

DNA Microarray-Technologie zur Klassifizierung von Actinomyceten der Gattung *Kitasatospora*



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller- Universität Jena**

Von
Apotheker Sebastian Günther
geboren am 31.07.1976 in Leinefelde

Jena, Juli 2004

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
A. bidest.	bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCD	Charge-Coupled Device
cDNA	complementary DNA
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung Mikroorganismen und Zelllinien
DSM	Deutsche Sammlung Mikroorganismen Nummer
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
engl.	englisch
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> : und andere
Ethidiumbromid	3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiumbromid
Exp.	Experiment
Fa.	Firma
g	Gramm
h	Stunde(n)
HAc	Essigsäure
HKI	Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Jena
IFO	Institute For Fermentation, Osaka, Japan
IMET	Ehemaliges Institut für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena
IPTD	Isopropyl-β-d-thiogalactopyranosid
ITS	Internal Transcribed Spacer
JCM	Japan Collection Of Microorganisms, Wako-shi, Japan
<i>K.</i>	<i>Kitasatospora</i>
Kap.	Kapitel

kb	Kilobasen
KoAc	Kaliumacetat
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAF	Laminar Air Flow
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
Lit.	Literatur, Quellenangabe
LBA-Medium	Luria-Bertani-Ampicillin-Medium
Lsg.	Lösung
M	molar (mol/l)
MCS	multi cloning site (multiple Klonierungsstelle)
min	Minute
mA	Milli- (1x10 ⁻³) Ampere
ml	Milli- (1x10 ⁻³) Liter
µl	Mikro- (1x10 ⁻⁶) Liter
mm	Milli- (1x10 ⁻³) Meter
µm	Mikro- (1x10 ⁻⁶) Meter
mM	mili(1x10 ⁻³) molar
m/m	Masse pro Masse
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
m/v	Masse pro Volumen
N	normal
NaAc	Natriumacetat
nm	Nano- (1x10 ⁻⁹) Meter
Nr.	Nummer
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	pH-Wert
Pos.	Position
rDNA	ribosomale DNA
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
S.	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SL	Stammlösung
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
spec.	Spezies

subsp.	Subspezies
SSC	Sodium chloride, Sodium citric acid
SSPE	Sodium chloride, Sodium phosphate dibasic, Ethylenediaminetetraacetic acid, Dodecyl sodium sulfate
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TE	TRIS-EDTA-Puffer
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
u.a.	unter anderem
U	unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
v/v	Volumen / Volumen
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-D-Galactosid
Zss.	Zusammensetzung
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
Nukleotidbasen	A Purinbase Adenin G Purinbase Guanin C Pyrimidinbase Cytosin T Pyrimidinbase Thymidin

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Entwicklung der Taxonomie der Streptomyceten und verwandter Gattungen insbesondere <i>Kitasatospora</i>	1
1.2. Molekularbiologische Ansätze zur Taxonomie der Familie <i>Streptomycetaceae</i>	4
1.3. Die DNA-Microarray-Technologie und ihre Anwendung	8
1.4. Anwendung von DNA-Microarrays zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen.	11
1.5. Zielstellung der Arbeit	14
2. MATERIALIEN UND METHODEN	17
2.1. Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits	17
2.1.1. Verwendete Enzyme und Kits	17
2.1.2. Chemikalien, Materialien und Geräte	17
2.2. Verwendete Bakterienstämme	19
2.3. Zellanzucht	25
2.3.1. Nährmedien	25
2.3.2. Zellanzucht der untersuchten Actinomyceten	25
2.3.3. Zellanzucht der <i>E. coli</i> -Stämme	25
2.3.4. Stammhaltung der rekombinanten <i>E. coli</i> -Stämme	26
2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA	26
2.4.1. Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	26
2.4.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion	27
2.4.3. Fällung von DNA mit Isopropanol oder Ethanol	27
2.4.4. Agarosegelelektrophorese	27
2.5. Isolierung von DNA	28
2.5.1. Präparation von DNA aus <i>Streptomyces</i> Reinkulturen	28
2.5.2. Präparation von DNA aus <i>Kitasatospora</i> Reinkulturen	29
2.5.3. Plasmid Maxipräparation des Vektors Bluescript SK II (+)	30
2.5.4. Minipräparation von Plasmiden aus <i>E. coli</i> (Stamm: Top10) [90]	31
2.5.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	32
2.5.6. Isolierung von DNA aus Bodenproben mit Hilfe des Ultra Clean® Soil DNA Isolation Kits	32

