesamt 298 Sulfatase-Domänen prognostiziert werden.

Tabelle 5-8: BLASTp-Analyse der neun automatisch annotierten Sulfatasen des poribakteriellen 454-Datensatzes.

Gen-ID	Länge [AS]	Produkt	Bester Blast Treffer	Phylum	Identität [%]
POR_0295	97	Putative Cholin-Sulfatase	<i>Silicibacter pomeroyi</i> DSS-3	Proteobacteria	46
POR_1099	462	Twin-Arginin Translokations-Signalweg Mediator	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	Actinobacteria	37
POR_1317	404	Sulfatase	<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)	Actinobacteria	36
POR_1539	454	Putative Sulfatase	Flavobacteriales bacterium HTCC2170	Bacteroidetes	33
POR_1540	476	Putative Sulfatase	<i>Lentisphaera araneosa</i> HTCC2155	Lentisphaerae	44
POR_1542	77	Sulfatase	<i>Ralstonia eutropha</i> JMP134	Proteobacteria	58
POR_1579	426	Arylsulfatase Vorläufer	<i>Parabacteroides distasonis</i> ATCC 8503	Bacteroidetes	43
POR_1596	290	N-Acetylgalactosamin-6-Sulfatase (GALNS)	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	Planctomycetes	45
POR_1604	125	N-Sulphoglucosamin Sulphohydrolase Vorläufer	Alpha-Proteobakterium HTCC2255	Proteobacteria	44

Die ORFs POR_1539, POR_1540 und POR_1542 sind wie viele Sulfatasegene in *R. baltica* in einem Cluster angeordnet. Die im 454-Datensatz gefundenen Sulfatasen weisen u.a. Homologien zu Sulfatasen auf, welche N-acetylglucosamin-6-sulfat, N-acetylgalactosamin-6-sulfat, Cholin, Mucin und Heparan als Substrate verwenden. Somit ist durchaus denkbar, dass poribakterielle Sulfatasen am Abbau von sulfatierten Polymeren der extrazellulären Matrix von marinen Schwämmen zur Energiegewinnung beteiligt sind. Zusätzlich wurde im poribakteriellen 454-Datensatz ein Homolog zu einem Sulfat-Transporter aus *R. baltica*

gefunden (POR_0284). Sulfatierte Glykoproteine konnten zudem bereits als Bestandteil der extrazellulären Matrix des Hornschwamms *Cinachyra tarentina* nachgewiesen werden (Sciscioli *et al.* 2000).

Interessanterweise scheint das Vorhandensein eines geteilten rRNA-Operons ein gemeinsames Merkmal von Poribakterien (Fieseler *et al.* 2006) und zahlreichen Planktomyceten (Fuerst 1995, Glöckner *et al.* 2003) zu sein. Diese Beobachtung konnte im Rahmen dieser Studie teilweise bestätigt werden, da dem 16S rRNA-Gen von 454-,contig‘ c00110 kein weiteres rRNA-Gen angrenzt. Allerdings bricht das DNA-Fragment innerhalb der 16S rDNA ab, was eine beidseitige Analyse verhinderte. Sowohl Planktomyceten als auch Poribakterien zeichnen sich durch das Vorhandensein eines intrazellulären, membranumhüllten Kompartiments aus. Diese Nukleoid-ähnliche Struktur ist einmalig unter den Prokaryonten. Das Anammoxosom von Planktomyceten ist dabei aus Ladderan-Phospholipiden aufgebaut. Diese bestehen aus polaren Phosphocholin- oder Phosphoethanolamin-Kopfgruppen, welche mit einem Glycerin-Rückgrat verknüpft sind (Boumann *et al.* 2006). Innerhalb des 454-Datensatzes konnten zwei Genfragmente identifiziert werden, welche an der Biosynthese dieser Phospholipide beteiligt sein könnten. Contig01694 weist Homologien zu einer Phosphatidat-Cytidylyl-Transferase auf, Contig00987 besitzt Ähnlichkeiten mit einer Phosphatidylserin-Decarboxylase. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der Planktomycet *Gemmata obscuriglobus* zur Sterolbiosynthese befähigt ist, eine metabolische Eigenart, die ansonsten auf Eukaryonten beschränkt ist (Pearson *et al.* 2003). Die Analyse der 454-Daten deutet darauf hin, dass auch Poribakterien Sterolbiosynthese-Gene besitzen. So konnten zumindest Genfragmente einer Squalen-Monooxygenase und einer Oxidosqualen-Zyklase gefunden werden. Die Erforschung des poribakteriellen Zellkompartiments könnte einen wesentlichen Bestandteil zukünftiger Forschung darstellen, um eine mögliche Beteiligung von Phospholipiden oder Sterolen an der Membranbegrenzung des Kompartiments aufzudecken. Ein weiteres ursprüngliches Merkmal von Vertretern des PVC-Superphylums könnten Nukleotidtransporter darstellen, welche in allen sequenzierten Chlamydien sowie im Planktomycet *R. baltica* identifiziert werden konnten (Wagner und Horn 2006, sowie darin zitierte Referenzen). Während diese Transporter in Chlamydien den ATP/ADP-Austausch mit den Wirtszellen garantieren, könnten diese Transporter direkt mit der Zell-Kompartimentierung bei Planktomyceten und Poribakterien in Zusammenhang stehen. Die automatische Annotation des poribakteriellen 454-Datensatzes lässt jedoch keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Nukleotidtransportern zu.

Interessantweise konnte bislang in keinem der komplettsequenzierten Planktomyceten und Chlamydien das bakterielle Tubulinhomolog FtsZ gefunden werden (Wagner und Horn 2006, Pilhofer *et al.* 2008), welches unter Prokaryonten hochkonserviert ist und eine wichtige Rolle bei der Zellteilung einnimmt (Margolin 2005). Der poribakterielle 454-Datensatz offenbarte ebenfalls kein FtsZ-Homolog. Staley und Kollegen (2005) konnten vier eukaryontische Signaturproteine identifizieren, welche vermutlich über lateralen Gentransfer in das Verrucomicrobium *Prostheco bacter de joneii* und den Planktomyceten *Gemmata obscuriglobus* gelangten. Ferner konnte bioinformatisch eine Gruppe von Proteinen identifiziert werden, welche fast ausschließlich in Vertretern der *Planctomycetes* und *Chlamydiae* vorkommen (Strous *et al.* 2006). Hiervon konnten jedoch keine Homologien im poribakteriellen 454-Datensatz gefunden werden. Aufgrund der Unvollständigkeit des poribakteriellen Genoms sind allerdings keine endgültigen Aussagen bezüglich des Vorhandenseins von FtsZ oder etwaiger Gruppen-spezifischer Gene möglich.

Sowohl Chlamydien als auch Planktomyceten besitzen eine Peptidoglykan-freie Zellwand, während andere Vertreter des PVC-Superphylums einen typischen, Gram-negativen Zellwandcharakter aufweisen. Während das Genom von *R. baltica* noch einige Gene der Peptidoglykan-Biosynthese bewahrt hat (Glöckner *et al.* 2003), konnten im poribakteriellen 454-Datensatz keine entsprechenden Gene gefunden werden. Dies lässt vermuten, dass auch Poribakterien nicht von einer Peptidoglykan-haltigen Zellwand, sondern wie Planktomyceten von einem Protein-Sacculus begrenzt werden (Liesack *et al.* 1986). Das massive Vorhandensein von Glycosyltransferasen im poribakteriellen 454-Datensatz könnte zudem ein weiteres Indiz dafür sein, dass die Zellwand der Poribakterien aus, für ‚S-layer‘ typischen glycosylierten Proteinen besteht. Wie auch bei *R. baltica* konnten jedoch Gene im poribakteriellen Genom identifiziert werden, die für die Synthese von Lipid A essentiell sind (Glöckner *et al.* 2003). Ebenso wurden im poribakteriellen 454-Datensatz sieben Schlüsselenzyme der Lipopolysaccharid- (LPS-) Biosynthese (ko00540) gefunden. Dies kann als weiteres Indiz für die Hypothese geltend gemacht werden, dass Mitglieder des PVC-Superphylums und somit auch das Candidatus Phylum *Poribacteria* ursprünglich von einem Gram-negativen Vorfahren abstammen (Wagner und Horn 2006).

Insgesamt betrachtet konnten während dieser Studie einige Gemeinsamkeiten der *Poribacteria* mit anderen Vertretern des PVC-Superphylums aufgefunden werden. Dazu zählen in erster Linie gemeinsame Eigenschaften mit den Planktomyceten, so z.B. das Vorhandensein mehrerer Sulfatasen sowie ein geteiltes rRNA-Operon. Nicht nachweisbare

Gemeinsamkeiten können dabei entweder durch die Unvollständigkeit des poribakteriellen Genoms bedingt sein oder aber die genetische Eigenständigkeit des phylogenetisch distinkten Candidatus Phylums *Poribacteria* widerspiegeln.

5.4.4. Die Assoziation der *Poribacteria* mit marinen Schwämmen

Die Genomgröße des pyrosequenzierten Poribakteriums aus dieser Studie beläuft sich auf mindestens zwei Megabasen. Da das Genom jedoch nicht vollständig geschlossen wurde, könnte die tatsächliche Genomgröße rund vier Megabasen umfassen. Dies steht im deutlichen Gegensatz zu den Genomgrößen bekannter obligater Parasiten oder Symbionten (Mira *et al.* 2001, Moran *et al.* 2008), welche i.d.R. einer massiven Reduktion unterlaufen sind. So besitzt das Genom von *Buchnera aphidicola* eine Größe von nur 640 Kilobasen, das von *Borrelia burgdorferi* 910 Kilobasen und das von *Chlamydia trachomatis* 1,0 Megabasen. Das kleinste bislang bekannte bakterielle Genom mit nur 160 Kilobasen stammt aus *Carsonella* (Gammaproteobacteria), einem obligaten Symbionten von Blattflöhen (Nakabachi *et al.* 2006). Einhergehend mit der Reduzierung der Genomgröße bei vielen obligaten Symbionten ist eine extreme Dichte an kodierenden Regionen (Mira *et al.* 2001, Moran *et al.* 2008). Der poribakterielle 454-Datensatz dieser Studie konnte hingegen keine derartig hohe Dichte an kodierenden Bereichen erkennen lassen. Ferner spricht der ausgewogene GC-Gehalt des poribakteriellen Genoms ebenfalls gegen einen obligat symbiotischen Charakter der *Poribacteria*. Zumindest obligate, intrazelluläre Symbionten von Insekten weisen oftmals einen extrem niedrigen GC-Gehalt auf (Moran *et al.* 2008). Eine erste Analyse des genetischen Repertoires der *Poribacteria* lässt ebenfalls den Rückschluss zu, dass Poribakterien trotz ihrer engen Assoziation mit marinen Schwämmen ihren eigenen autonomen Stoffwechsel erhalten haben. Dennoch kann aufgrund des nicht geschlossenen Genoms nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass *Poribacteria* auxotroph und somit abhängig von Stoffwechselprodukten des Schwamms sind. Gegenwärtig sprechen die Daten jedoch eher dafür, dass die Poribakterien als permanent mit marinen Schwämmen assoziierte ‚Mitesser‘ zu verstehen sind.

Interessanterweise konnten im poribakteriellen 454-Datensatz keine Flagellen- und Chemotaxisgene ausfindig gemacht werden. Faktoren wie Motilität und Messung von Nährstoffkonzentrationen könnten im relativ stabilen Habitat der Poribakterien eine vernachlässigbare Rolle spielen und daher als Folge von Speziation im Zuge der Evolution

verloren gegangen sein. Das Fehlen dieser Gene könnte darauf hindeuten, dass Vertreter der *Poribacteria* nicht in einer pelagischen Form vorliegen, sondern tatsächlich permanent mit der extrazellulären Matrix mariner Schwämme assoziiert sind. Transmissionselektronenmikroskopische Studien des Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortiums ließen ebenfalls bislang keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Flagellen zu. Der mit *Axinella mexicana* assoziierte Schwammsymbiont *Cenarchaeum symbiosum* ist zudem ebenfalls nicht motil (Hallam *et al.* 2006 a). Ein ähnliches Phänomen, wenn auch nur auf genregulatorischer Ebene findet sich bei *Vibrio fischeri*, dem fakultativen Symbionten des Tintenfischs *Euprymna scolopes*. Hierbei stellt die bakterielle Flagelle einen wichtigen Faktor für die Initiierung der Symbiose dar. Allerdings wird diese von *V. fischeri* abgeworfen, sobald die symbiontische Interaktion im nährstoffreichen Leuchtorgan des Tintenfischs etabliert ist (Ruby und Asato 1993).

Der Crenarchaeot *Cenarchaeum symbiosum* stellte bis zu Beginn dieser Studie den einzigen Schwammsymbionten dar, für den eine Genomsequenz verfügbar ist. Die Analyse des rund zwei Megabasen umfassenden *C. symbiosum* Genoms mit 2.017 Protein-kodierenden Genen führte zur Aufdeckung einiger möglicher Interaktionen dieses Symbionten mit seinem Wirt *Axinella mexicana* (Hallam *et al.* 2006 a). So wurde u.a. postuliert, dass *C. symbiosum* die Stickstoff-haltigen Abfallprodukte des Schwamms (Ammonium, Harnstoff) für die Energiegewinnung nutzt. Der mediterrane Schwamm *Aplysina aerophoba* scheidet ebenfalls Ammonium als Stoffwechselendprodukt aus (Bayer *et al.* 2008). Interessanterweise konnten im poribakteriellen 454-Datensatz mehrere Ammoniumtransporter-Gene bzw. Genfragmente gefunden werden (contig01491 frame1; contig01369 frame2; POR_0604; POR_1299; POR_1300). Inwieweit und auf welchem Weg das in die Zelle transportierte Ammonium von den Poribakterien verstoffwechselt wird, ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht bestimmbar. Zusätzlich wurde ein aus neun ORFs bestehendes Gencluster im poribakteriellen Datensatz identifiziert, welches eine Urease (alpha-, beta- und gamma-Untereinheit) samt akzessorischen Proteinen und dem entsprechenden Harnstoff-ABC-Transporter kodiert (POR_1256 bis POR_1264). *Cenarchaeum symbiosum* ist ferner zur chemolithotrophen CO₂-Fixierung befähigt, wodurch zusätzlich zum Stickstoffaustausch ein möglicher Kohlenstoffaustausch zwischen den Interaktionspartnern postuliert wurde (Hallam *et al.* 2006 a). Die Kartierung von poribakteriellen ORFs auf ‚KEGG pathways‘ zeigte, dass mehrere an CO₂-Fixierungen (path ko00710 und ko00720) beteiligte Enzyme vorhanden sind. Da jedoch sämtliche identifizierte Enzyme auch an alternativen Stoffwechselwegen

mitwirken, bleibt weiter zu klären, ob Poribakterien tatsächlich zur CO₂-Fixierung befähigt sind.

Im Zuge des Genomsequenzierungsprojekts von *C. symbiosum* wurden weitere putative Symbiosedeterminanten aufgedeckt, die in planktonischen Verwandten dieses Archaeons fehlen (Hallam *et al.* 2006 a). Dazu zählen Restriktions-Modifikations-Systeme zum Schutz vor Fremd-DNA, Zell-Zell-Kontakt vermittelnde Autotransporter-Adhäsine, Proteasen zum Abbau extrazellulärer Matrixproteine, Glycosyltransferasen für die Zellwand-Biogenese sowie sezernierte Serin-Protease-Inhibitoren, welche eine mögliche Schutzfunktion gegenüber dem Verteidigungs- bzw. Phagozytose-System des Schwamms einnehmen (Hallam *et al.* 2006 a). Die automatische Annotation der poribakteriellen 454-Daten offenbarte insgesamt 16 Proteine, denen eine Rolle bei der Restriktion und Modifikation von DNA zugewiesen wurde. Dennoch besteht aufgrund der Analyse des Sup-PKS kodierenden Cosmidklons 1k6 Grund zur Annahme, dass Vertreter des Schwamm-spezifischen mikrobiellen Konsortiums in *A. aerophoba* dennoch dem Austausch von genetischer Information unterlegen sind. Grund hierfür dürfte die extrem hohe mikrobielle Dichte in Bakterienchwämmen sein. Zwar konnten keine Autotransporter-Adhäsine identifiziert werden, dennoch finden sich mindestens drei Gene für Oberflächenantigene (POR_0709; POR_0759; POR_1311) im poribakteriellen Genom wieder, die an Zell-Zell-Interaktionen beteiligt sein könnten. Ebenfalls eine wichtige Funktion bei Zell-Zell-Interaktionen könnten die ‚TPR-repeat‘ und ‚WD40‘-Domänen Proteine einnehmen, die in großer Anzahl im poribakteriellen Genom vorzufinden sind. Zumindest einige davon besitzen Transmembranhelices. Wie bereits erwähnt, können diese Domänen untereinander interagieren. Ferner werden ‚Tetratricopeptid Repeat‘ Domänen wichtige Funktionen bei Prokaryonten-Eukaryonten-Interaktionen zugewiesen (Mittl und Schneider-Brachert 2007). Aus diesem Grund repräsentieren die poribakteriellen TPR-haltigen Proteine mögliche Symbiosefaktoren. Die Aufklärung derer genauen Funktionen erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

Insgesamt konnten über die automatische Annotation 46 Proteine identifiziert werden, die Homologien zu Proteasen oder Peptidasen aufweisen. Eine mögliche Beteiligung bei der Degradation von Proteinen der extrazellulären Matrix des Schwamms bleibt weiter zu untersuchen. Interessanterweise konnte eine Vielzahl von ABC-Transporter kodierenden Genen gefunden werden. Eine rein sequenzabhängige Analyse der möglichen Substrate von Transportern ist zwar schwierig, allerdings ist aufgrund von Homologien der poribakterielle Import folgender Stoffklassen wahrscheinlich: Kohlenhydrate (contig00680 frame4;

POR_1456; POR_1457; POR_1458), Oligo- oder Dipeptide (contig01261 frame 1; contig01653 frame 4; contig00331 frame 3), Lipoproteine (contig01839 frame3) sowie Aminosäuren mit verzweigten Seitenketten (POR_0993). Dazu zählen Leucin, Isoleucin sowie Valin. Zwar sind einige der an der Biosynthese dieser Aminosäuren (KEGG ‚pathway‘ ko00290) beteiligten Enzyme gefunden worden, allerdings bleibt zu klären, ob Poribakterien diese Aminosäuren tatsächlich selbst synthetisieren oder diese aus dem Schwamm-Mesohyl importiert werden. Ferner wurde ein Genfragment (contig00879 frame1) gefunden, das Ähnlichkeiten mit einem Gen aus *C. symbiosum* besitzt und eine Untereinheit eines Phosphonat-ABC-Transporters kodiert. Phosphonat ist u.a. ein Membranbestandteil vieler Tiere. Zusammengefasst deuten die gefundenen ABC-Transporter darauf hin, dass Poribakterien das genetische Potential für einen extensiven Metabolit-Import besitzen.

Ebenso wurde eine Vielzahl von Glycosyltransferasen gefunden, denen eine Rolle bei der Bildung der poribakteriellen Zellwand zuzuordnen ist. Im Gegensatz zu *C. symbiosum* konnten keine Serin-Protease-Inhibitoren gefunden werden. Interessanterweise sind jedoch im poribakteriellen 454-Datensatz einige Gene bzw. Genfragmente vorhanden, die an einer möglichen Sporen- und Kapselbildung beteiligt sind, was wiederum dem Schutz vor Phagocytose durch Schwamm-Archaeocyten dienen könnte. Hinzu kommt eine Reihe von putativen Resistenzgenen, die möglicherweise essentiell für eine permanente Assoziation der *Poribacteria* mit marinen Schwämmen sind. Für deren Charakterisierung sind jedoch weiterführende Experimente nötig. Eine weitere wichtige Symbiosedeterminante könnten die, im Rahmen dieser Studie den *Poribacteria* zugeordneten Sup-Polyketidsynthasen darstellen. Als mögliche Endprodukte wurden hierfür Methyl-verzweigte Fettsäuren postuliert (Fieseler *et al.* 2007). Die mögliche Beteiligung dieser Fettsäuren an der Resistenz gegenüber Phagocytose wird ein wichtiger Gegenstand zukünftiger Forschungsprojekte sein.

Insgesamt konnte im poribakteriellen Datensatz eine Vielzahl an Faktoren identifiziert werden, die möglicherweise eine wichtige Rolle bei der Interaktion der *Poribacteria* mit marinen Schwämmen einnehmen. So fanden sich Indizien, dass Poribakterien Metabolite des Schwamms aufnehmen und verstoffwechseln können (z.B. Ammoniak, Kohlenhydrate, Peptide, Aminosäuren). Ferner ließen sich einige Faktoren identifizieren, die zur poribakteriellen Persistenz im Schwamm-Mesohyl beitragen könnten. Zusammenfassend wird dennoch deutlich, dass es sich bei den Poribakterien vermutlich mehr um ‚Mitesser‘ als um obligate Symbionten handelt. Auf den Daten dieser Doktorarbeit basierende Folgeexperimente werden mit Sicherheit dazu beitragen, den Stofffluss und die

Interaktionsmechanismen zwischen Poribakterien und marinen Schwämmen genauer zu beschreiben.

6. Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden Einblicke in den Sekundärmetabolismus Schwamm-assoziiierter Bakterien gewonnen und bestehende Erkenntnisse über das genetische Repertoire des Candidatus Phylums *Poribacteria* deutlich erweitert. Die erfolgreiche Anwendung von Einzelzell-basierten Methoden eröffnet zahlreiche neue Möglichkeiten, die spezifische Interaktion von marinen Schwämmen mit Mikroorganismen im Detail zu untersuchen.

- Die erfolgreiche Anwendung der Durchflusszytometrie für die Sortierung von Schwamm-assoziierten Bakterien lässt sich alternativ zur ‚dilution-to-extinction‘ Methode auch auf Kultivierungsexperimente übertragen. Eine Weiterführung der FACS-Inokulation von Wachstumsmedien mit präzise definierbaren Zellzahlen würde Kultivierungsstudien im Hochdurchsatzverfahren ermöglichen.
- Die Pyrosequenzierung eines amplifizierten Poribakterien-Genoms erlaubte erstmalig den Einblick in das genomische Potential eines Schwamm-assoziierten, nichtkultivierten Vertreters eines bakteriellen Candidatus Phylums. Die manuelle Überprüfung der automatischen Annotation sowie eine weiterführende Rekonstruktion von Stoffwechselwegen wird künftig dazu dienen, dieses Candidatus Phylum sowie dessen Wechselwirkungen mit marinen Schwämmen besser zu verstehen. Durch die Auswertung der poribakteriellen 454-Sequenzinformation konnten erste metabolische Kapazitäten der Poribakterien rekonstruiert werden. Dieses Wissen könnte in künftigen Experimenten herangezogen werden, um geeignete Nährmedien für die Kultivierung von Poribakterien zu kreieren.
- Die automatische Annotation der poribakteriellen 454-Sequenzinformation führte zur Identifizierung von rund 1.600 Protein-kodierenden Genen. Zukünftige Studien könnten der heterologen Expression von funktionellen Genen der *Poribacteria* dienen, um deren Funktion *in situ* aufzudecken. Ein wesentlicher Aspekt zukünftiger Forschung könnte dabei auch die weitergehende funktionelle Charakterisierung der Lub-NRPS- und Sup-PKS-Gene darstellen. Expressionsstudien sowie Substratidentifikations-Analysen könnten dazu beitragen, deren Rolle im bakteriellen Sekundärmetabolismus aufzudecken. So könnte u.a. geklärt werden, ob das Produkt des Lub-NRPS-Systems tatsächlich Alkaloide sind, bzw. die Sup-Polyketidsynthasen für die Bildung von methylverzweigten Fettsäuren verantwortlich sind. Desweiteren

wurde im Rahmen dieser Studie eine Reihe poribakterieller Oberflächenproteine identifiziert. Diese könnten ebenfalls heterolog exprimiert werden, um spezifische Antikörper gegen poribakterielle Epitope zu generieren. Dieser methodische Ansatz würde eine FACS-Anreicherung der Poribakterien aus dem mikrobiellen Konsortium unter Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern ermöglichen. Letztlich könnte das somit gewonnene Poribakterien-Metagenom zur Erweiterung der Sequenzinformation dieses Candidatus Phylums dienen.

- Die FACS-Analyse von Schwamm-assoziierten Bakterien aus *Aplysina aerophoba* zeigte wesentliche Unterschiede zwischen den heterotrophen Prokaryonten des Mesohyls und den autotrophen Cyanobakterien der Schwamm-Außenschicht auf. Deren autofluoreszente Eigenschaften könnten dafür herangezogen werden, Schwamm-assoziierte Cyanobakterien spezifisch über FACS anzureichern und anschließend genetisch mit freilebenden Vertretern dieses Phylums zu vergleichen. Dies würde eine gezielte Suche nach potentiellen Symbiosedeterminanten in Schwamm-assoziierten Cyanobakterien ermöglichen.
- In dieser Doktorarbeit konnte die vielversprechende Technik der Einzel-Zell-Genomik auf das Gebiet der Schwamm-Mikrobiologie übertragen werden. Die erfolgreiche Anwendung ermöglicht somit neben der Beschreibung der *Poribacteria* ebenso die gezielte Charakterisierung weiterer Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen. Von speziellem Interesse hierbei dürfte die Lub-NRPS kodierende, Schwamm-spezifische Klade innerhalb des Phylums *Chloroflexi* sein.

7. Literaturverzeichnis

- Achtman, M., und M. Wagner.** (2008) Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol* **6**:431-440.
- Alonso, C., F. Warnecke, R. Amann, und J. Pernthaler.** (2007) High local and global diversity of Flavobacteria in marine plankton. *Environ Microbiol* **9**:1253-1266.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, und D. J. Lipman.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**:3389-3402.
- Amann, R. L., W. Ludwig, und K. H. Schleifer.** (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* **59**:143-169.
- Arillo, A., G. Bavestrello, B. Burlando, und M. Sara.** (1993) Metabolic integration between symbiotic cyanobacteria and sponges: a possible mechanism. *Marine Biology* **117**:159–162.
- Ashelford, K. E., N. A. Chuzhanova, J. C. Fry, A. J. Jones, und A. J. Weightman.** (2005) At least 1 in 20 16S rRNA sequence records currently held in public repositories is estimated to contain substantial anomalies. *Appl Environ Microbiol* **71**:7724-7736.
- Ayuso-Sacido, A., und O. Genilloud.** (2005) New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups. *Microb Ecol* **49**:10-24.
- Azad, A. K., T. D. Sirakova, N. D. Fernandes, und P. E. Kolattukudy.** (1997) Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *J Biol Chem* **272**:16741-16745.
- Bateman, A., L. Coin, R. Durbin, R. D. Finn, V. Hollich, S. Griffiths-Jones, A. Khanna, M. Marshall, S. Moxon, E. L. Sonnhammer, D. J. Studholme, C. Yeats, und S. R. Eddy.** (2004) The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* **32**:D138-141.
- Bayer, K., S. Schmitt, und U. Hentschel.** (2008) Physiology, phylogeny and in situ evidence for bacterial and archaeal nitrifiers in the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Environ Microbiol* **10**:2942-2955.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne, und S. Brunak.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**:783-795.
- Binga, E. K., R. S. Lasken, und J. D. Neufeld.** (2008) Something from (almost) nothing: the impact of multiple displacement amplification on microbial ecology. *ISME J* **2**:233-241.
- Blunt, J. W., B. R. Copp, W. P. Hu, M. H. Munro, P. T. Northcote, und M. R. Prinsep.** (2008) Marine natural products. *Nat Prod Rep* **25**:35-94.

- Bohlin, J., E. Skjerve, und D. W. Ussery.** (2008) Investigations of oligonucleotide usage variance within and between prokaryotes. *PLoS Comput Biol* **4**:e1000057.
- Boumann, H. A., E. C. Hopmans, I. van de Leemput, H. J. Op den Camp, J. van de Vossenberg, M. Strous, M. S. Jetten, J. S. Sinninghe Damste, und S. Schouten.** (2006) Ladderane phospholipids in anammox bacteria comprise phosphocholine and phosphoethanolamine headgroups. *FEMS Microbiol Lett* **258**:297-304.
- Bruns, A., H. Cypionka, und J. Overmann.** (2002) Cyclic AMP and acyl homoserine lactones increase the cultivation efficiency of heterotrophic bacteria from the central Baltic Sea. *Appl Environ Microbiol* **68**:3978-3987.
- Brusca, R. C., und G. J. Brusca.** (1990) Phylum Porifera: The sponges. In *Invertebrates*. Sinauer, A. D. (ed). Sanderland: Sinauer Press, pp. 181-210.
- Case, R. J., Y. Boucher, I. Dahloff, C. Holmstrom, W. F. Doolittle, und S. Kjelleberg.** (2007) Use of 16S rRNA and rpoB genes as molecular markers for microbial ecology studies. *Appl Environ Microbiol* **73**:278-288.
- Cassler, M., C. L. Peterson, A. Ledger, S. A. Pomponi, A. E. Wright, R. Winegar, P. J. McCarthy, und J. V. Lopez.** (2008) Use of real-time qPCR to quantify members of the unculturable heterotrophic bacterial community in a deep sea marine sponge, *Vetulina* sp. *Microb Ecol* **55**:384-394.
- Cho, J. C., und S. J. Giovannoni.** (2004) Cultivation and growth characteristics of a diverse group of oligotrophic marine Gammaproteobacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:432-440.
- Collier, J. L., und B. Palenik.** (2003) Phycoerythrin-containing picoplankton in the Southern California Bight. *Deep Sea Res* **2**:2405-2422.
- Cserzo, M., E. Wallin, I. Simon, G. von Heijne, und A. Elofsson.** (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng* **10**:673-676.
- Davelos Baines, A. L., K. Xiao, und L. L. Kinkel.** (2007) Lack of correspondence between genetic and phenotypic groups amongst soil-borne streptomyces. *FEMS Microbiol Ecol* **59**:564-575.
- DeLong, E. F.** (1992) Archaea in coastal marine environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**:5685-5689.
- Diaz, C. M., D. Akob, und C. S. Cary.** (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis of nitrifying microbes associated with tropical sponges. *Boll. Mus. Ist. Biol. Univ. Genova* **68**:279-289.
- Diaz, C. M., und B. B. Ward.** (1997) Sponge-mediated nitrification in tropical benthic communities. *Microb. Ecol. Prog. Ser.* **156**:97-107.

- Donadio, S., P. Monciardini, und M. Sosio.** (2007) Polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases: the emerging view from bacterial genomics. *Nat Prod Rep* **24**:1073-1109.
- Enticknap, J. J., M. Kelly, O. Peraud, und R. T. Hill.** (2006) Characterization of a culturable alphaproteobacterial symbiont common to many marine sponges and evidence for vertical transmission via sponge larvae. *Appl Environ Microbiol* **72**:3724-3732.
- Erwin, P. M., und R. W. Thacker.** (2008) Cryptic diversity of the symbiotic cyanobacterium *Synechococcus spongiarum* among sponge hosts. *Molecular ecology* **17**:2937-2947.
- Fieseler, L.** (2005) Entdeckung des neuen Candidatus Phylums Poribacteria. Dissertation, Universität Würzburg.
- Fieseler, L., U. Hentschel, L. Grozdanov, A. Schirmer, G. Wen, M. Platzer, S. Hrvatin, D. Butzke, K. Zimmermann, und J. Piel.** (2007) Widespread occurrence and genomic context of unusually small polyketide synthase genes in microbial consortia associated with marine sponges. *Appl Environ Microbiol* **73**:2144-2155.
- Fieseler, L., M. Horn, M. Wagner, und U. Hentschel.** (2004) Discovery of the novel candidate phylum "Poribacteria" in marine sponges. *Appl Environ Microbiol* **70**:3724-3732.
- Fieseler, L., A. Quaiser, C. Schleper, und U. Hentschel.** (2006) Analysis of the first genome fragment from the marine sponge-associated, novel candidate phylum Poribacteria by environmental genomics. *Environ Microbiol* **8**:612-624.
- Fraser, C. M., J. A. Eisen, und S. L. Salzberg.** (2000) Microbial genome sequencing. *Nature* **406**:799-803.
- Friedrich, A. B., J. Hacker, I. Fischer, P. Proksch, und U. Hentschel.** (2001) Temporal variations of the microbial community associated with the Mediterranean sponge *Aplysina aerophoba*. *FEMS Microbiol Ecol* **38**:105-113.
- Friedrich, A. B., H. Merkert, T. Fendert, J. Hacker, P. Proksch, und U. Hentschel** (1999) Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Mar. Biol.* **134**:461-470.
- Fuerst, J. A.** (1995) The planctomycetes: emerging models for microbial ecology, evolution and cell biology. *Microbiology* **141 (Pt 7)**:1493-1506.
- Fuerst, J. A., H. G. Gwilliam, M. Lindsay, A. Lichanska, C. Belcher, J. E. Vickers, und P. Hugenholtz.** (1997) Isolation and molecular identification of planctomycete bacteria from postlarvae of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*. *Appl Environ Microbiol* **63**:254-262.
- Gaitatzis, N.** (2004) Neuartige Modulare Megasyntasen aus Myxobakterien: Die Stigmatellin- und Myxochelin-Biosynthese in *Stigmatella aurantiaca*. Dissertation, Technische Universität Braunschweig.

Giovannoni, S., und U. Stingl. (2007) The importance of culturing bacterioplankton in the 'omics' age. *Nat Rev Microbiol* **5**:820-826.

Glockner, F. O., M. Kube, M. Bauer, H. Teeling, T. Lombardot, W. Ludwig, D. Gade, A. Beck, K. Borzym, K. Heitmann, R. Rabus, H. Schlesner, R. Amann, und R. Reinhardt. (2003) Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:8298-8303.

Grozdanov, L., und U. Hentschel. (2007) An environmental genomics perspective on the diversity and function of marine sponge-associated microbiota. *Curr Opin Microbiol* **10**:215-220.

Hagstrom, A., T. Pommier, F. Rohwer, K. Simu, W. Stolte, D. Svensson, und U. L. Zweifel. (2002) Use of 16S ribosomal DNA for delineation of marine bacterioplankton species. *Appl Environ Microbiol* **68**:3628-3633.

Hahn, M. W., und M. Pockl. (2005) Ecotypes of planktonic actinobacteria with identical 16S rRNA genes adapted to thermal niches in temperate, subtropical, and tropical freshwater habitats. *Appl Environ Microbiol* **71**:766-773.

Hallam, S. J., K. T. Konstantinidis, N. Putnam, C. Schleper, Y. Watanabe, J. Sugahara, C. Preston, J. de la Torre, P. M. Richardson, und E. F. DeLong. (2006 a) Genomic analysis of the uncultivated marine crenarchaeote *Cenarchaeum symbiosum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**:18296-18301.