2.6.	Enzymatische Modifikationen von DNA	33
2.6.1.	Restriktionsverdau von Plasmid-DNA durch Endonukleasen	33
2.6.2.	Ligation von DNA-Fragmenten	36
2.7.	Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)	37
2.7.1.	Allgemeine PCR-Vorgehensweise	37
2.7.2.	Amplifikation der 16S-23S rDNA von <i>Streptomyces</i> und <i>Kitasatospora</i> zur Klonierung	38
2.7.3.	Amplifikation der 16S-23S rDNA aus <i>Streptomyces</i> und <i>Kitasatospora</i> für Hybridisierungsexperimente	40
2.7.4.	Amplifikation der 16S-23S rDNA nach DNA-Extraktion aus Bodenproben	41
2.8.	Transformationsverfahren	41
2.8.1.	Präparation von kompetenten Zellen nach Hanahan [91]	41
2.8.2.	Transformation der kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	42
2.8.3.	Der X-Gal-Test zur Selektion auf rekombinante <i>E. coli</i> -Klone	43
2.9.	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA	43
2.10	Hybridisierung von PCR-Fragmenten mit dem AT[®]-Reader-System	44
2.10.1.	Durchführung der Hybridisierung von 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten auf dem DNA-Microarray	45
2.11.	Hybridisierung von Gesamt-DNA mit dem AT[®]-Reader-System	46
2.11.1.	Durchführung der Hybridisierung von Gesamt-DNA	47
2.12.	Detektion der Hybridisierung der 5'-biotinylierter PCR-Fragmente durch enzymatisch katalysierte Farbbildung	48
2.13.	Analyse der DNA-Sequenzen	48
2.13.1.	Sequenz-Alignment	48
2.13.2.	Berechnung der prozentualen Übereinstimmung der Sequenzen der 16S-23S rDNA-Region	48
2.13.3.	Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten	49
2.13.4.	Auswahl der Oligosequenzen für das DNA-Microarray	49
2.14.	Synthese der DNA-Microarrays	50
3.	ERGEBNISSE	51
3.1.	Auswahl einer geeigneten Zielregion der Gensonden für das DNA-Microarray	51

3.2. Amplifizierung und Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region von Actinomyceten	51
3.2.1. Amplifizierung der 16S-23S rDNA-Region	51
3.2.2. Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region der Actinomyceten	52
3.3. Alignment und Sequenzanalyse der 16S-23S rDNA-Region	53
3.3.1. Variabilität der 16S-23S rDNA-Region bei den untersuchten Actinomyceten	55
3.3.2. Stammbaum der untersuchten Actinomyceten	56
3.4. Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign	56
3.4.1. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign " <i>Kitasatospora</i> I"	56
3.4.2. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign " <i>Kitasatospora</i> II"	58
3.4.3. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign " <i>Kitasatospora</i> III"	59
3.5. Ergebnisse der DNA-Microarray Evaluierung	60
3.6. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "<i>Kitasatospora</i> I"	66
3.6.1. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. azatica</i>	66
3.6.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. phosalacinea</i>	67
3.6.5. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. mediocidica</i> und <i>K. cystarginea</i>	69
3.7. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "<i>Kitasatospora</i> II"	69
3.7.1. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. azatica</i>	70
3.7.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. mediocidica</i>	71
3.7.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus <i>K. putterlickiae</i>	71
3.7.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten ampilifiziert aus <i>K. gansuanensis</i>	72
3.8. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit PCR-Fragmenten aus Bodenisolaten und Bodenproben auf dem Microarray "<i>Kitasatospora</i> II"	72
3.8.1. Hybridisierung von PCR-Fragmenten von <i>Kitasatospora</i> Stamm "HKI-2122-22"72	72
3.8.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus Bodenisolat "J07"	73
3.8.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus inokulierten Bodenproben	74
3.8.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus nativen Bodenproben	75
3.9. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "<i>Kitasatospora</i> III"	76
3.9.1. Hybridisierung von PCR Fragmenten aus Reinkulturen von <i>K. mediocidica</i> und <i>K. cystarginea</i>	76