Hallam, S. J., T. J. Mincer, C. Schleper, C. M. Preston, K. Roberts, P. M. Richardson, und E. F. DeLong. (2006 b) Pathways of carbon assimilation and ammonia oxidation suggested by environmental genomic analyses of marine Crenarchaeota. *PLoS Biol* **4**:e95.

Handelsman, J. (2004) Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:669-685.

Henke, J. M., und B. L. Bassler. (2004) Quorum sensing regulates type III secretion in *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology* **186**:3794-3805.

Hentschel, U., L. Fieseler, M. Wehrl, C. Gernert, M. Steinert, J. Hacker, und M. Horn. (2003) Microbial diversity of marine sponges. *Prog Mol Subcell Biol* **37**:59-88.

Hentschel, U., J. Hopke, M. Horn, A. B. Friedrich, M. Wagner, J. Hacker, und B. S. Moore. (2002) Molecular evidence for a uniform microbial community in sponges from different oceans. *Appl Environ Microbiol* **68**:4431-4440.

Hentschel, U., K. M. Usher, und M. W. Taylor. (2006) Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol* **55**:167-177.

- Hepperle, D.** (2002) Align: a multicolor sequence alignment editor. <http://science.d-mix.de/software.phd>
- Hill, R. T.** (2004) Microbes from marine sponges: A Treasure Trove of Biodiversity for Natural Products Discovery. In *Microbial diversity and bioprospecting*. Bull, A. T. (ed). ASM Press, Washington DC. pp. 177-190.
- Hoffmann, F., O. Larsen, V. Thiel, H. T. Rapp, T. Pape, W. Michaelis, und J. Reitner.** (2005) An anaerobic world in sponges. *Geomicrobiology Journal* **22**:1-10.
- Hoffmann, F., H. T. Rapp, und J. Reitner.** (2006) Monitoring microbial community composition by fluorescence in situ hybridization during cultivation of the marine cold-water sponge *Geodia barretti*. *Mar Biotechnol (NY)* **8**:373-379.
- Holmes, B. M., und H. W. Blanch.** (2006) Genus-specific associations of marine sponges with group I crenarchaeotes. *Mar Biol* **150**:759-772.
- Hooper, J. N. A., und R. W. M. E. Van Soest.** (2002) *Systema Porifera: a guide to the classification of Sponges*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, NY (USA).
- Hugenholtz, P., und E. Stackebrandt.** (2004) Reclassification of *Sphaerobacter thermophilus* from the subclass Sphaerobacteridae in the phylum Actinobacteria to the class Thermomicrobia (emended description) in the phylum Chloroflexi (emended description). *Int J Syst Evol Microbiol* **54**:2049-2051.
- Hutchison, C. A., 3rd, und J. C. Venter.** (2006) Single-cell genomics. *Nat Biotechnol* **24**:657-658.
- Ishoey, T., T. Woyke, R. Stepanauskas, M. Novotny, und R. S. Lasken.** (2008) Genomic sequencing of single microbial cells from environmental samples. *Curr Opin Microbiol* **11**:198-204.
- Jiang, S., W. Sun, M. Chen, S. Dai, L. Zhang, Y. Liu, K. J. Lee, und X. Li.** (2007) Diversity of culturable actinobacteria isolated from marine sponge *Haliclona* sp. *Antonie Van Leeuwenhoek* **92**:405-416.
- Jimenez, E., und M. Ribes.** (2007) Sponges as a source of dissolved inorganic nitrogen: Nitrification mediated by temperate sponges. *Limnology and Oceanography* **52**:948-958.
- Kaerberlein, T., K. Lewis, und S. S. Epstein.** (2002) Isolating "uncultivable" microorganisms in pure culture in a simulated natural environment. *Science* **296**:1127-1129.
- Kennedy, J., J. R. Marchesi, und A. D. Dobson.** (2007) Metagenomic approaches to exploit the biotechnological potential of the microbial consortia of marine sponges. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**:11-20.

- Kim, T. K., und J. A. Fuerst.** (2006) Diversity of polyketide synthase genes from bacteria associated with the marine sponge *Pseudoceratina clavata*: culture-dependent and culture-independent approaches. *Environ Microbiol* **8**:1460-1470.
- Krogh, A., B. Larsson, G. von Heijne, und E. L. Sonnhammer.** (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**:567-580.
- Lane, D. J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic techniques in bacterial systematics*. Stackebrandt, E. und Goodfellow, M. (eds). John Wiley & Sons, Inc., Chichester, United Kingdom, pp. 115-175.
- Lasken, R., A. Raghunathan, T. Kvist, T. Ishoey, P. Westermann, B. K. Ahring, und B. R.** (2005) Multiple displacement amplification from single bacterial cells. In *Whole Genome Amplification: Methods Express*. Hughes, S. und Lasken, R. (eds). Scion Publishing Limited, pp. 119-147.
- Lasken, R. S., und T. B. Stockwell.** (2007) Mechanism of chimera formation during the Multiple Displacement Amplification reaction. *BMC Biotechnol* **7**:19.
- Lee, E. Y., H. K. Lee, Y. K. Lee, C. J. Sim, und J. H. Lee.** (2003) Diversity of symbiotic archaeal communities in marine sponges from Korea. *Biomol Eng* **20**:299-304.
- Li, C. W., J. Y. Chen, und T. E. Hua.** (1998) Precambrian sponges with cellular structures. *Science* **279**:879-882.
- Liesack, W., H. König, H. Schlesner, und P. Hirsch.** (1986) Chemical composition of the peptidoglycan-free cell envelopes of budding bacteria of the *Pirella/Planctomyces* group. *Arch. Microbiol.* **145**:361–366.
- Lombardot, T., M. Bauer, H. Teeling, R. Amann, und F. O. Glockner.** (2005) The transcriptional regulator pool of the marine bacterium *Rhodopirellula baltica* SH 1T as revealed by whole genome comparisons. *FEMS Microbiol Lett* **242**:137-145.
- Love, G. D., E. Grosjean, C. Stalvies, D. A. Fike, J. P. Grotzinger, A. S. Bradley, A. E. Kelly, M. Bhatia, W. Meredith, C. E. Snape, S. A. Bowring, D. J. Condon, und R. E. Summons.** (2009) Fossil steroids record the appearance of Demospongiae during the Cryogenian period. *Nature* **457**:718-721.
- Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W. Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R. Lussmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T. Ludwig, A. Bode, und K. H. Schleifer.** (2004) ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res* **32**:1363-1371.

- Margolin, W.** (2005) FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:862-871.
- Medlin, L., H. J. Elwood, S. Stickel, und M. L. Sogin.** (1988) The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* **71**:491-499.
- Minnikin, D. E., L. Kremer, L. G. Dover, und G. S. Besra.** (2002) The methyl-branched fortifications of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* **9**:545-553.
- Mira, A., H. Ochman, und N. A. Moran.** (2001) Deletional bias and the evolution of bacterial genomes. *Trends Genet* **17**:589-596.
- Mittl, P. R., und W. Schneider-Brachert.** (2007) Sell-like repeat proteins in signal transduction. *Cell Signal* **19**:20-31.
- Mohamed, N. M., A. S. Colman, Y. Tal, und R. T. Hill.** (2008 a) Diversity and expression of nitrogen fixation genes in bacterial symbionts of marine sponges. *Environ Microbiol* **10**:2910-2921.
- Mohamed, N. M., V. Rao, M. T. Hamann, M. Kelly, und R. T. Hill.** (2008 b) Monitoring bacterial diversity of the marine sponge *Ircinia strobilina* upon transfer into aquaculture. *Appl Environ Microbiol* **74**:4133-4143.
- Moody, K., R. H. Thomson, E. Fattorusso, L. Minale, und G. Sodano.** (1972) Aerothionin and homoaerothionin: Two tetrabromo spirocyclohexadienylisoxazoles from *Verongia* sponges. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions* **1**:18-24.
- Moran, N. A., J. P. McCutcheon, und A. Nakabachi.** (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* **42**:165-190.
- Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, A. Bateman, D. Binns, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, L. Cerutti, R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, W. Fleischmann, J. Gough, D. Haft, N. Harte, N. Hulo, D. Kahn, A. Kanapin, M. Krestyaninova, D. Lonsdale, R. Lopez, I. Letunic, M. Madera, J. Maslen, J. McDowall, A. Mitchell, A. N. Nikolskaya, S. Orchard, M. Pagni, C. P. Ponting, E. Quevillon, J. Selengut, C. J. Sigrist, V. Silventoinen, D. J. Studholme, R. Vaughan, und C. H. Wu.** (2005) InterPro, progress and status in 2005. *Nucleic Acids Res* **33**:D201-205.
- Muscholl-Silberhorn, A., V. Thiel, und J. F. Imhoff.** (2008) Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean sea. *Microb Ecol* **55**:94-106.
- Musmann, M., F. Z. Hu, M. Richter, D. de Beer, A. Preisler, B. B. Jorgensen, M. Huntemann, F. O. Glockner, R. Amann, W. J. Koopman, R. S. Lasken, B. Janto, J. Hogg, P. Stoodley, R. Boissy, und G. D. Ehrlich.** (2007) Insights into the genome of large sulfur bacteria revealed by analysis of single filaments. *PLoS Biol* **5**:e230.

- Muyzer, G., T. Brinkhoff, U. Nübel, C. Santegoeds, H. Schäfer, und C. Wawer.** (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol Microbial Ecol Manual* **3.4.4**:1–27.
- Nakabachi, A., A. Yamashita, H. Toh, H. Ishikawa, H. E. Dunbar, N. A. Moran, und M. Hattori.** (2006) The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont Carsonella. *Science* **314**:267.
- Nett, M., und G. M. König.** (2007) The chemistry of gliding bacteria. *Nat Prod Rep* **24**:1245-1261.
- Nichols, D.** (2007) Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiol Ecol* **60**:351-357.
- Nichols, D., K. Lewis, J. Orjala, S. Mo, R. Ortenberg, P. O'Connor, C. Zhao, P. Vouros, T. Kaeberlein, und S. S. Epstein.** (2008) Short peptide induces an "uncultivable" microorganism to grow in vitro. *Appl Environ Microbiol* **74**:4889-4897.
- Otten, L. G., M. L. Schaffer, B. R. Villiers, T. Stachelhaus, und F. Hollfelder.** (2007) An optimized ATP/PP(i)-exchange assay in 96-well format for screening of adenylation domains for applications in combinatorial biosynthesis. *Biotechnol J* **2**:232-240.
- Palenik, B., Q. Ren, V. Tai, und I. T. Paulsen.** (2009) Coastal Synechococcus metagenome reveals major roles for horizontal gene transfer and plasmids in population diversity. *Environ Microbiol* **11**:349-359.
- Pearson, A., M. Budin, und J. J. Brocks.** (2003) Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium Gemmata obscuriglobus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**:15352-15357.
- Pereda, A., R. G. Summers, D. L. Stassi, X. Ruan, und L. Katz.** (1998) The loading domain of the erythromycin polyketide synthase is not essential for erythromycin biosynthesis in *Saccharopolyspora erythraea*. *Microbiology* **144 (Pt 2)**:543-553.
- Piel, J.** (2009) Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat Prod Rep* **26**:338-362.
- Piel, J., D. Hui, G. Wen, D. Butzke, M. Platzer, N. Fusetani, und S. Matsunaga.** (2004) Antitumor polyketide biosynthesis by an uncultivated bacterial symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:16222-16227.
- Pilhofer, M., K. Rappl, C. Eckl, A. P. Bauer, W. Ludwig, K. H. Schleifer, und G. Petroni.** (2008) Characterization and evolution of cell division and cell wall synthesis genes in the bacterial phyla Verrucomicrobia, Lentisphaerae, Chlamydiae, and Planctomycetes and phylogenetic comparison with rRNA genes. *Journal of Bacteriology* **190**:3192-3202.

- Podar, M., C. B. Abulencia, M. Walcher, D. Hutchison, K. Zengler, J. A. Garcia, T. Holland, D. Cotton, L. Hauser, und M. Keller.** (2007) Targeted access to the genomes of low-abundance organisms in complex microbial communities. *Appl Environ Microbiol* **73**:3205-3214.
- Preston, C. M., K. Y. Wu, T. F. Molinski, und E. F. DeLong.** (1996) A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**:6241-6246.
- Proksch, S.** (2008) Diversity and functional analysis of non ribosomal peptide synthetase genes in microbial consortia associated with marine sponges. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Raghunathan, A., H. R. Ferguson, Jr., C. J. Bornarth, W. Song, M. Driscoll, und R. S. Lasken.** (2005) Genomic DNA amplification from a single bacterium. *Appl Environ Microbiol* **71**:3342-3347.
- Rappe, M. S., und S. J. Giovannoni.** (2003) The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* **57**:369-394.
- Rausch, C., T. Weber, O. Kohlbacher, W. Wohlleben, und D. H. Huson.** (2005) Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). *Nucleic Acids Res* **33**:5799-5808.
- Reiswig, H. M.** (1974) Water Transport Respiration and Energetics of 3 Tropical Marine Sponges. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **14**:231-249.
- Reva, O. N., und B. Tumber.** (2005) Differentiation of regions with atypical oligonucleotide composition in bacterial genomes. *BMC Bioinformatics* **6**:251.
- Richter, M., T. Lombardot, I. Kostadinov, R. Kottmann, M. B. Duhaime, J. Peplies, und F. O. Glockner.** (2008) JCoast - a biologist-centric software tool for data mining and comparison of prokaryotic (meta)genomes. *BMC Bioinformatics* **9**:177.
- Ruby, E. G., und L. M. Asato.** (1993) Growth and flagellation of *Vibrio fischeri* during initiation of the sepiolid squid light organ symbiosis. *Arch Microbiol* **159**:160-167.
- Scheuermayer, M.** (2006) Phylogenie, Sekundärmetabolismus und biotechnologisches Potential mariner, Schwamm-assoziiierter Mikroorganismen. Dissertation, Universität Würzburg.
- Scheuermayer, M., T. A. Gulder, G. Bringmann, und U. Hentschel.** (2006 a) *Rubritalea marina* gen. nov., sp. nov., a marine representative of the phylum 'Verrucomicrobia', isolated from a sponge (Porifera). *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:2119-2124.

- Scheuermayer, M., S. M. Pimentel-Elardo, L. Fieseler, L. Grozdanov, und U. Hentschel.** (2006 b) Microorganisms of sponges: Phylogenetic diversity and biotechnological potential. In *Frontiers in marine biotechnology*. Proksch, P. und Müller, W. E. G. (eds). Horizon Scientific Press UK, pp. 289-312.
- Schiller, R.** (2006) Untersuchungen zur Bakterienhaltigkeit in karibischen Schwämmen und ausgewählten Reproduktionsstadien. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Schirmer, A., R. Gadkari, C. D. Reeves, F. Ibrahim, E. F. DeLong, und C. R. Hutchinson.** (2005) Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*. *Appl Environ Microbiol* **71**:4840-4849.
- Schleper, C., E. F. DeLong, C. M. Preston, R. A. Feldman, K. Y. Wu, und R. V. Swanson.** (1998) Genomic analysis reveals chromosomal variation in natural populations of the uncultured psychrophilic archaeon *Cenarchaeum symbiosum*. *Journal of Bacteriology* **180**:5003-5009.
- Schloss, P. D., und J. Handelsman.** (2005) Metagenomics for studying unculturable microorganisms: cutting the Gordian knot. *Genome Biol* **6**:229.
- Schmitt, S., H. Angermeier, R. Schiller, N. Lindquist, und U. Hentschel.** (2008) Molecular microbial diversity survey of sponge reproductive stages and mechanistic insights into vertical transmission of microbial symbionts. *Appl Environ Microbiol.* **74**:7694-7708.
- Schmitt, S., M. Wehrl, K. Bayer, A. Siegl, und U. Hentschel.** (2007 a) Marine Sponges as models for commensal microbe-host interactions. *Symbiosis* **44**:43-50.
- Schmitt, S., J. B. Weisz, N. Lindquist, und U. Hentschel.** (2007 b) Vertical transmission of a phylogenetically complex microbial consortium in the viviparous sponge *Ircinia felix*. *Appl Environ Microbiol* **73**:2067-2078.
- Schut, F., E. J. de Vries, J. C. Gottschal, B. R. Robertson, W. Harder, R. A. Prins, und D. K. Button.** (1993) Isolation of Typical Marine Bacteria by Dilution Culture: Growth, Maintenance, and Characteristics of Isolates under Laboratory Conditions. *Appl Environ Microbiol* **59**:2150-2160.
- Sciscioli, M., D. Ferri, G. E. Liquori, E. Lepore, und G. Santarelli.** (2000) Lectin histochemistry and ultrastructure of microgranular cells in *Cinachyra tarentina* (Porifera, Demospongiae). *Acta Histochem* **102**:219-230.
- Sekiguchi, Y., T. Yamada, S. Hanada, A. Ohashi, H. Harada, und Y. Kamagata.** (2003) *Anaerolinea thermophila* gen. nov., sp. nov. and *Caldilinea aerophila* gen. nov., sp. nov., novel filamentous thermophiles that represent a previously uncultured lineage of the domain Bacteria at the subphylum level. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**:1843-1851.