3.9.2.	Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus nicht valide beschriebenen <i>Kitasatospora</i> Spezies	77
3.9.3.	Hybridisierung von PCR-Fragmenten generiert aus der nativen Bodenprobe "HKI-2293"	79
3.9.4.	Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus <i>K. cystarginea</i> und Detektion mittels enzymatisch katalysierter Farbbildung	80
3.9.5.	Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus Bodenprobe "HKI-2293" und Detektion mittels enzymatisch katalysierter Farbbildung	81
3.10.	Test des Hybridisierungsverhaltens der Gensonden mit dem DNA-Microarray "<i>Kitasatospora</i> III" bei Verwendung von "capture-probe"-Oligonukleotiden	82
3.11.	Test des Hybridisierungsverhaltens der gattungsspezifischen Gensonden mit den DNA-Microarrays "<i>Kitasatospora</i> I-III"	84
3.11.1.	Hybridisierungsverhalten der gattungsspezifischen Gensonden " <i>Kitasatospora</i> universal I-III"	84
4.	DISKUSSION	86
4.1.	Auswahl einer geeigneten Zielregion der Gensonden für das DNA-Microarray und Sequenzanalyse der Actinomyceten-Spezies	86
4.2.	Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays für PCR-Fragmente aus Reinkulturen und gemischten Proben	89
4.3.	Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays für PCR-Fragmente aus Bodenproben	91
4.4.	Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays bei Verwendung von "capture-probe"-Oligonukleotiden	94
4.5.	Hybridisierungsverhalten der gattungsspezifischen Gensonden mit den DNA-Microarrays " <i>Kitasatospora</i> I-III"	95
4.6.	Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays mit enzymatischer Markierung	96
4.7.	Zusammenfassung und Ausblick	97
5.	LITERATUR	I

ANHÄNGE

1. Einleitung

1.1. Die Entwicklung der Taxonomie der Streptomyceten und verwandter Gattungen insbesondere *Kitasatospora*

Die Familie *Streptomycetaceae* steht seit nunmehr 50 Jahren im Blickpunkt des Interesses der Naturstoff-Forschung. Die ihr zugehörige Gattung *Streptomyces* produziert über die Hälfte der 10.000 dokumentierten bioaktiven Inhaltsstoffe. Streptomyceten bilden vor allem ein reiches Reservoir an Antibiotika. Aber auch andere Gattungen innerhalb dieser Familie, wie z.B. die Gattung *Kitasatospora*, weisen ein breites Spektrum an bioaktiven Naturstoffen auf. Trotz der großen wissenschaftlichen und wirtschaftlichen Bedeutung der Familie ist die Taxonomie der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* noch ungeordnet und unterliegt ständigem Wandel [1]. Dies liegt zum einen an der großen Anzahl an Spezies (500 valide beschriebene Spezies), welche die Gattung *Streptomyces* beinhaltet und der damit verbundenen Vielfalt an morphologischen, physiologischen und biochemischen Merkmalen auf der inter- und intraspezifischen Ebene, als auch an der häufigen Ähnlichkeit dieser Merkmale bei beiden Gattungen.

Die Gattung *Streptomyces* wurde von Waksman und Henrici 1943 [2] vorgeschlagen und aufgrund morphologischer Merkmale und des Zellwandtyps in die Familie *Streptomycetaceae* eingeordnet. Das Screening nach bioaktiven Inhaltsstoffen von Streptomyceten führte zu einem Anstieg der Spezieszahl von etwa 40 Arten auf über 3.000. Dies lag vor allem an der Praxis, Naturstoffproduzenten sofort als neue Art zu klassifizieren, wobei viele dieser Arten nur Synonyme darstellen.

Durch die Initiierung des "International *Streptomyces* Project-ISP" (1964) wurden Standardidentifikationskriterien und Typ-Stämme eingeführt, um die Zahl der ungenügend beschriebenen Synonymspezies zu reduzieren. Shirling und Gottlieb [3, 4] erarbeiteten diese Standardkriterien. Mehr als 450 Streptomyceten wurden neu beschrieben, Typ-Stämme gewählt und in internationalen Kultursammlungen hinterlegt. Williams *et al.* [5] nutzten 1983 die numerische Taxonomie, welche auf phänotypischen Merkmalen beruht, zu einer weiteren Reduktion der beschriebenen Spezies. So führte Bergey's Manual 1989 nur noch 142 Spezies [6, 7] im Vergleich zu 463 Spezies in der Ausgabe von 1974 [7].

Das Aufkommen der numerischen Taxonomie 1973 [8] führte weiterhin zu einer Reklassifikation nahe verwandter Gattungen in die Gattung *Streptomyces* (*Actinopycnidum*, *Actinosporangium*, *Chainia*, *Elytrosporangium*, *Microellobospora* und *Kitasatoa* [5, 9].

Diese vor allem auf phänotypischen Merkmalen basierende Klassifizierung änderte sich mit dem Aufkommen von chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden in der Taxonomie. Dazu zählt die Untersuchung der Zellwandzusammensetzung [10], Phagentypisierung [11], DNA-DNA-Hybridisierung [12], ELISA [13], der Vergleich ribosomaler Proteine [14] und der Vergleich von 16S und 23S rDNA-Sequenzen [15]. Diese Methoden wurden jedoch meist unabhängig voneinander eingesetzt und die Entwicklung eines kombinierten Standards steht immer noch aus.

Die Gattung *Kitasatospora* (früher: *Kitasatosporia*) hat eine kurze, dennoch turbulente taxonomische Entwicklung. Sie beinhaltet derzeit 13 valide beschriebene Spezies [16]. Vorgestellt 1982 von Omura *et al.* [17], wurde sie nachfolgend 1992 -trotz Unterschieden im Zellwandaufbau- aufgrund von 16S rDNA-Übereinstimmungen in die Gattung *Streptomyces* eingegliedert [18, 19]. Diese Reklassifikation wurde von Zhang *et al.* [20] 1997 annulliert, da bei Untersuchungen der 16S-23S rDNA-intergenetischen Spacer-Region (ITS-"internal transcribed spacer") gezeigt werden konnte, daß die Gattung *Kitasatospora* einen stabilen monophyletischen Cluster abseits der Gattung *Streptomyces* bildet. *Streptomyces* und *Kitasatospora* stellen wahrscheinlich Schwester-Taxa dar [22]. Nach heutigem Wissensstand (2004) gehört die Gattung *Kitasatospora* zusammen mit den Gattungen *Streptacidiphilus* und *Streptomyces* zur Familie der *Streptomycetaceae* [21]. Die Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* haben folgende Eigenschaften:

Streptomyces

Die Gattung *Streptomyces* stellt meist bodenbewohnende Gram-positive aerobische Eubakterien der Ordnung *Actinomycetales* in der Klasse der *Actinobacteria* dar. Wie viele

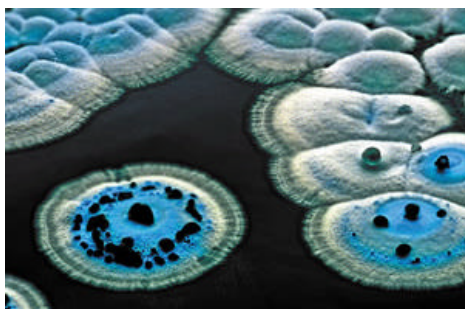


Abb. 1: *Streptomyces coelicolor*

Actinomyceten zeigen die Streptomyceten die Fähigkeit zur Synthese eines breiten Spektrums an niedermolekularen Naturstoffen und extrazellulären Enzymen. Sie haben einen hohen DNA G+C Gehalt von 69-78 % [22] und produzieren ein weit verzweigtes Substrat mit Luftmycel. Weiterhin zeigen sie einen komplexen Entwicklungszyklus (s. Abb. 2). Die Sub-

tratyphen haben einen durchschnittlichen Durchmesser von 0,5-1,0 μm und zeigen oft ein Fehlen der Zellwand während der vegetativen Phase.

Das Wachstum findet in der Hyphenspitze statt und wird von einer Verzweigung begleitet, wodurch eine komplexe eng verwobene Hyphenmatrix während der vegetativen Phase entsteht.