- Sharp, K. H., B. Eam, D. J. Faulkner, und M. G. Haygood.** (2007) Vertical transmission of diverse microbes in the tropical sponge *Corticium* sp. *Appl Environ Microbiol* **73**:622-629.
- Shinzato, N., M. Muramatsu, T. Matsui, und Y. Watanabe.** (2005) Molecular phylogenetic diversity of the bacterial community in the gut of the termite *Coptotermes formosanus*. *Biosci Biotechnol Biochem* **69**:1145-1155.
- Siegl, A., K. Bayer, S. Kozytska, U. Hentschel, und S. Schmitt.** (2008) Sponges and Microbes - New Frontiers in an Ancient Symbiosis. *Vie et Milieu* **58**:165-174.
- Silakowski, B., B. Kunze, G. Nordsiek, H. Blocker, G. Hofle, und R. Muller.** (2000) The myxochelin iron transport regulon of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Eur J Biochem* **267**:6476-6485.
- Staley, J. T., H. Bouzek, und C. Jenkins.** (2005) Eukaryotic signature proteins of *Prostheco bacter dejongeei* and Gemmata sp. Wa-1 as revealed by in silico analysis. *FEMS Microbiol Lett* **243**:9-14.
- Staley, J. T., und A. Konopka.** (1985) Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* **39**:321-346.
- Stangel, D.** (2008) Charakterisierung von Schwamm-assoziierten Bakterien aus *Aplysina aerophoba* mittels "single-cell-genomic"-Technik. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Stepanauskas, R., und M. E. Sieracki.** (2007) Matching phylogeny and metabolism in the uncultured marine bacteria, one cell at a time. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:9052-9057.
- Stingl, U., J. C. Cho, W. Foo, K. L. Vergin, B. Lanoil, und S. J. Giovannoni.** (2008) Dilution-to-extinction culturing of psychrotolerant planktonic bacteria from permanently ice-covered lakes in the McMurdo Dry Valleys, Antarctica. *Microb Ecol* **55**:395-405.
- Strous, M., E. Pelletier, S. Mangenot, T. Rattei, A. Lehner, M. W. Taylor, M. Horn, H. Daims, D. Bartol-Mavel, P. Wincker, V. Barbe, N. Fonknechten, D. Vallenet, B. Segurens, C. Schenowitz-Truong, C. Medigue, A. Collingro, B. Snel, B. E. Dutilh, H. J. Op den Camp, C. van der Drift, I. Cirpus, K. T. van de Pas-Schoonen, H. R. Harhangi, L. van Niftrik, M. Schmid, J. Keltjens, J. van de Vossenberg, B. Kartal, H. Meier, D. Frishman, M. A. Huynen, H. W. Mewes, J. Weissenbach, M. S. Jetten, M. Wagner, und D. Le Paslier.** (2006) Deciphering the evolution and metabolism of an anammox bacterium from a community genome. *Nature* **440**:790-794.
- Suzuki, M. T., und S. J. Giovannoni.** (1996) Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. *Appl Environ Microbiol* **62**:625-630.

- Taylor, M. W., R. Radax, D. Steger, und M. Wagner.** (2007) Sponge-associated microorganisms: evolution, ecology, and biotechnological potential. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**:295-347.
- Teeling, H., J. Waldmann, T. Lombardot, M. Bauer, und F. O. Glockner.** (2004) TETRA: a web-service and a stand-alone program for the analysis and comparison of tetranucleotide usage patterns in DNA sequences. *BMC Bioinformatics* **5**:163.
- Thacker, R. W.** (2005) Impacts of shading on sponge-Cyanobacteria symbioses: A comparison between host-specific and generalist associations. *Integrative and Comparative Biology* **45**:369-376.
- Thoms, C., R. Ebel, und P. Proksch.** (2006) Activated chemical defense in Aplysina sponges revisited. *Journal of chemical ecology* **32**:97-123.
- Thoms, C., M. Wolff, K. Padmakumar, R. Ebel, und P. Proksch.** (2004) Chemical defense of Mediterranean sponges *Aplysina cavernicola* and *Aplysina aerophoba*. *Z Naturforsch [C]* **59**:113-122.
- Toledo, G., B. Palenik, und B. Brahmsha.** (1999) Swimming marine *Synechococcus* strains with widely different photosynthetic pigment ratios form a monophyletic group. *Appl Environ Microbiol* **65**:5247-5251.
- Vacelet, J.** (1970) Description de cellules a bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *J. Microscopie* **9**:333-346.
- Vacelet, J.** (1971) Étude en microscopie électronique de l'association entre une cyanophycée *Chroococcale* et une éponge du genre *Verongia*. *J. Microscopie T.* **12**:363-380.
- Vacelet, J.** (1975) Étude en microscopie électronique de l'association entre bactéries et spongiaires du genre *Verongia* (Dictyoceratida). *J. Microsc. Biol. Cell.* **23**:271-288.
- Vieites, J. M., M. E. Guazzaroni, A. Beloqui, P. N. Golyshin, und M. Ferrer.** (2009) Metagenomics approaches in systems microbiology. *FEMS Microbiol Rev* **33**:236-255.
- Wagner, M., und M. Horn.** (2006) The Planctomycetes, Verrucomicrobia, Chlamydiae and sister phyla comprise a superphylum with biotechnological and medical relevance. *Curr Opin Biotechnol* **17**:241-249.
- Wallner, G., B. Fuchs, S. Spring, W. Beisker, und R. Amann.** (1997) Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. *Appl Environ Microbiol* **63**:4223-4231.
- Webster, N. S., R. E. Cobb, und A. P. Negri.** (2008 a) Temperature thresholds for bacterial symbiosis with a sponge. *ISME J* **2**:830-842.
- Webster, N. S., und R. T. Hill.** (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., J. R. Xavier, M. Freckelton, C. A. Motti, and R. Cobb.** (2008 b) Shifts in microbial and chemical patterns within the marine sponge *Aplysina aerophoba* during a disease outbreak. *Environ Microbiol* **10**:3366-3376.
- Wehrl, M.** (2001) Untersuchungen zur Interaktion des marinen Schwammes *A. aerophoba* mit assoziierten Mikroorganismen. Diplomarbeit, Universität Würzburg.
- Wehrl, M.** (2006) Bakterielle Aufnahme, Selektivität und interne Prozessierung bei marinen Schwämmen (Porifera) Dissertation, Universität Würzburg.
- Wehrl, M., M. Steinert, and U. Hentschel.** (2007) Bacterial uptake by the marine sponge *Aplysina aerophoba*. *Microb Ecol* **53**:355-365.
- Weinberg, M. V., and R. J. Maier.** (2007) Peptide transport in *Helicobacter pylori*: roles of dpp and opp systems and evidence for additional peptide transporters. *Journal of Bacteriology* **189**:3392-3402.
- Weisz, J. B., N. Lindquist, and C. S. Martens.** (2008) Do associated microbial abundances impact marine demosponge pumping rates and tissue densities? *Oecologia* **155**:367-376.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Sonnenberg, and F. R. Blattner.** (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:17020-17024.
- Wilkinson, C. R.** (1978) Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar. Biol.* **49**:161-167.
- Wilkinson, C. R.** (1983) Net Primary Productivity in Coral Reef Sponges. *Science (Washington D C)* **219**:410-412.
- Wilkinson, C. R., R. Garrone, and J. Vacelet.** (1984) Marine Sponges Discriminate between Food Bacteria and Bacterial Symbionts Electron Microscope Radioautography and in-Situ Evidence. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences* **220**:519-528.
- Willenz, P., and W. D. Hartman.** (1989) Micromorphology and ultrastructure of Caribbean sclerosponges I. *Ceratoporella nicholsoni* and *Stromatospongia norae* (Ceratoporellidae Porifera). *Mar Biol* **103**:387-402.
- Yamada, T., Y. Sekiguchi, S. Hanada, H. Imachi, A. Ohashi, H. Harada, and Y. Kamagata.** (2006) *Anaerolinea thermolimosa* sp. nov., *Levilinea saccharolytica* gen. nov., sp. nov. and *Leptolinea tardivitalis* gen. nov., sp. nov., novel filamentous anaerobes, and description of the new classes *Anaerolineae* classis nov. and *Caldilineae* classis nov. in the bacterial phylum Chloroflexi. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**:1331-1340.

Zhang, H., W. Zhang, Y. Jin, M. Jin, und X. Yu. (2008) A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**:241-248.

Zhang, K., A. C. Martiny, N. B. Reppas, K. W. Barry, J. Malek, S. W. Chisholm, und G. M. Church. (2006) Sequencing genomes from single cells by polymerase cloning. *Nat Biotechnol* **24**:680-686.

Zhu, P., Q. Li, und G. Wang. (2008) Unique microbial signatures of the alien Hawaiian marine sponge *Suberites zeteki*. *Microb Ecol* **55**:406-414.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AIX	Ampicillin-, IPTG- und X-Gal enthaltendes Nährmedium
AS	Aminosäure
ASW	künstliches Meerwasser
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
CMF-ASW	Calcium- / Magnesium-freies, künstliches Meerwasser
DAPI	Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
<i>et al.</i>	„ <i>et altera</i> “ (und weitere)
EtOH	Ethanol
EtOH _{abs}	absolutes Ethanol
FACS	„fluorescence activated cell sorting“ (Durchflusszytometrie)
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
g	Gramm
x g	Erdbeschleunigung (9,81 m / sec)
Gb	Gigabasen
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O _d	destilliertes Wasser
i.d.R.	in der Regel
H ₂ O _{dd}	doppelt destilliertes Wasser
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
l	Liter
μ	Mikro (10 ⁻⁶)
m	Milli (10 ⁻³)
m	Meter
M	molar
Mb	Megabasen
MDA	„multiple displacement amplification“

min	Minute
Mio.	Million (10 ⁶)
MO	Mikroorganismen
mol	Mol
mRNA	„messenger“ RNA (Boten-RNA)
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“ (offener Leseraster)
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	„polymerase chain reaction“ (Polymerasekettenreaktion)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rDNA	ribosomale DNA
RFLP	Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	„rounds per minute“ (Umdrehungen pro Minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAG	„single amplified genome“ (amplifiziertes Einzelgenom)
SAPs	„sponge associated prokaryotes“ (Schwamm-assoziierte Prokaryonten)
SDS	„Sodium dodecylsulfat“
sec	Sekunde
S	Sedimentationskoeffizient
sog.	sogenannt
sp.	„species“ (Art)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
tRNA	„Transfer“-RNA
u.a.	unter anderem
U	Unit
ÜN	über Nacht
V	Volt
Vol.	Volumen
v / v	„volume to volume“
WGA	„whole genome amplification“ (Gesamtgenom-Amplifizierung)
X-Gal	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

8.2. Geräte, Materialien, Chemikalien, Enzyme, Kits

Tabelle 8-1: Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller	Artikelbezeichnung
Autoklaven	Fedegari	Tec 120, 9191E, FV 3.3
	H+P Labortechnik	Varioklav 500, 135S
Brutschrank	Heraeus	Kelvitron t
	Memmert	TV 40b
Destillieranlage für H ₂ O _{dd}	GFL	Bi-Dest 2304
Einmalküvetten	Plastibrand	Halbmikro 1,5 ml
Eismaschine	Scotsman	AF-20
Elektrophoresekammern	BioRad	-
Elektroporationsgerät	EquiBio	Easyject PRIMA
Elektroporationsküvetten	EquiBio	EPC 102
FACS	Becton Dickinson	Vantage SE mit FACSDiVa Option
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Axiolab
Gefrierschränke		
-20 °C	Nunc	QBF 2185V36
-80 °C	Kendro	Queue Basic QBF 2585V36
Geldokumentation	BioRad	Gel Doc 2000
Heizblock	Laboratory Devices	Digi-Block Jr.
Heizplatte mit Magnetrührer	Labinco	L32
Hybridisierungsöfen	Memmert	BE 200
Kühlschrank	Privileg	Superöko
Mikropipetten	Brand	Transferpette S (0,5-10 µl)
	Eppendorf	Research 2-20 µl
		Research 20-200 µl
		Research 100-1000 µl
Mikrotiterplatten (48-; 96-; 384-wells)	Nunc	-
Mikrowelle	Privileg	8020
Mörser	Hartenstein	MÖ10
Netzgeräte (Elektrophorese)	BioRad	Power Pac 300

Geräte	Hersteller	Artikelbezeichnung
Nitex-Netz	Hartenstein	-
Parafilm	Pechiney	4 Inch x 125 Fuß
PCR-Cycler	Biometra	T3-Thermocycler
Petrischalen quadratisch (500 cm ²)	Nalgen Nunc International	Nunclon
Petrischalen rund (56,7 cm ²)	Greiner	-
Pistill	Hartenstein	PIS3
pH-Meter Elektrode	WTW	MultiLine P4
Photometer	Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000
Reaktionsgefäße	Sarstedt	1,5 ml; 2 ml
	Abgene	0,5 ml Thermo tubes
	Abgene	0,5 ml Thermo stripes
	Greiner	15 ml, 50 ml Bio-one Cellstar
Replikastempel	Nalgen Nunc International	384 pin replicator
Schüttler	Braun	Certomat U
	Edmund Bühler	SM-30
	Eppendorf	Rotationsmischer 3300
	Infors	HT
	New Brunswick	Innova 4230, 4300
	Renner	Celloshaker Variospeed
	Variotime	
Sequencer	Applied Biosystems	ABI Prism 310 Genetic Analyser
	Roche	Genome Sequencer FLX
Spektrophotometer	Pharmacia Biotech	Ultraspec 3000
	PeqLab	NanoDrop ND1000
Sterilbank Klasse 2	Heraeus	HERA safe HS 12
Sterilfilter	Millipore	Millex-GS 0,22 µm
	Nunc	Bottletop filter
Transilluminationstisch UV	Brunschwig Chemie	N-90M, 6 x 15W
UV-Crosslinker	BioRad	GS GeneLinker
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2

Fortsetzung Tabelle 8-1: Geräte und Materialien

Geräte	Hersteller	Artikelbezeichnung
Waagen	Chyo	JL-180
	Kern	470-36
	Ohaus	Navigator
Zentrifugen	Heraeus	Biofuge pico
	Heraeus	Biofuge 13
	Heraeus	Megafuge 1.0R

Fortsetzung Tabelle 8-1: Geräte und Materialien

Tabelle 8-2: Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar, granuliert	Difco
Agarose, ultrapure	Gibco
Agarose, low melt	BioRad
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Roth
Ampicillin	AppliChem
Borsäure (H ₃ BO ₃)	AppliChem
5-Bromo-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactopyranosid (X-Gal)	Sigma
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem
Chloroform (CHCl ₃)	Roth
Diamino-2-Phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Sigma
Essigsäure	AppliChem
Ethanol, absolut (EtOH)	Merck
Ethanol, vergällt (EtOH)	Roth
Ethidiumbromid- (EtBr-) Lösung (1 %)	Roth
Ethylendiaminteraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O)	Serva
para-Formaldehyd (PFA)	Serva
Formaldehyd (FA) (37 %)	Sigma
Glycerin (HOCH ₂ -CHOH-CH ₂ OH) (86 %)	Roth
Hefeextrakt	Gibco
HiDi-Formamid	Applied Biosystems
Isopropanol ((CH ₃) ₂ CHOH)	Roth
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma

Bezeichnung	Hersteller
Kaliumbromid (KBr)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	Fluka
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Roth
Dikaliumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄)	Roth
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O)	AppliChem
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ x 7 H ₂ O)	AppliChem
Natriumacetat-Trihydrat (NaAc x 3 H ₂ O)	AppliChem
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem
Natriumfluorid (NaF)	Fluka
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O)	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	AppliChem
Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄)	Merck
Phenol (Roti-Aqua-Phenol)	Roth
Salzsäure (HCl)	AppliChem
Strontiumchlorid-Hexahydrat (SrCl ₂ x 6 H ₂ O)	Fluka
Tris(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Hydrochlorid (Tris / HCl)	Sigma
Trizma Hydrochlorid	Sigma
Trypton/Pepton aus Casein	Roth
Zinkchlorid (ZnCl ₂)	Roth
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO ₄ x 7 H ₂ O)	Sigma

Fortsetzung Tabelle 8-2: Chemikalien

Tabelle 8-3: Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
DNA Polymerase I	New England Biolabs
FastDigest Restriktionsenzyme	Fermentas
Lysozym	Sigma
Proteinase K	Sigma
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
RNase A aus Rinderpankreas	Roche
S1-Nuklease	USB
T4 DNA Polymerase	New England Biolabs
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen

Tabelle 8-4: Reaktionskits

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen
EasyPrep Pro-Kit	Biozym
Fast DNA Spin Kit (for soil)	MP Biomedicals
pGEM-T easy Vector System	Promega
pGEM-T Vector System	Promega
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen
REDTaq ReadyMix PCR Reaction Mix	Sigma
REPLI-g Mini Kit	Qiagen
REPLI-g Midi Kit	Qiagen
pWEB Cosmid Cloning Kit	Epicentre

8.3. Lösungen, Medien, Puffer

- Artificial Sea Water (ASW)

NaCl	234.7 g
Na ₂ SO ₄	39.2 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	106.4 g
CaCl ₂	11.0 g
NaHCO ₃	1.92 g
KCl	6.64 g
KBr	0.96 g
H ₃ BO ₃	0.26 g
SrCl ₂	0.24 g
NaF	0.03 g
H ₂ O _d	ad 10 l

- CMF-ASW

ASW, jedoch ohne die Salze CaCl ₂ und MgCl ₂	
--	--

- Denaturierungspuffer

KOH	2.2 g
0.5M EDTA	2 ml
H ₂ O _d	ad 100 ml

- Ethidiumbromid-Färbebad

1 % EtBr-Lösung	0.2 ml
H ₂ O _d	ca. 500 ml

- Luria-Bertani (LB)-Medium

Hefeextrakt	5.0 g
Pepton	10.0 g
NaCl	5.0 g
H ₂ O _d	ad 1.0 l
(Agar)	15.0 g

- LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar (AIX)

10% Ampicillin-Lösung	1.0 ml
1M IPTG-Lösung	1.0 ml
5% X-Gal-Lösung	1.26 ml
LB-Agar	1.0 l

- ‚phage dilution buffer‘

1M Tris-HCl pH 8.3	1 ml
5M NaCl	2 ml
1M MgCl ₂	1 ml
H ₂ O _d	ad 100 ml

• 10 x PBS Puffer	NaCl	40.0 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	6.25 g
	KH ₂ PO ₄	1.0 g
	KCl	1.0 g
	H ₂ O _d	ad 500 ml
	mit HCl auf pH 7.2 einstellen	
• Plasmid-Mini-Präparation		
Puffer 1	1M Tris-HCl, pH 7.5	5.0 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	2.0 ml
	RNase 10 mg/ml	1.0 ml
	H ₂ O _d	ad 100 ml
Puffer 2	NaOH	0.8 g
	SDS	1.0 g
	H ₂ O _d	ad 100 ml
Puffer 3	NaAc x 3 H ₂ O	40.8 g
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
	pH 4.8 einstellen	
• S1-Nuklease-Puffer	3M NaAc pH 4.5	1 ml
	5M NaCl	1 ml
	0.1M ZnCl ₂	1 ml
	H ₂ O _d	ad 100 ml
• SOB-Medium	SOC-Medium, jedoch ohne Glucose	
• SOC-Medium	Pepton	2.0 g
	Hefeextrakt	0.5 g
	1M NaCl	1 ml
	1M KCl	1 ml
	2M MgCl	1 ml
	2M Glucose	1 ml
	H ₂ O _{dd}	ad 100 ml
• Stopp-Puffer	Bromphenolblau	25.0 mg
	Xylencyanol	25.0 mg
	Ficoll Type 400	2.5 g
	H ₂ O _d	ad 10 ml

• 50 x TAE	Tris/HCl	242.0 g/l
	Essigsäure	57.1 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	100.0 ml
	H ₂ O _d	ad 1000 ml
• TB	0.5M PIPES	40 ml
	CaCl ₂	2.2 g
	KCl	11.2 g
	H ₂ O _d	800 ml
	pH auf 6.8 mit 1M KOH einstellen, dann Zugabe von	
	MnCl ₂	10.9 g
	H ₂ O _d	ad 1000 ml
• TE	1M Tris/HCl, pH 8.0	1 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	0.2 ml
	H ₂ O _d	ad 100 ml
• TNE	1M Tris/HCl, pH 8.0	1 ml
	5M NaCl	0.2 ml
	0.5M EDTA, pH 8.0	2 ml
	H ₂ O _d	ad 100 ml
• TNEX	TNE	99 ml
	TritonX 100	1 ml
• Vitaminlösung	Inosit	1.0 g
	Thiamin	2.0 g
	B12	1.0 mg
	Biotin	1.0 mg
	Folsäure	2.0 mg
	PABA	10.0 mg
	Niacin	0.1 g
	Pantothenat	0.2 g
	Pyridoxin	0.1 g
H ₂ O _d	ad 1000 ml	
• Zobell-Medium	Hefeextrakt	1.0 g
	Pepton	5.0 g
	3 Teile ASW, 1 Teil H ₂ O _d	ad 1000 ml

Tabelle 8-5: Medienkomposition der 48 Platten des zweiten Kultivierungsansatzes. Abkürzungen: N/P niedrig: 5 μM PO_4^{3-} , 10 μM NH_4^+ ; N/P hoch: 10 μM PO_4^{3-} , 100 μM NH_4^+ ; aut: autoklaviert; filt: sterilfiltriert; Lysat 1: autoklaviert und sterilfiltriert, Endkonzentration 0,01 %; Lysat 2: nur sterilfiltriert, Endkonzentration 0,05 %.

Platte #	N/P hoch/niedrig	Meerwasser aut/filt	Lysat	Inoculumart	Inoculumgröße
1	hoch	aut+filt	ohne	gesamt	10
2	hoch	aut+filt	ohne	gesamt	100
3	hoch	aut+filt	ohne	SAPs	10
4	hoch	aut+filt	ohne	SAPs	100
5	hoch	aut+filt	1	gesamt	10
6	hoch	aut+filt	1	gesamt	100
7	hoch	aut+filt	1	SAPs	10
8	hoch	aut+filt	1	SAPs	100
9	hoch	aut+filt	2	gesamt	10
10	hoch	aut+filt	2	gesamt	100
11	hoch	aut+filt	2	SAPs	10
12	hoch	aut+filt	2	SAPs	100
13	hoch	filt	ohne	gesamt	10
14	hoch	filt	ohne	gesamt	100
15	hoch	filt	ohne	SAPs	10
16	hoch	filt	ohne	SAPs	100
17	hoch	filt	1	gesamt	10
18	hoch	filt	1	gesamt	100
19	hoch	filt	1	SAPs	10
20	hoch	filt	1	SAPs	100
21	hoch	filt	2	gesamt	10
22	hoch	filt	2	gesamt	100
23	hoch	filt	2	SAPs	10
24	hoch	filt	2	SAPs	100
25	niedrig	aut+filt	ohne	gesamt	10
26	niedrig	aut+filt	ohne	gesamt	100
27	niedrig	aut+filt	ohne	SAPs	10
28	niedrig	aut+filt	ohne	SAPs	100
29	niedrig	aut+filt	1	gesamt	10
30	niedrig	aut+filt	1	gesamt	100
31	niedrig	aut+filt	1	SAPs	10
32	niedrig	aut+filt	1	SAPs	100
33	niedrig	aut+filt	2	gesamt	10
34	niedrig	aut+filt	2	gesamt	100
35	niedrig	aut+filt	2	SAPs	10
36	niedrig	aut+filt	2	SAPs	100
37	niedrig	filt	ohne	gesamt	10
38	niedrig	filt	ohne	gesamt	100
39	niedrig	filt	ohne	SAPs	10
40	niedrig	filt	ohne	SAPs	100
41	niedrig	filt	1	gesamt	10
42	niedrig	filt	1	gesamt	100
43	niedrig	filt	1	SAPs	10
44	niedrig	filt	1	SAPs	100
45	niedrig	filt	2	gesamt	10
46	niedrig	filt	2	gesamt	100
47	niedrig	filt	2	SAPs	10
48	niedrig	filt	2	SAPs	100

8.4. Verwendete Mikroorganismen und Vektoren

Escherichia coli Stamm DH5 α (als Kontrolle für die FACS-Sortierung):

Genotyp: *fhuA2* Δ (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44* Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*

Escherichia coli Stamm Novablue (zur Klonierung von PCR-Produkten):

Genotyp: *endA1 hsdR17* ($r_{K12}^- m_{K12}^+$) *supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* F'[*proA⁺B⁺ lacI^fZDM15::Tn10*] (Tet^R)

Escherichia coli Stamm XL1 blue (zur Klonierung von PCR-Produkten):

Genotyp: *endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44* F'[*::Tn10 proAB⁺ lacI^f Δ (lacZ)M15*] *hsdR17(r_K⁻ m_K⁺)*

Escherichia coli Stamm EPI100TM-T1R (Epicentre; für die Konstruktion der Cosmidbank):

Genotyp: *F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) f80dlacZDM15 DlacX74 recA1 endA1 araD139 D(ara, leu)7697 galU galK l- rpsL nupG tonA*

Die im Verlauf dieser Doktorarbeit verwendeten Vektoren sind in den Abbildungen 8-1 bis 8-3 schematisch dargestellt.

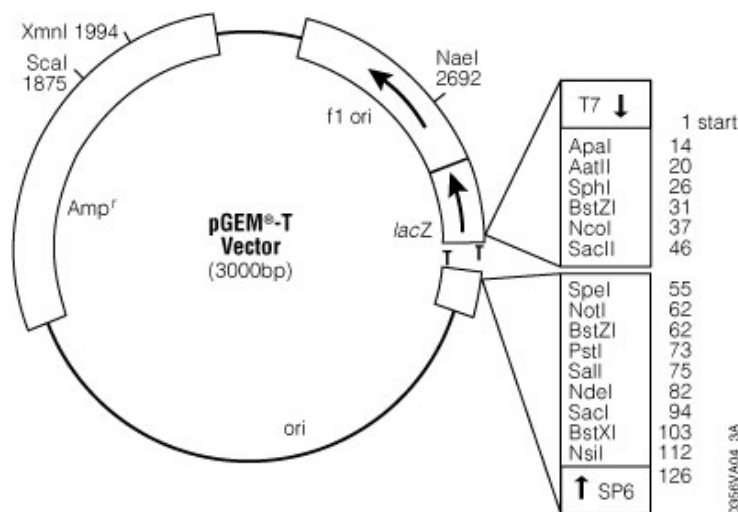


Abb. 8-1: Der Vektor pGEM-T (Promega).

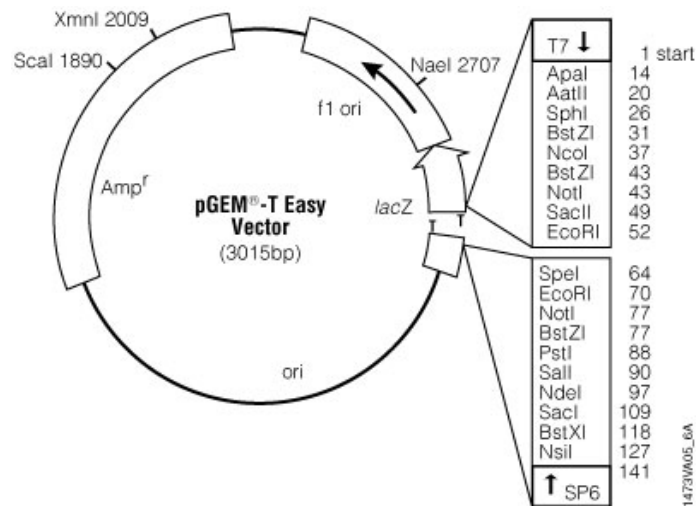


Abb. 8-2: Der Vektor pGEM-T Easy (Promega).

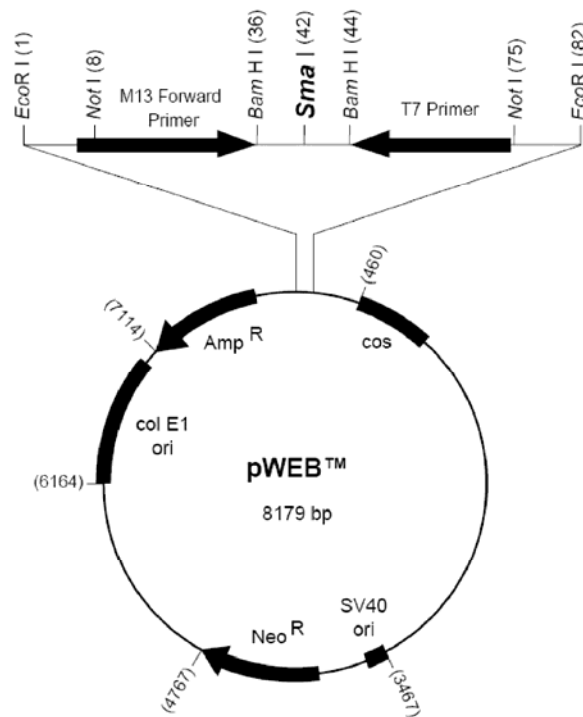


Abb. 8-3: Schematische Darstellung des Cosmids pWEB (Epicentre).

8.5. Verwendete Oligonukleotide

Sämtliche im Rahmen dieser Studie verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) synthetisiert. Das Primerpaar TK23for2/TK23rev2 wurde mit Hilfe des Online-Tools ‚Primer3‘ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) konzipiert. Eine vollständige Primerliste ist in Tabelle 8-6 dargestellt.

Tabelle 8-6: Verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz 5' - 3'	Methode	Annealing [°C]	Fragment [bp]	Zielstruktur	Spezifität	Referenz
27f	GAGTTTGATCCTGGCTCA	PCR	56	ca. 1470	16S rDNA	Eubacteria	Lane (1991)
1492r	TACGGYTACCTTGTTACGACTT						
27f-B	AGRGTTYGATYMTGGCTCAG	nested-PCR	55	ca. 1380 (27f/1406r)	16S rDNA	Eubacteria	Cho und Giovannoni (2004)
1406r	ACGGGCGGTGTGTRC						
1492r-B	GGYTACCTTGTTACGACTT						
341f	CCTACTGGAGGCAGCAG	Sequenzierung	54	--	16S rDNA	Eubacteria	Muyzer <i>et al.</i> (1998)
907r	CCGTCAATTCMTTGGAGTTT	Sequenzierung	53	--	16S rDNA	Eubacteria	Muyzer <i>et al.</i> (1998)
389f	ACGATGCGACGCCGCGTG	PCR	68	ca. 780	16S rDNA	<i>Poribacteria</i>	Fieseler <i>et al.</i> (2004)
1130r	GGCTCGTCACCAGCGGTC						
Arch21f	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA	PCR	56	ca. 930	16S rDNA	Archaea	DeLong (1992)
Arch958r	YCCGGCGTTGAMTCCAATT						
A	CCGAATTCGTCGACAACCTGGTTG ATCCTGCCAGT	PCR	55	ca. 1100	18S rDNA	Eukarya	Medlin <i>et al.</i> (1988)
B	CCCGGGATCCAAGCTTGATCCTTC TGCAGGTTACCTAC						
TK23for2	GAAGAACACCAGAGGCGAAG	PCR	58	ca. 540	16S rDNA	<i>Chloroflexi</i> TK23 Klade	diese Arbeit
TK23rev2	GCTTCCCTTTGTACCAACCA						
SP6	GATTTAGGTGACACTATAGAATA	colony-PCR; Sequenzierung	45	--	Vektor	pGEM-T (Easy)	Promega
T7	GAATTGTAATACGACTCACTATAG	colony-PCR; Sequenzierung	50	--	Vektor	pGEM-T (Easy)	Promega
M13	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Endsequenzierung	60	--	Vektor	pWEB	Epicentre
T7(pWEB)	TAATACGACTCACTATAGGGAGA	Endsequenzierung	52	--	Vektor	pWEB	Epicentre
A3	GCSTACSYSATSTACACSTCSG	PCR	59	ca. 700	A-Domäne	NRPS-Gene	Ayuso-Sacido und Genilloud (2005)
A7R	SASGTCVCCSGTSCGGTAS						
KSDPQQF	MGNGARGCENNWSMNATGGAYC CNCARCANMG	PCR	64	ca. 750	KS-Domäne	PKS-Gene (Typ I)	Fieseler <i>et al.</i> (2007)
KSHGTGR	GGRTCNCNARNSWNGTNCNGT NCCRTG						

8.6. Größenstandards für Gelelektrophoresen

DNA-Marker für Gelelektrophoresen wurden von der Firma Fermentas bezogen und sind in Abbildung 8-4 dargestellt.

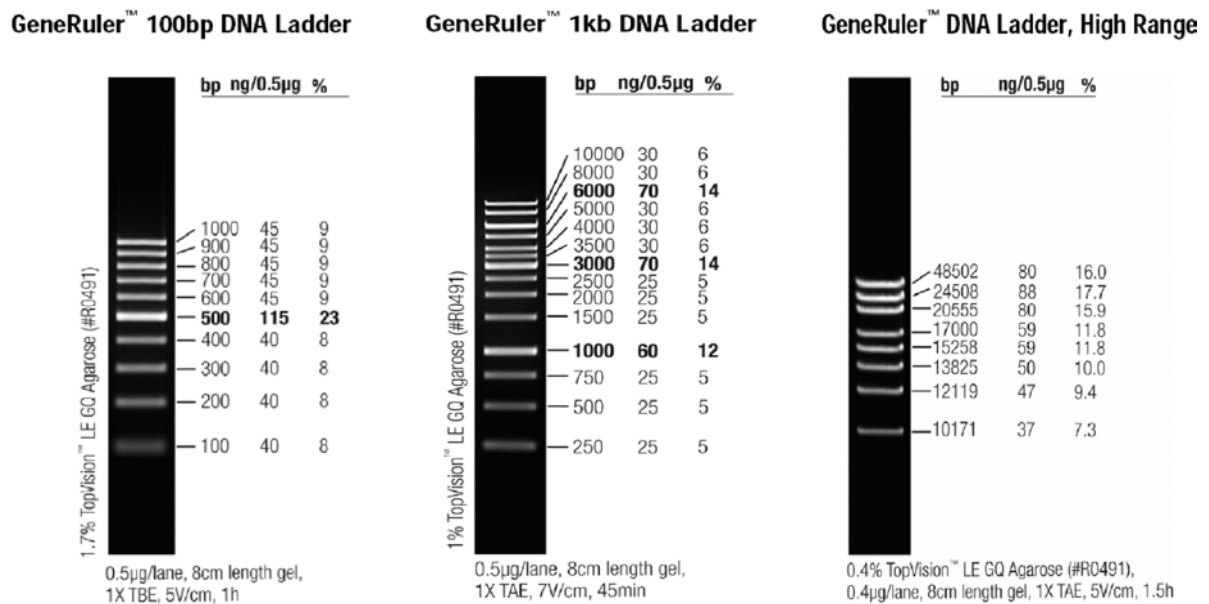


Abb. 8-4: Größenstandards für Gelelektrophoresen.