Mit zunehmenden Alter der Kolonie wird Luftmycel (Sporophor) produziert, welches sich zu Sporenketten (Konidien) entwickelt. Dies geschieht durch die Bildung von Zellwänden im vielkernigen Luftfilament und die anschließende Separation der Einzelzellen direkt zu Sporen [23]. Die Unterscheidung von anderen Actinomyceten erfolgt durch den Zellwandtyp, welcher als "Type I" sensu charakterisiert ist [10]. Universal für diesen Typ ist das Vorhandensein von LL-Diaminopimelinsäure und Glycin sowie das Fehlen bestimmter Zucker. Weiterhin ist der Acyl-Typus des Muramyl-Substituenten im Peptidoglykan der Zellwände bei Streptomyceten ein Acetylrest.

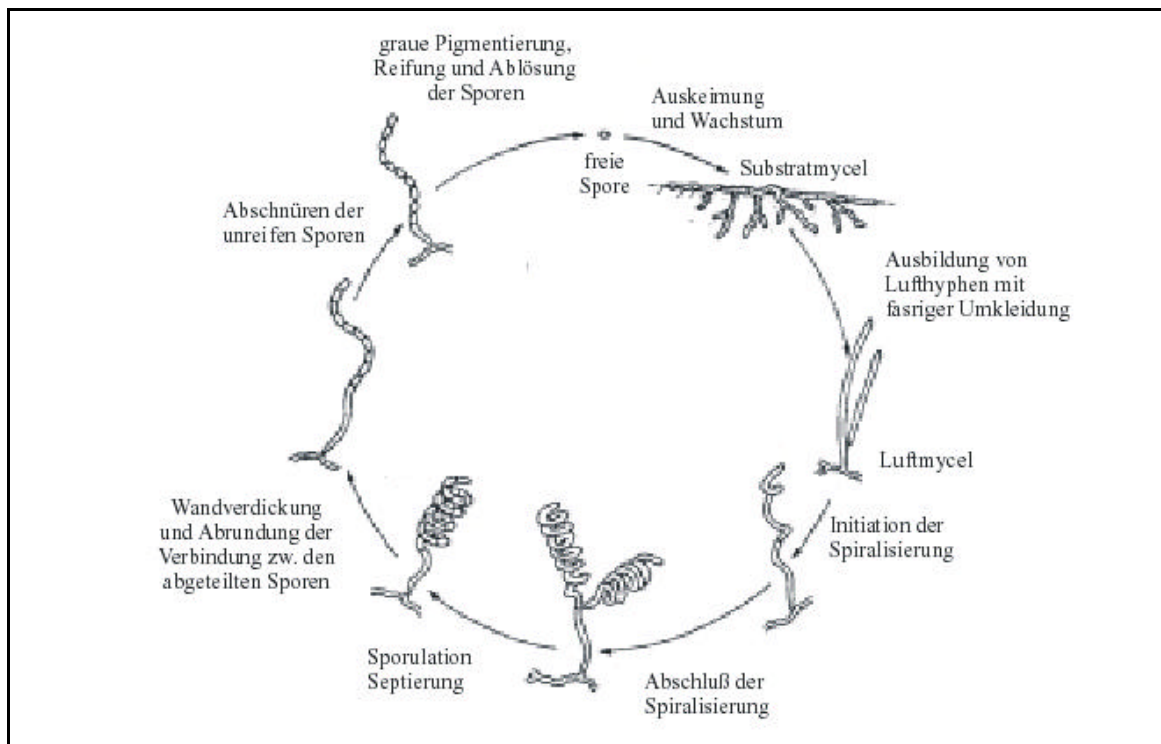


Abb. 2: Schematische Darstellung der morphologischen Differenzierung von Streptomyceten [24]

Kitasatospora

Die Gattung *Kitasatospora* stimmt in vielen Eigenschaften, wie z.B. den morphologischen Merkmalen, mit der Gattung *Streptomyces* überein. Sie stellt ebenfalls meist bodenbewohnende Gram-positive aerobische chemo-organotrophe Eubakterien der Ordnung *Actinomycetales* in der Klasse der *Actinobacteria* dar [20]. Die Gattung weist wie die Streptomyceten einen hohen DNA G+C Gehalt auf und produziert ein weit verzweigtes Substratmycel mit Luftmycel, daß in lange Sporenketten zerfällt. Die Unterscheidung von anderen Actinomyceten insbesondere der Gattung *Streptomyces* kann durch die Analyse von Gesamtzell-Hydrolysaten erfolgen.