8.7. Programme, Software, Online-Tools

Sämtliche, für die Analyse der Cosmidsequenzen und 454-Daten verwendeten Programme und Online-Tools sind unter Angabe der Internetquelle bzw. der zugehörigen Referenz in Tabelle 8-7 aufgelistet.

Tabelle 8-7: Programme, Software, Online-Tools

Programm	Anwendung	Referenz
ABI Prism Software	Auswertung und Darstellung von Sequenz-Chromatogrammen	http://www.appliedbiosystems.com/support/software/3100/conversion.cfm
Align (Version 08/2003)	Sequenzalignments	Hepperle (2002)
ARB	Berechnung phylogenetischer Stammbäume basierend auf 16S rRNA Nukleotidsequenzen	http://www.arb-home.de/
Artemis 10	Analyse von DNA-Fragmenten; ORF-Vorhersage	http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/
ASMPKS	Analyse von PKS-Genen	http://gate.smallsoft.co.kr:8008/~hstae/asmprs/index.html
Basic Local Alignment Search Tool (Blast)	Nucleotid- und Aminosäure Sequenz- und Datenbankvergleich	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
Chimera Check	Überprüfung von 16S rDNA Genen auf Chimäre	http://rdp8.cme.msu.edu/cgis/chimera.cgi?su=SSU
ClustalX	Nukleinsäure- und Aminosäurealignments	http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html
DAS transmembrane prediction server	Identifikation von Transmembrandomänen	http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/
EMBOSS Transeq	Übersetzung von Nukleotid- in Aminosäuresequenzen	http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html
ESPrict 2.2	Darstellung von Sequenzalignments	http://esprict.ibcp.fr/ESPrict/ESPrict/index.php
ExPASy Proteomics Server	Diverse Tools zur Analyse von Proteinsequenzen und Struktur	http://www.expasy.ch/
GC Calculator	Berechnung des durchschnittlichen GC-Gehalts	http://www.genomicsplace.com/gc_calc.html
JCoast	Annotationsoftware	Richter <i>et al.</i> (2008); http://www.megx.net/jcoast/index.php
Multi Analyst 1.1	Dokumentation von Agarosegelen	BioRad
NCBI Genbank	Sequenzdatenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

NRPS-PKS	Analyse von NRPS- und PKS-Genen	http://www.nii.res.in/nrps-pks.html
NRSPredictor	Substratvorhersage der A-Domänen von NRPS-Systemen	Rausch <i>et al.</i> (2005); http://www-ab.informatik.uni-tuebingen.de/toolbox/index.php?view=domainpred
ORF-finder	ORF-Identifikation	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/gorf/
Pintail	Überprüfung von 16S rDNA Genen auf Chimäre	http://www.bioinformatics-toolkit.org/Pintail/index.html
PhyloPythia	Phylogenetische Klassifizierung von DNA-Fragmenten	http://cbcsrv.watson.ibm.com/phylopythia.html
PKS/NRPS Analysis Web-site	Analyse von PKS- und NRPS-Genen	http://www.tigr.org/jravel/nrps/
Primer 3	Konzipierung von Oligonukleotiden	http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi
Repeat Finder using Blast	Identifikation von Sequenzduplikationen	http://www.proweb.org/proweb/Tools/selfblast.html
REPuter	Identifikation von Sequenzwiederholungen	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/reputer/
RNAmmer 1.2 Server	Identifikation von rRNA Genen	http://www.cbs.dtu.dk/services/RNAmmer/
SignalP 3.0 Server	Identifikation von Signalpeptiden	http://genome.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
SIG-Pred: Signal Peptide Prediction	Identifikation von Signalpeptiden	http://bioinformatics.leeds.ac.uk/prot_analysis/Signal.html
TETRA 1.0b2 for Windows	Analyse von Tetranukleotidfrequenzen	Teeling <i>et al.</i> (2004); http://www.megx.net/tetra/
TMHMM Server v. 2.0	Identifikation von Transmembranhelices	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/
TPRpred	Vorhersage von TPR-Domänen in Proteinen	http://toolkit.tuebingen.mpg.de/tprpred
Treeview	Visualisierung phylogenetischer Stammbäume aus ARB und Phylip	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
tRNAscan-SE search server	Identifikation von tRNA Genen	http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/
Vector NTI Advance 10	Sequenzauswertungen	https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=userGroup.downloadCenter

Fortsetzung Tabelle 8-7: Programme, Software, Online-Tools.

8.8. 454-Rohdaten

Rohdaten der 454-Sequenzierung eines amplifizierten Poribakteriengenoms:

Run Statistics:	FLX Run	Titration Run
Number of Reads	456,103	2665
Average Read Length	230	288
Base Pairs	105,233,784	610,869
Read status:		
Number of full assembled reads		395363
Number of partial assembled reads		16131
Number of Singletons ₁		8047
Number of Repeats ₂		35486
Number of Outliers ₄		3733
Large contigs (>500bp)		
Number of contigs		555
Number of bases		1,594,285
Average contig size		2872
N50 contig size ₅		7234
Largest contig size		46669
Q40PlusBases ₆		1,532,970 (96.15%)
All contigs (>100bp)		
Number of contigs		2255
Number of bases		1,989,425
GS-Assembler Parameters:		
Seed step		12
Seed length		16
Minimum overlap length		40
Minimum overlap identity		90
Alignment identity score		2
Alignment difference score		-3
₁ Singletons – Reads that do not overlap with other reads ₂ Repeats – Reads that deem to be from repeat regions ₃ Duplicates – Reads that deem to be duplicates from other reads in the assembly ₄ Outliers identified by the assembler ₅ N50 contig size – size above which 50% of the assembled sequences can be found ₆ Q40 – Propability of a wrong base call (1 in 10000 => 99,99%); Q40PlusBases – Base calls with a score better than this threshold		

Tabelle 8-8: Tetranukleotidfrequenz-Analyse der 22 größten Contigs des Datensatzes ‚POR_CDs‘. Angegeben sind die jeweiligen Korrelations-Koeffizienten. Je größer der Wert (maximal 1), desto ähnlicher ist die Verwendung von Tetranukleotiden zwischen zwei DNA-Sequenzen.

	#00	#01	#02	#03	#04	#05	#06	#07	#08	#09	#10	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20	#21	#22
#00 gnl1456c02058_15102bp_POR_CDS	1	0.49731	0.61501	0.44278	0.50949	0.40643	0.30228	0.29124	0.56216	0.58837	0.34110	0.42416	0.69583	0.57671	0.45436	0.49647	0.56810	0.46251	0.65977	0.44968	0.54071	0.59625	0.42435
#01 gnl1155c02009_30505bp_POR_CDS	0.49731	1	0.59813	0.56513	0.56714	0.52988	0.39160	0.27276	0.59796	0.61852	0.47849	0.54022	0.58304	0.65975	0.64836	0.59210	0.67046	0.55696	0.59576	0.44102	0.71779	0.74013	0.42602
#02 gnl817c00156_20550bp_POR_CDS	0.61501	0.59813	1	0.68046	0.66512	0.51815	0.44168	0.30700	0.73355	0.69389	0.50924	0.64231	0.67585	0.77050	0.70514	0.62296	0.76900	0.70357	0.65436	0.62621	0.73265	0.76713	0.67008
#03 gnl1664c02112_30814bp_POR_CDS	0.44278	0.56513	0.68046	1	0.66674	0.55130	0.34861	0.23713	0.63311	0.68771	0.50277	0.67116	0.57267	0.75508	0.62784	0.57532	0.60235	0.64983	0.56476	0.56992	0.75920	0.72519	0.56913
#04 gnl472c00141_15130bp_POR_CDS	0.50949	0.56714	0.66512	0.66674	1	0.57629	0.33519	0.21582	0.66054	0.59877	0.45064	0.54552	0.62263	0.71401	0.57809	0.60637	0.63468	0.65034	0.60048	0.48965	0.62452	0.69399	0.51953
#05 gnl988c01954_13257bp_POR_CDS	0.40643	0.52988	0.51815	0.55130	0.57629	1	0.46134	0.26843	0.50706	0.52684	0.44310	0.60415	0.53166	0.63953	0.53637	0.49171	0.56670	0.58946	0.51597	0.54562	0.56899	0.60096	0.32999
#06 gnl1126c00165_18451bp_POR_CDS	0.30228	0.39160	0.44168	0.34861	0.33519	0.46134	1	0.21332	0.41116	0.42258	0.42355	0.42080	0.35511	0.50927	0.43897	0.34897	0.30981	0.48816	0.31556	0.47457	0.53201	0.46245	0.39088
#07 gnl1534c02071_13447bp_POR_CDS	0.29124	0.27276	0.30700	0.23713	0.21582	0.26843	0.21332	1	0.27093	0.28785	0.31335	0.31763	0.44856	0.28090	0.20703	0.11571	0.35819	0.14201	0.33947	0.33778	0.30593	0.24381	0.31466
#08 gnl1296c02035_38869bp_POR_CDS	0.56216	0.59796	0.73355	0.63311	0.66054	0.50706	0.41116	0.27093	1	0.70764	0.45690	0.65430	0.67631	0.77307	0.63085	0.59330	0.72912	0.64080	0.72152	0.57302	0.71579	0.79891	0.59031
#09 gnl862c00157_26269bp_POR_CDS	0.58837	0.61852	0.69389	0.68771	0.59877	0.52684	0.42258	0.28785	0.70764	1	0.51287	0.66158	0.60469	0.79493	0.70945	0.60495	0.63786	0.54990	0.67879	0.67955	0.70777	0.74001	0.64521
#10 gnl1029c01964_17819bp_POR_CDS	0.34110	0.47849	0.50924	0.50277	0.45064	0.44310	0.42355	0.31335	0.45690	0.51287	1	0.45554	0.45946	0.53472	0.53501	0.41745	0.53908	0.45415	0.41382	0.50236	0.53592	0.55277	0.30551
#11 gnl1978c02246_23180bp_POR_CDS	0.42416	0.54022	0.64231	0.67116	0.54552	0.60415	0.42080	0.31763	0.65430	0.66158	0.45554	1	0.61140	0.71484	0.61692	0.55531	0.63492	0.70474	0.58128	0.62399	0.62596	0.73083	0.50800
#12 gnl1436c02055_17169bp_POR_CDS	0.69583	0.58304	0.67585	0.57267	0.62263	0.53166	0.35511	0.44856	0.67631	0.60469	0.45946	0.61140	1	0.71437	0.59292	0.54674	0.66384	0.60789	0.69219	0.57731	0.71722	0.71596	0.55736
#13 gnl1360c02038_46669bp_POR_CDS	0.57671	0.65975	0.77050	0.75508	0.71401	0.63953	0.50927	0.28090	0.77307	0.79493	0.53472	0.71484	0.71437	1	0.69329	0.67213	0.69161	0.72121	0.68432	0.63310	0.81335	0.80865	0.64038
#14 gnl1479c02060_27340bp_POR_CDS	0.45436	0.64836	0.70514	0.62784	0.57809	0.53637	0.43897	0.20703	0.63085	0.70945	0.53501	0.61692	0.59292	0.69329	1	0.50261	0.66534	0.69026	0.60841	0.63551	0.72107	0.75033	0.59697
#15 gnl1049c01966_14541bp_POR_CDS	0.49647	0.59210	0.62296	0.57532	0.60637	0.49171	0.34897	0.11571	0.59330	0.60495	0.41745	0.55531	0.54674	0.67213	0.50261	1	0.57011	0.63020	0.56741	0.47246	0.68265	0.66603	0.41990
#16 gnl2083c00335_18188bp_POR_CDS	0.56810	0.67046	0.76900	0.60235	0.63468	0.56670	0.30981	0.35819	0.72912	0.63786	0.53908	0.63492	0.66384	0.69161	0.66534	0.57011	1	0.62189	0.63122	0.62475	0.70443	0.79219	0.55731
#17 gnl1747c02128_18455bp_POR_CDS	0.46251	0.55696	0.70357	0.64983	0.65034	0.58946	0.48816	0.14201	0.64080	0.54990	0.45415	0.70474	0.60789	0.72121	0.69026	0.63020	0.62189	1	0.65571	0.54994	0.68858	0.70584	0.59206
#18 gnl575c00144_28365bp_POR_CDS	0.65977	0.59576	0.65436	0.56476	0.60048	0.51597	0.31556	0.33947	0.72152	0.67879	0.41382	0.58128	0.69219	0.68432	0.60841	0.56741	0.63122	0.65571	1	0.49123	0.66517	0.71348	0.53058
#19 gnl2029c00195_14416bp_POR_CDS	0.44968	0.44102	0.62621	0.56992	0.48965	0.54562	0.47457	0.33778	0.57302	0.67955	0.50236	0.62399	0.57731	0.63310	0.63551	0.47246	0.62475	0.54994	0.49123	1	0.62169	0.68128	0.55592
#20 gnl29c00121_28895bp_POR_CDS	0.54071	0.71779	0.73265	0.75920	0.62452	0.56899	0.53201	0.30593	0.71579	0.70777	0.53592	0.62596	0.71722	0.81335	0.72107	0.68265	0.70443	0.68858	0.66517	0.62169	1	0.81687	0.61067
#21 gnl1215c02017_30968bp_POR_CDS	0.59625	0.74013	0.76713	0.72519	0.69399	0.60096	0.46245	0.24381	0.79891	0.74001	0.55277	0.73083	0.71596	0.80865	0.75033	0.66603	0.79219	0.70584	0.71348	0.68128	0.81687	1	0.65991
#22 gnl1344c02037_16641bp_POR_CDS	0.42435	0.42602	0.67008	0.56913	0.51953	0.32999	0.39088	0.31466	0.59031	0.64521	0.30551	0.50800	0.55736	0.64038	0.59697	0.41990	0.55731	0.59206	0.53058	0.55592	0.61067	0.65991	1

Tabelle 8-9: Anzahl der im Datensatz POR_CDs gefundenen Pfams (alphabetisch sortiert).

Model	CDS	Model	CDS	Model	CDS	Model	CDS
2_5_RNA_ligase	2	Bac_DnaA_C	1	dCMP_cyt_deam_1	1	DUF797	1
2-Hacid_dh_C	1	Bac_surface_Ag	2	DEAD	2	E1-E2_ATPase	1
2-oxoacid_dh	1	BacA	1	DEAD_assoc	1	E3_binding	2
3Beta_HSD	1	Band_7	2	DegT_DnrJ_EryC1	1	EB_dh	1
60KD_IMP	1	Big_2	1	DeoC	1	EF_TS	1
AA_kinase	3	Biotin_carb_C	1	DHH	1	EFG_C	2
AAA	2	Biotin_lipoyl	2	DHHA1	1	EFG_IV	1
AAA_2	2	BPD_transp_1	4	DHQ_synthase	1	ELFV_dehydrog	1
AAA_4	2	Calx-beta	1	DHquinase_II	1	Epimerase	3
AAA_5	2	Carb_anhydrase	1	DJ-1_PfpI	1	ExbD	1
ABC_membrane	3	Carb_kinase	1	DMRL_synthase	1	Exo_endo_phos	1
ABC_tran	23	Cas_APE2256	1	DNA_gyraseB	1	ExsB	1
Abhydrolase_1	1	Cation_ATPase_N	1	DNA_pol3_beta_2	1	F420_oxidored	1
Acetyltransf_1	2	CbiA	6	DNA_pol3_beta_3	1	FA_desaturase	1
Aconitase	1	CBS	4	DNA_topoisoIV	2	FabA	1
Aconitase_C	1	CcmB	1	DnaJ	2	FAD_binding_2	1
ACP_syn_III	1	CcmE	1	DoxX	1	FAD_binding_3	1
ACP_syn_III_C	1	CcmH	1	DSBA	1	Fapy_DNA_glyco	1
ACPS	1	CCP_MauG	1	DsbD	1	FecCD	1
ACR_tran	1	CDP-OH_P_transf	2	DUF1009	1	Fer2	2
ACT	6	Chlor_dismutase	1	DUF101	1	Fer4	4
Acyl_transf_1	1	Chorismate_synt	1	DUF1016	3	fn3	2
Adenine_glyco	1	CinA	1	DUF1130	2	FRG	2
Adenylsucc_synt	1	CitMHS	1	DUF1295	1	FTHFS	1
						FTSW_RODA_SPO	
ADH_N	3	CLP_protease	1	DUF1445	1	VE	1
adh_short	4	ClpS	1	DUF1499	1	FtsX	3
ADH_zinc_N	3	CN_hydrolase	1	DUF150	1	FUR	1
AdoHcyase	1	CO_dh	1	DUF151	1	GAD	1
AdoHcyase_NAD	1	CoA_binding	1	DUF1524	2	GATase	2
AhpC-TSA	6	Cob_adeno_trans	1	DUF164	1	GATase_2	1
AIG2	1	CobD_Cbib	1	DUF1680	1	GATase_3	1
AIRC	1	CobS	1	DUF1778	1	GCV_H	1
AIRS	2	CobU	1	DUF185	1	GCV_T	1
AIRS_C	3	cobW	2	DUF1854	1	GCV_T_C	1
Ala_racemase_C	1	Complex1_24kDa	1	DUF192	1	GerE	1
Ala_racemase_N	1	Complex1_30kDa	1	DUF196	1	GFO_IDH_MocA	8
Aldedh	2	Complex1_49kDa	1	DUF245	2	GFO_IDH_MocA_C	3
Amidino-transf	1	Complex1_51K	2	DUF258	1	GHMP_kinases_C	1
Amidohydro_1	2	CPSase_L_chain	3	DUF262	3	GHMP_kinases_N	1
Amino_oxidase	1	CPSase_L_D2	4	DUF275	2	GIDA	1
Aminotran_1_2	3	CPSase_L_D3	1	DUF304	2	GidB	1
Aminotran_3	1	CPSase_sm_chain	1	DUF310	1	GIY-YIG	2
Ammonium_transp	2	CSD	1	DUF323	6	GlnD_UR_UTase	1
Ank	1	CstA	1	DUF336	1	GlnE	1
Anticodon_1	1	CTP_synth_N	1	DUF374	1	Glyco_hydro_3	1
AP_endonuc_2	5	CTP_transf_3	1	DUF433	1	Glyco_hydro_65m	1
ApbE	1	Cu-oxidase_2	1	DUF45	2	Glyco_hydro_65N	1
APS_kinase	1	Cu-oxidase_3	1	DUF477	1	Glyco_hydro_67N	1
Arg_tRNA_synt_N	1	Cupin_2	2	DUF490	1	Glyco_transf_25	1
Asn_synthase	1	Cyclase	1	DUF497	2	Glycos_transf_1	5
AsnC_trans_reg	2	Cytochrom_C_asm	2	DUF500	1	Glycos_transf_2	2
ATP_bind_3	1	Cytochrom_NNT	1	DUF503	1	Glycos_transf_N	1
ATP-grasp_2	1	Dabb	1	DUF520	1	Glyoxalase	1
ATP-synt_ab	1	DAHP_synth_1	4	DUF55	1	GMP_synt_C	1
B12-binding	3	DALR_1	1	DUF57	1	Gp49	4
B12-binding_2	2	DAO	1	DUF6	2	GreA_GreB	1
Bac_DNA_binding	1	DAP_epimerase	2	DUF62	1	GreA_GreB_N	1
Bac_DnaA	1	DBI_PRT	1	DUF77	1	GSHPx	1

Model	CDS	Model	CDS	Model	CDS	Model	CDS
GTP_EFTU	7	M20_dimer	1	NIR_SIR_ferr	2	Phage_integrase	3
GTP_EFTU_D2	4	Macro	2	NTP_transferase	1	PhdYeFM	2
GTP_EFTU_D3	1	malic	1	NUDIX	1	PhoH	1
H_PPase	2	Malic_M	1	NusA_N	1	Phos_pyr_kin	1
H2TH	1	MerR	2	NusG	1	PhyH	7
HAMP	2	Met_synt_B12	2	OEP	2	PhzC-PhzF	1
HATPase_c	4	Metalloenzyme	1	OmpA	1	PIG-L	1
HD	3	Metallophos	2	OmpH	1	PIN	10
HEAT_PBS	2	Methylase_S	3	Oxidored_molyb	3	PK	1
Helicase_C	3	Methyltransf_11	5	Oxidored_q1	6	PK_C	1
HhH-GPD	1	Methyltransf_12	5	Oxidored_q1_N	2	Plasmid_killer	2
HicB	1	Methyltransf_2	2	Oxidored_q2	2	Plasmid_stabil	1
His_biosynth	1	Methyltransf_3	1	Oxidored_q3	1	Plug	4
His_kinase	1	Methyltransf_6	1	Oxidored_q4	1	PMSR	2
HisG	1	MethyltransfD12	1	Oxidored_q6	1	PMT	1
HisKA	2	MFS_1	1	PALP	3	PNPase	1
HIT	1	MG5	1	PAP2	1	POR	1
HlyD	1	MMR_HSR1	4	ParBc	1	POR_N	1
HMGL-like	2	MnhB	1	PAS	3	Porin_O_P	1
HNH	2	MNHE	1	PAS_3	2	PPDK_N	1
Homoserine_dh	1	MobB	1	PAS_4	4	Ppx-GppA	1
HPPK	1	MoCF_biosynth	4	PCMT	2	PRA-CH	1
HRDC	1	Mo-co_dimer	2	PCP_red	2	PRA-PH	1
HSDR_N	4	MoeA_C	1	PD40	2	PRC	1
HSP20	1	MoeA_N	1	PDT	1	Prenyltransf	1
HTH_1	1	MoeZ_MoeB	2	PdxJ	1	Pribosyltran	3
HTH_3	9	Molybdop_Fe4S4	1	PDZ	4	PRK	1
HTH_8	4	Molybdopterin	1	Pentapeptide	4	Pro_isomerase	1
Hydrolase	1	Molydop_binding	2	Pep_deformylase	1	Proteasome	1
IF2_N	2	MotA_ExbB	1	Peptidase_C26	3	Pterin_bind	1
IF-2B	1	MR_MLE	1	Peptidase_M1	1	PTPS	1
IGPD	1	MR_MLE_N	1	Peptidase_M16	1	Pyr_redox	2
Inositol_P	2	MreB_Mbl	2	Peptidase_M16_C	3	Pyr_redox_2	2
iPGM_N	2	MreC	1	Peptidase_M17	2	Pyr_redox_dim	2
Iso_dh	1	MrpF_PhaF	1	Peptidase_M17_N	2	Radical_SAM	6
IstB	1	MS_channel	1	Peptidase_M20	1	RAMPs	2
IstB_N	1	MTHFR	1	Peptidase_M23	2	RBFA	1
Kelch_1	1	MttA_Hcf106	3	Peptidase_M24	2	RecA	1
Kelch_2	1	MutS_I	1	Peptidase_M3	2	Redoxin	6
ketoacyl-synt	1	MutS_II	1	Peptidase_M3_N	1	RelA_SpoT	1
Ketoacyl-synt_C	1	MutS_III	1	Peptidase_M32	1	Rep_3	2
KH_1	1	MutS_IV	1	Peptidase_M41	1	ResIII	5
KH_2	1	MutS_V	3	Peptidase_M48	3	Response_reg	5
KOW	1	N6_Mtase	2	Peptidase_M50	1	RHH_1	1
KR	1	N6_N4_Mtase	6	Peptidase_S24	1	Rho_RNA_bind	1
LAB_N	1	Na_Ala_symp	1	Peptidase_S41	1	Rib_5-P_isom_A	1
Lactamase_B	3	Na_H_Exchanger	2	Peptidase_S49	3	RibD_C	1
LepA_C	1	NAD_binding_2	2	Peptidase_S8	1	Ribosomal_L1	1
LeuA_dimer	3	NAD_binding_3	1	Peptidase_S9	1	Ribosomal_L10	1
Ligase_CoA	2	NAD_binding_4	2	PEP-utilizers	1	Ribosomal_L11	1
Lipase_GDSL	2	NAD_synthase	1	PEP-utilizers_C	1	Ribosomal_L11_N	1
LMWPc	1	NadA	1	Peripla_BP_2	1	Ribosomal_L12	1
Lon_C	1	NADHdh	1	PGI	1	Ribosomal_L16	1
LpxB	1	NDK	1	PGM_PMM_I	2	Ribosomal_L19	1
LpxK	1	NgoMIV_restric	1	PGM_PMM_II	2	Ribosomal_L2	1
Lysine_decarbox	1	NHL	6	PGM_PMM_III	2	Ribosomal_L2_C	1
LYTB	1	NIL	1	PhaG_MnhG_YufB	1	Ribosomal_L22	1
LytTR	1	NIR_SIR	2	Phage_AlpA	2	Ribosomal_L23	1

Fortsetzung Tabelle 8-9: Anzahl der im Datensatz POR_CDs gefundenen Pfams (alphabetisch sortiert).

Model	CDS	Model	CDS	Model	CDS
Ribosomal_L31	1	SMC_hinge	1	tRNA-synt_2b	1
Ribosomal_L5	1	SMC_N	4	tRNA-synt_2c	1
Ribosomal_S12	1	S-methyl_trans	1	tRNA-synt_2e	2
Ribosomal_S15	1	SMF	1	TruB_N	1
Ribosomal_S19	1	SNase	1	Trypsin	3
Ribosomal_S2	1	SpoIID	1	UBA	1
Ribosomal_S3_N	1	SRP_SPB	1	Ubie_methyltran	1
Ribosomal_S7	1	SRP54	3	UPF0004	2
Rieske	3	SRP54_N	1	UPF0027	1
RimM	1	Stabl_TIGR02574	1	UPF0047	1
RmuC	1	STAS	1	UPF0054	1
RNA_pol_A_bac	1	Sugar_tr	1	UPF0079	1
RNA_pol_A_CTD	1	Sulfatase	5	UPF0102	1
RNA_pol_Rpb1_1	1	Sulfate_transp	1	UPF0150	7
RNA_pol_Rpb1_2	1	Surf_Ag_VNR	6	UPF0153	1
RNA_pol_Rpb1_3	1	TatC	2	Urease_alpha	1
RNA_pol_Rpb1_4	1	TGS	1	Urease_beta	1
RNA_pol_Rpb1_5	1	TGT	1	Urease_gamma	1
RNA_pol_Rpb2_1	1	Thi4	1	UreF	1
RNA_pol_Rpb2_2	1	ThiC	1	URO-D	1
RNA_pol_Rpb2_3	1	ThiF	2	Usp	4
RNA_pol_Rpb2_6	1	ThiG	1	UVR	2
RNA_pol_Rpb2_7	1	Thioredoxin	1	UvrC_HhH_N	1
RNase_HII	1	ThiS	3	UvrD-helicase	2
RNase_PH	2	TMP-TENI	1	VKOR	1
RNase_PH_C	2	TOBE	1	WD40	24
Rotamase	1	TOBE_2	3	YajC	1
RQC	1	TonB	2	YCII	1
RRF	1	TonB_dep_Rec	4	YjeF_N	1
RRM_1	1	Topoisom_bac	1	zf-C4_ClpX	1
Rubrythrin	1	Toprim	2	zf-C4_Topoisom	1
rve	8	Toprim_N	1	zf-dskA_traR	1
RVT_1	1	TPP_enzyme_C	1		
S1	2	TPR_1	37		
Saccharop_dh	1	TPR_2	30		
S-AdoMet_synt_C	1	TraB	1		
S-AdoMet_synt_M	1	TRAM	1		
S-AdoMet_synt_N	1	Transketolase_C	1		
SBP_bac_1	3	Transpeptidase	1		
SecA_DEAD	1	Transposase_2	5		
SecA_PP_bind	1	Transposase_20	1		
SecA_SW	1	Transposase_35	6		
SEC-C	1	Transposase_9	1		
SecD_SecF	2	Transposase_mut	1		
SecE	1	Trigger_C	1		
Secretin	1	TrkA_C	1		
Sel1	4	TrkA_N	1		
SelA	1	TrkH	1		
Semialdehyde_dh	1	tRNA_anti	1		
Semialdehyde_dhC	1	tRNA_m1G_MT	1		
Sigma54_activat	4	tRNA_Me_trans	1		
Sigma70_r1_2	1	tRNA_SAD	1		
Sigma70_r2	3	tRNA_synt_2f	1		
Sigma70_r3	2	tRNA-synt_1	2		
Sigma70_r4	5	tRNA-synt_1b	1		
Sigma70_r4_2	3	tRNA-synt_1d	1		
SIR2	1	tRNA-synt_1g	2		
SLT	1	tRNA-synt_2	1		

Fortsetzung Tabelle 8-9: Anzahl der im Datensatz POR_CDs gefundenen Pfams (alphabetisch sortiert).

Tabelle 8-10: GenomesDB Statistik auf den Ebenen Klasse (linke Spalte) und Familie (rechte Spalte; nur die 35 am häufigsten vertretenen Familien sind dargestellt). Cutoff $1e-4$.

Klasse	POR_ Contigs	POR_ CDS	Familie	POR_ Contigs	POR_ CDS
Deltaproteobacteria	123	257	unknown	76	124
Gammaproteobacteria	91	129	Geobacteraceae	30	94
Alphaproteobacteria	180	125	Peptococcaceae	27	44
unknown	72	123	Chloroflexaceae	20	40
Clostridia	75	104	Solibacteraceae	20	38
Betaproteobacteria	66	74	Pelobacteraceae	26	36
Chloroflexi (class)	23	52	Phyllobacteriaceae	21	33
Solibacteres	20	38	Clostridiaceae	30	33
Bacilli	35	37	Chlorobiaceae	20	29
Actinobacteria (class)	39	37	Syntrophaceae	14	28
Chlorobia	20	29	Myxococcaceae	18	26
Sphingobacteria	26	23	Prochlorococcaceae	27	24
Methanomicrobia	9	21	Bacillaceae	18	24
Aquificae (class)	2	14	Syntrophobacteraceae	14	23
Flavobacteria	8	13	Bradyrhizobiaceae	26	22
Acidobacteria (class)	10	13	Burkholderiaceae	27	22
Spirochaetes (class)	10	12	Rhodobacteraceae	7	20
Gloeobacteria	8	10	Nostocaceae	11	19
Thermoprotei	5	9	Shewanellaceae	10	17
Epsilonproteobacteria	8	8	Pseudomonadaceae	13	16
Opitutae	4	7	Comamonadaceae	23	16
Bacteroidetes (class)	10	6	Thermoanaerobacteriaceae	13	15
Thermotogae (class)	7	5	Chromatiaceae	6	14
Halobacteria	6	4	Polyangiaceae	6	13
Dehalococcoidetes	1	4	Flavobacteriaceae	8	13
Planctomycetacia	1	3	Acidobacteriaceae	10	13
Deinococci	2	3	Herpetosiphonaceae	3	12
Chlamydiae (class)	3	2	Desulfovibrionaceae	4	12
Methanococci	3	2	Nitrosomonadaceae	4	12
Methanobacteria	1	2	Enterobacteriaceae	9	12
Thermococci	0	2	Desulfobacteraceae	8	12
Fusobacteria (class)	1	1	Leptospiraceae	4	11
Archaeoglobi	1	1	Methanosarcinaceae	6	11
Mollicutes	0	1	Aquificaceae	1	11
Methanopyri	0	1	Rhizobiaceae	14	10

Tabelle 8-11: GenomesDB Statistik auf den Ebenen Ordnung (linke Spalte), Gattung (mittlere Spalte) und Art (rechte Spalte). Dargestellt sind nur die 25 häufigsten Treffer. Cutoff 1e-4.

Ordnung	POR_ Contigs	POR_CDS	Gattung	POR_ Contigs	POR_CDS	Art	POR_ Contigs	POR_CDS
Desulfuromonadales	56	130	Geobacter	30	94	unknown	102	131
Clostridiales	62	89	Solibacter	20	38	<i>Solibacter usitatus</i>	20	38
Rhizobiales	75	84	Pelobacter	26	36	<i>Geobacter uraniumreducens</i>	9	32
unknown	25	51	unknown	16	30	<i>Parvibaculum lavamentivorans</i>	13	29
Syntrophobacterales	28	51	Parvibaculum	13	29	<i>Syntrophus aciditrophicus</i>	14	28
Burkholderiales	52	45	Syntrophus	14	28	<i>Geobacter metallireducens</i>	9	26
Chloroflexales	20	40	Clostridium	23	26	<i>Pelobacter carbinolicus</i>	13	24
Myxococcales	24	39	Roseiflexus	16	26	<i>Prochlorococcus marinus</i>	27	24
Solibacterales	20	38	Chlorobium	17	26	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	7	24
Bacillales	26	32	Prochlorococcus	27	24	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	14	23
Chroococcales	9	31	Syntrophobacter	14	23	<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>	12	20
Alteromonadales	22	30	Salinibacter	23	18	<i>Salinibacter ruber</i>	23	18
Chlorobiales	20	29	Bacillus	13	17	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	7	17
Actinomycetales	38	27	Rhodopseudomonas	7	17	<i>Roseiflexus castenholzii</i>	10	17
Prochlorales	27	24	Synechococcus	5	17	<i>Myxococcus xanthus</i>	9	15
Sphingobacteriales	26	23	Shewanella	10	17	<i>Nitrosococcus oceani</i>	6	14
Rhodobacterales	9	23	Pseudomonas	8	15	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	4	14
Chromatiales	11	21	Myxococcus	9	15	<i>Sorangium cellulosum</i>	6	13
Desulfobacterales	10	20	Nitrosococcus	6	14	<i>Desulfotomaculum reducens</i>	4	13
Nostocales	11	19	Chloroflexus	4	14	<i>Acaryochloris marina</i>	5	12
Pseudomonadales	15	18	Sorangium	6	13	<i>Geobacter lovleyi</i>	5	12
Thermoanaerobacteriales	13	15	Desulfotomaculum	4	13	<i>Pelobacter propionicus</i>	13	12
Aquificales	2	14	Acaryochloris	5	12	<i>Herpetosiphon aurantiacus</i>	3	12
Flavobacteriales	8	13	Herpetosiphon	3	12	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	10	12
Methanosarcinales	6	13	Desulfovibrio	3	12	<i>Desulfococcus oleovorans</i>	8	12

Im Folgenden ist die Kartierung der automatisch annotierten ORFs auf KEGG-Stoffwechselwege zusammengefasst. Dabei ist zu beachten, dass hierbei nur ORFs berücksichtigt wurden, denen durch die automatische Annotation eine EC-Nummer zugewiesen wurde.