Typisch für *Kitasatospora* ist das Vorhandensein von LL- und meso Diaminopimelinsäure, während bei *Streptomyces* keine meso Diaminopimelinsäure vorkommt.

1.2. Molekularbiologische Ansätze zur Taxonomie der Familie *Streptomycetaceae*

Die Anwendung molekularbiologischer Methoden zur Analyse des bakteriellen Genoms hat beträchtlich zur Erweiterung des Verständnisses der bakteriellen Taxonomie beigetragen.

Die Methoden ermöglichten einen Einblick in die phylogenetischen Beziehungen auf der Gattungs-, Spezies- und Subspeziesebene. Zur Analyse der DNA-Sequenzen wurden mehrere mathematische und statistische Theorien entwickelt [25-27]. Diese stützen sich auf die in den 60er Jahren relativ unabhängig voneinander entwickelten zwei Hauptrichtungen der Systematik, der schon erwähnten numerischen Taxonomie und der Kladistik (phylogenetische Systematik).

Die Kladistik wurde in der Zeit von 1950 bis 1966 von Henning entwickelt [28]. Diese Methode geht davon aus, daß eine Rekonstruktion der phylogenetischen Zusammenhänge nur auf gemeinsam erworbenen Merkmalen basieren kann, d. h. auf dem Vergleich des Zustandes des jeweiligen Merkmals bei allen untersuchten Organismen.

Es wird also verfolgt, wie sich Merkmale im Laufe der Evolution verändern [29]. Als Beispiel dafür ist hier die Parsimonie-Analyse zu erwähnen. Diese Methode basiert auf dem Prinzip der maximalen Sparsamkeit [27, 30, 31]. Es wird angenommen, daß die wahrscheinlichste Erklärung eines Datensets diejenige ist, welche die geringste Anzahl evolutionärer Schritte (Veränderungen) benötigt, d.h. sie ist die sparsamste Erklärung.

Die numerische Taxonomie stellt die zweite Hauptrichtung der Systematik dar. Sie betrachtet - mittlerweile meist EDV gestützt - eine Vielzahl von Merkmalen. Je mehr Merkmale von verschiedenen Spezies (oder anderen Taxa) übereinstimmen, desto näher sind sie untereinander verwandt.

Je mehr Arten man miteinander vergleicht, umso mehr Merkmale (Merkmalsausprägungen) muß man dabei heranziehen. Schwachpunkte liegen in der Tatsache, daß nicht alle Merkmale das gleiche Gewicht haben, daß weiterhin jedes Merkmal einen adaptiven Wert hat, die Selektion je nach Ort und Zeit unterschiedlich wirkt und dadurch eine Variation der Merkmale zutage tritt, die nur schwer standardisierbar ist.

DNA-DNA-Hybridisierung

Die DNA-DNA-Hybridisierung von Gesamt-chromosomaler DNA wird zur Identifizierung von Spezies der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* eingesetzt. Dabei wird die Rehybridisierung von Einzelstrang-DNA von verschiedenen Organismen untersucht. Der Grad der Ähnlichkeit wird als prozentuale Homologie angegeben. Dabei geht die genomische Speziesdefinition von einer prozentualen Homologie von mindestens 70% aus. Weiterhin sollte die Schmelzpunktdifferenz zwischen homologen und heterologen Hybriden 5°C nicht übersteigen [32].

Die DNA-DNA-Hybridisierung wird auch zur Klassifikation auf der Gattungsebene eingesetzt. So nutzten Witt & Stackebrandt [33] diese Methode zur Vereinigung der Gattung *Streptovorticillium* mit der Gattung *Streptomyces* aufgrund hoher prozentualer Homologien der beiden Gattungen. Allerdings untersuchten Labeda *et al.* [12] einige ehemalige *Streptovorticillium* Spezies und stellten keine Korrelation zwischen DNA-DNA-Hybridisierungsergebnissen und der phenetischen Klassifikation fest. Die DNA-DNA-Hybridisierung ist also als alleinige Klassifizierungsmethode nicht geeignet, besonders wenn eine beträchtliche genetische Instabilität innerhalb des Chromosoms vorliegt [34].