path:ko00970 Aminoacyl-tRNA biosynthesis

ec:6.1.1.7, ec:6.1.1.21, ec:6.1.1.12, ec:6.1.1.19, (ec:6.1.1.4, ec:6.1.1.7, ec:6.1.1.5, ec:6.1.1.6)

path:ko00750 Vitamin B6 metabolism

ec:4.2.3.1, (ec:4.-.-)

path:ko00440 Aminophosphonate metabolism

ec:2.6.1.-, ec:2.7.8.-, (ec:2.1.1.-)

path:ko00051 Fructose and mannose metabolism

ec:5.4.2.8, ec:4.1.2.13, (ec:1.1.1.-)

path:ko00360 Phenylalanine metabolism

ec:2.6.1.1, (ec:2.3.1.-)

path:ko00983 Drug metabolism - other enzymes

ec:2.4.2.8, (ec:1.1.1.205, ec:2.4.2.8)

path:ko00190 Oxidative phosphorylation

ec:1.6.99.5, ec:1.6.5.3, ec:3.6.1.1, (ec:3.6.3.14)

path:ko04610 Complement and coagulation cascades

ec:3.4.21.-

path:ko00401 Novobiocin biosynthesis

ec:2.6.1.1

path:ko03320 PPAR signaling pathway

ec:6.2.1.-

path:ko00720 Reductive carboxylate cycle (CO2 fixation)

ec:1.2.7.1, ec:4.2.1.2, (ec:4.2.1.2, ec:6.2.1.1, ec:1.1.1.42)

path:ko00981 Insect hormone biosynthesis

ec:1.-.-, (ec:2.1.1.-, ec:1.1.1.-)

path:ko00473 D-Alanine metabolism

ec:5.1.1.1

path:ko04512 ECM-receptor interaction

ec:3.4.21.-

path:ko02020 Two-component system

ec:2.7.7.6, ec:2.6.1.-, ec:3.4.21.-, (ec:4.1.3.27, ec:2.7.7.6)

path:ko00030 Pentose phosphate pathway

ec:2.7.6.1, ec:5.3.1.6, ec:2.7.1.-, ec:4.1.2.13

path:ko00903 Limonene and pinene degradation

ec:6.2.1.-, (ec:2.3.1.-)

path:ko00630 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism

ec:6.3.4.3, ec:5.3.1.22

path:ko00730 Thiamine metabolism

ec:2.7.4.16, ec:2.7.4.7, (ec:2.5.1.3)

path:ko00860 Porphyrin and chlorophyll metabolism

ec:4.1.1.37, ec:1.-.-, ec:1.3.3.4, (ec:4.2.1.24, ec:1.2.1.70, ec:4.-.-)

path:ko01053 Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides

ec:2.7.7.-, ec:3.6.1.-, (ec:2.7.7.-, ec:2.3.1.-, ec:3.6.1.-)

path:ko04020 Calcium signaling pathway

ec:3.6.3.8, (ec:3.1.3.16)

path:ko00633 Trinitrotoluene degradation

ec:1.2.7.1, ec:1.-.-, ec:1.2.99.2

path:ko00670 One carbon pool by folate

ec:6.3.4.3

path:ko00790 Folate biosynthesis

ec:3.6.1.-, (ec:3.5.4.16, ec:3.6.1.-)

path:ko03410 Base excision repair

ec:3.2.2.-, ec:3.2.2.20, ec:2.7.7.7, (ec:3.1.-.-)

path:ko00251 Glutamate metabolism
ec:2.6.1.1, ec:2.4.2.14, (ec:6.3.5.5)

path:ko00941 Flavonoid biosynthesis
ec:2.1.1.104

path:ko03430 Mismatch repair
ec:3.6.1.-, ec:2.7.7.7, (ec:3.1.-, ec:3.6.1.-)

path:ko04930 Type II diabetes mellitus
ec:2.7.1.40

path:ko00450 Selenoamino acid metabolism
ec:2.9.1.1, ec:2.5.1.47, ec:2.5.1.6, (ec:2.1.1.-, ec:2.5.1.47)

path:ko00010 Glycolysis / Gluconeogenesis
ec:1.2.7.1, ec:2.7.1.40, ec:5.4.2.1, ec:4.1.2.13, (ec:6.2.1.1)

path:ko00240 Pyrimidine metabolism
ec:2.7.7.-, ec:2.7.7.6, ec:2.7.7.7, (ec:2.7.7.-, ec:2.7.7.6, ec:6.3.5.5, ec:4.1.1.23)

path:ko00650 Butanoate metabolism
ec:1.2.7.1, (ec:1.1.1.-, ec:2.3.1.-)

path:ko00564 Glycerophospholipid metabolism
ec:2.7.8.-, (ec:2.3.1.-)

path:ko00600 Sphingolipid metabolism
ec:3.5.1.-, ec:2.7.8.-, (ec:3.5.1.-)

path:ko00290 Valine, leucine and isoleucine biosynthesis
ec:2.3.3.13, (ec:6.1.1.4, ec:6.1.1.5, ec:2.3.3.13)

path:ko03020 RNA polymerase
ec:2.7.7.6, (ec:2.7.7.6)

path:ko00400 Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis
ec:2.5.1.54, ec:2.6.1.1, ec:4.2.3.4, (ec:4.1.3.27, ec:2.5.1.54)

path:ko00940 Phenylpropanoid biosynthesis
ec:2.1.1.104

path:ko00680 Methane metabolism
ec:1.2.99.2

path:ko00906 Carotenoid biosynthesis
ec:1.-.-, (ec:2.1.1.-, ec:2.3.1.-)

path:ko00340 Histidine metabolism
ec:6.1.1.21, ec:2.4.2.17, (ec:1.1.1.23, ec:2.1.1.-, ec:2.3.1.-)

path:ko00592 alpha-Linolenic acid metabolism
ec:1.-.-, ec:6.2.1.-

path:ko00627 1,4-Dichlorobenzene degradation
ec:3.5.1.-, (ec:3.5.1.-)

path:ko00330 Arginine and proline metabolism
ec:2.6.1.1, ec:6.1.1.19, (ec:6.3.4.5)

path:ko00930 Caprolactam degradation
ec:3.5.1.-, ec:2.6.1.-, ec:6.2.1.-, (ec:3.5.1.-)

path:ko00561 Glycerolipid metabolism
ec:2.7.1.-

path:ko00740 Riboflavin metabolism
ec:2.5.1.9, ec:1.1.1.193, (ec:2.5.1.9)

path:ko00620 Pyruvate metabolism
ec:2.7.9.1, ec:1.2.7.1, ec:2.3.3.13, ec:2.7.1.40, (ec:6.2.1.1, ec:2.3.3.13)

path:ko04910 Insulin signaling pathway
ec:2.7.1.40, (ec:3.1.3.16)

path:ko00031 Inositol metabolism
ec:1.-.-

path:ko05211 Renal cell carcinoma
ec:4.2.1.2, (ec:4.2.1.2)

path:ko00640 Propanoate metabolism
ec:1.2.7.1, ec:6.2.1.-, (ec:6.2.1.1)

path:ko00632 Benzoate degradation via CoA ligation
ec:6.2.1.-, (ec:1.1.1.-, ec:2.3.1.-)

path:ko03440 Homologous recombination
ec:3.6.1.-, ec:2.7.7.7, (ec:3.1.-, ec:3.6.1.-)

path:ko01030 Glycan structures - biosynthesis 1
ec:2.4.1.109, ec:2.7.8.-

path:ko00950 Alkaloid biosynthesis I
ec:2.6.1.1

path:ko05340 Primary immunodeficiency
ec:3.2.2.-, (ec:3.1.-.-)

path:ko00260 Glycine, serine and threonine metabolism
ec:1.2.1.11, ec:1.1.1.3, ec:4.2.3.1, (ec:1.1.1.-, ec:1.1.1.95)

path:ko00252 Alanine and aspartate metabolism
ec:6.3.4.4, ec:6.1.1.7, ec:2.6.1.1, ec:6.1.1.12, ec:5.1.1.1, (ec:6.1.1.7, ec:6.3.4.5, ec:6.3.5.5)

path:ko00310 Lysine degradation
ec:5.4.3.2, ec:2.6.1.-, ec:1.5.1.10, (ec:2.3.1.-)

path:ko00130 Ubiquinone biosynthesis
ec:1.6.5.3, (ec:2.1.1.-)

path:ko00350 Tyrosine metabolism
ec:2.6.1.1, ec:6.2.1.-, (ec:2.1.1.-, ec:2.3.1.-)

path:ko04115 p53 signaling pathway
ec:1.-.-, (ec:3.1.3.16)

path:ko04510 Focal adhesion
ec:3.4.21.-, (ec:3.1.3.16)

path:ko00271 Methionine metabolism
ec:2.6.1.-, ec:5.3.1.23, ec:2.5.1.6

path:ko00960 Alkaloid biosynthesis II
ec:6.2.1.-, (ec:2.3.1.-)

path:ko05012 Parkinson's disease
ec:1.6.5.3, (ec:3.6.3.14)

path:ko00710 Carbon fixation in photosynthetic organisms
ec:2.7.9.1, ec:2.6.1.1, ec:5.3.1.6, ec:2.7.1.40, ec:4.1.2.13

path:ko00311 Penicillin and cephalosporin biosynthesis
ec:2.1.3.-

path:ko00760 Nicotinate and nicotinamide metabolism
ec:3.5.1.-, ec:2.7.1.-, ec:1.6.1.1, (ec:3.5.1.-)

path:ko00530 Aminosugars metabolism
ec:2.5.1.7, ec:2.7.7.43, (ec:1.1.1.-, ec:3.5.99.6)

path:ko03420 Nucleotide excision repair
ec:3.6.1.-, ec:2.7.7.7, (ec:3.1.-.-, ec:3.6.1.-)

path:ko00230 Purine metabolism
ec:2.7.7.-, ec:2.4.2.7, ec:2.7.1.40, ec:2.7.7.7, ec:6.3.4.4, ec:4.1.1.21, ec:2.7.6.1, ec:3.6.1.11, ec:2.7.7.6, ec:2.4.2.14, ec:2.4.2.8, (ec:2.7.7.-, ec:2.7.7.6, ec:1.1.1.205, ec:2.7.4.3, ec:2.4.2.8)

path:ko00540 Lipopolysaccharide biosynthesis
ec:2.7.7.-, ec:3.5.1.-, ec:2.4.1.182, ec:2.-.-.-, ec:2.7.1.130, ec:2.7.1.-, ec:3.6.1.-, (ec:3.5.1.-, ec:2.7.7.-, ec:2.4.1.182, ec:2.3.1.-, ec:3.6.1.-)

path:ko04210 Apoptosis
ec:1.-.-, (ec:3.1.3.16)

path:ko00513 High-mannose type N-glycan biosynthesis
ec:2.7.8.-

path:ko00281 Geraniol degradation
ec:6.2.1.-

path:ko03060 Protein export
ec:3.4.21.89

path:ko01031 Glycan structures - biosynthesis 2
ec:2.-.-

path:ko00020 Citrate cycle (TCA cycle)
ec:1.2.7.1, ec:4.2.1.2, (ec:4.2.1.2, ec:1.1.1.42)

path:ko00272 Cysteine metabolism
ec:2.6.1.1, ec:2.5.1.47, (ec:2.5.1.47)

path:ko00300 Lysine biosynthesis
ec:5.1.1.7, ec:1.2.1.11, ec:3.5.1.-, ec:1.1.1.3, ec:2.6.1.-, ec:1.5.1.10, (ec:3.5.1.-, ec:6.1.1.6)

path:ko03450 Non-homologous end-joining
ec:2.7.7.7, (ec:3.1.-.-)

path:ko00520 Nucleotide sugars metabolism
ec:2.6.1.-, ec:2.7.8.-, (ec:1.1.1.-, ec:1.1.1.22)

path:ko03030 DNA replication
ec:2.7.7.-, ec:3.1.26.4, ec:3.6.1.-, ec:2.7.7.7, (ec:2.7.7.-, ec:3.6.1.-)

path:ko00220 Urea cycle and metabolism of amino groups

ec:1.2.1.41, ec:2.6.1.-, (ec:6.3.4.5)

path:ko00920 Sulfur metabolism

ec:2.5.1.47, (ec:2.5.1.47)

9. Publikationen

SCHMITT S., WEHRL M., BAYER K., SIEGL A. UND HENTSCHEL U. (2007) Marine sponges as models for commensal microbe-host interactions. *Symbiosis* **44**: 43-50.

BAYER K., SIEGL A., SCHMITT S., HOFFMANN F. UND HENTSCHEL U. (2008) Unravelling microbial diversity and metabolism in marine sponges. *Proceedings of the Leopoldina Symposium ,Life strategies of microorganisms in the environment and in host organisms* **96**: 71-79.

SIEGL A., BAYER K., KOZYTSKA S., HENTSCHEL U. UND SCHMITT S. (2008) Sponges and microbes - new frontiers in an ancient symbiosis. *Vie et Milieu* **58**: 165-174.

SIEGL A. UND HENTSCHEL U. (akzeptiert) PKS and NRPS gene clusters from microbial symbiont cells of marine sponges by whole genome amplification. *Environmental Microbiology Reports*.

10. Tagungsbeiträge

HÄGGBLOM M.M., KERKHOF L.J., AHN Y.-B., FRASER C., GRAY I., LOPEZ N., PARISI K., SAKS B., SIEGL A. UND HENTSCHEL U. (2007) Reductive debrominating microorganisms associated with organohalide-containing marine sponges (Poster). *ASLO Aquatic Sciences Meeting* in Santa Fe, USA.

GRAY I.H., LOPEZ N., AHN Y.-B., PARISI K., SAKS B., HENTSCHEL U., SIEGL A., KERKHOF L. UND HÄGGBLOM M.M. (2007) Distribution of anaerobic dehalogenating bacteria in sponge species from the Atlantic and the Mediterranean (Poster). *American Society for Microbiology 107th General Meeting* in Toronto, Kanada.

Mitorganisator des Internationalen Symposiums: ‚*Drilling Into Life’s Depth – Innovative Techniques in Molecular Biology*‘ (2007) in Würzburg.

SIEGL A., PROKSCH S., PIMENTEL-ELARDO S., GROZDANOV L. UND HENTSCHEL U. (2008) NRPS systems in microbial consortia of marine sponges – different approaches for the analysis of diversity, origin and function (Posterpräsentation). *Meetings of the Three Divisions of the International Union of Microbial Societies (IUMS)* in Istanbul, Türkei.

SIEGL A. UND HENTSCHEL U. (2008) Linking phylogeny and function: single cell genomics for the study of sponge-associated bacterial communities (Posterpräsentation). *The 12th International Symposium on Microbial Ecology (ISME)* in Cairns, Australien.

SIEGL A. (2009) Linking phylogeny and function: single cell genomics for the study of marine sponge-associated bacterial communities (Vortrag). *4th International Symposium Organized by the Students of the Graduate School of Life Sciences: (R)evolution Research – Life and Science: a Journey through Time* in Würzburg.

HORNA-GRAY I., LOPEZ N., AHN Y.-B., PARISI K., ANSARI H., HENTSCHEL U., SIEGL A., KERKHOF L. UND HÄGGBLUM M.M. (2009) The novel sponge-associated dehalogenating bacterium *Desulfoluna spongiiphila* is consistently found in sponges from temperate and tropical oceans (Poster akzeptiert). *American Society for Microbiology (ASM) 109th General Meeting* in Philadelphia, USA.

SIEGL A. (2009) Whole genome amplification of a single poribacterial cell: insights into the genome of a marine sponge symbiont (Vortrag angemeldet). *6th International Symbiosis Society Congress (ISS)* in Madison, USA.

11. Workshops

‘Mini Workshop on the Analysis of Environmentally relevant Microorganisms and Comparative Genomics’ (13.03.2007), Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen.

‘Effective Scientific Writing’ (18. - 20.06.2007), Universität Würzburg.

‘Presentation Technique’ (21. - 22.06.2007), Universität Würzburg.

‘ENSEMBL Genome Analysis’ (24.07.2007), Universität Würzburg.

12. Forschungsaufenthalte

Während dieser Doktorarbeit fanden jeweils 14-tägige Expeditionen im Mai 2005, sowie im April 2006 zum Sammeln mariner Schwämme und zur Durchführung praktischer Feldarbeiten an das Institut ‚Ruđer Bošković‘ in Rovinj, Kroatien statt.

Ferner wurde ein Kultivierungsexperiment in Kollaboration mit Prof. Stephen Giovannoni während eines fünfwöchigen Forschungsaufenthalts im Juni / Juli 2005 am ‚Department of Microbiology‘ an der ‚Oregon State University‘ in Corvallis, USA durchgeführt.

13. Lebenslauf

Alexander Matthias Siegl

Geboren am 28.01.1978 in Füssen

Ausbildung und Studium

1989 - 1997	Staatliches Gymnasium Füssen, Abitur
1998 - 2004	Studium der Biologie (Dipl.) an der Universität Würzburg Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Biochemie; Tierökologie / Tropenbiologie
2003 - 2004	Anfertigung der Diplomarbeit: ,The regulatory network of LitR in <i>Vibrio fischeri</i> : a microarray-based characterization‘ im Labor von Prof. Edward Ruby am Pacific Biomedical Research Center, Kewalo Marine Laboratories, University of Hawai’i at Manoa, Honolulu, USA. Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Jörg Hacker

Promotion

09/2004 – 04/2009:	Anfertigung der Doktorarbeit: ,Einzelzell-basierte Methoden zur Charakterisierung Schwamm-assoziiierter Bakterien‘ am Zentrum für Infektionsforschung (ZINF) der Universität Würzburg Betreuerin: Prof. Dr. Ute Hentschel
ab WS 2005	Mitglied im Doktorandenkolleg ,Infektionsforschung‘
SS 2007 - WS 2008	Doktorandensprecher des Instituts für molekulare Infektionsbiologie (IMIB) und des Zentrums für Infektionsforschung (ZINF) an der Universität Würzburg