Restriktionsverdau von chromosomaler DNA

Die sogenannte "Low Frequency Restriction Fragment Analysis" (LFRFA) ist eine weitere molekularbiologische Methode welche komplette bakterielle chromosomale DNA nutzt, um taxonomische Informationen zu liefern.

Das Prinzip dieser Methode ist der Verdau der Gesamt-chromosomalen DNA mit Restriktionsendonukleasen, die nur an wenigen Stellen innerhalb der DNA schneiden. In der Streptomyceten-Taxonomie werden dazu seltene Endonukleasen genutzt. Die so entstandenen Fragmente werden mit Hilfe der Pulsfeld-Gelelektrophorese (PFGE) aufgetrennt und ergeben so ein charakteristisches Restriktionsmuster. Beyazova & Lechavelier [14] untersuchten mit dieser Methode 59 Stämme aus acht Spezies-Gruppen innerhalb der Gattung *Streptomyces* und konnten zeigen, daß diese Methode genutzt werden kann um die Stämme in Cluster aufzuteilen.

Allerdings konnte dabei nicht immer eine Übereinstimmung zu allen bisher postulierten Clustern [5] gefunden werden. Ein weiteres Problem bei der Nutzung dieser Methode ist das mögliche Auftreten von großen chromosomalen Amplifikations- und Deletionsraten [35].

RAPD-PCR

Die RAPD ("Randomly Amplified Polymorphic DNA")-PCR nutzt einzelne Primer mit zufälligen Nukleotidsequenzen zur Amplifikation von DNA bei niedrigen Annealing-Temperaturen zur Detektion von Polymorphismen [36]. Das resultierende Muster der amplifizierten PCR-Fragmente zeigt einen charakteristischen Fingerabdruck.

Damit kann man chromosomale Unterschiede von Stämmen erkennen, ohne vorher die Sequenz der chromosomalen DNA kennen zu müssen. Die RAPD-PCR stellt eine sehr schnelle Methode zum Screening von Streptomycceten und zur Erkennung von Übereinstimmungen von einzelnen Stämmen dar. Allerdings erfordert die Methode eine strikte Standardisierung der Reaktionsparameter. Dazu zählt insbesondere die Primersequenz, da ihre Auswahl den Nutzen dieser Technik stark beeinflusst [37]. Bei einer genauen Optimierung liefert die RAPD-PCR jedoch übereinstimmende Ergebnissen zu anderen Methoden (DNA-DNA-Hybridisierung, LFRFA).

Nukleinsäuresequenzvergleich

Zielregionen

Der Vergleich von rDNA-Sequenzen ist eines der leistungsfähigsten Werkzeuge der Taxonomie von Mikroorganismen. Die rDNA weißt aufgrund ihrer Aufgabe im Translationsapparat der Zelle funktionelle Konstanz auf. In Datenbanken sind mittlerweile ca. 20.000 rDNA-Sequenzen von verschiedenen Spezies hinterlegt [38, 39]. Die rDNA-Gene sind bei allen Bakterien hoch konserviert und können daher sowohl zur phylogenetischen Analyse [40, 41], als auch zur reinen Detektion von Mikroorganismen [42] eingesetzt werden. Besonders die 16S rDNA-Region stand bisher im Blickpunkt von taxonomischen Untersuchungen, da sie die evolutionäre Entwicklung der Organismen reflektiert [43, 44]. Die 16S rDNA zeigt sowohl Bereiche sehr hohen Konservierungsgrades, als auch Abschnitte, die variabel genug sind, um dort einzelne Spezies unterscheiden zu können. Die Nutzbarkeit solcher variablen Regionen zur Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen ist allerdings umstritten [15]. Bei den Streptomycceten weißt die 16S rDNA drei Abschnitte auf, die ausreichend Variationen in ihrer Sequenz zeigen um gattungs-spezifisch (alpha-Region: Pos. 982-998; beta-Region: Pos. 1102-1122) bzw. spezies-spezifisch (gamma-Region: Pos. 150-200) zu sein [37, 45]. Diese Regionen standen bisher im Mittelpunkt von molekularbiologischen Untersuchungen zur Taxonomie von Streptomycceten [15]. Weiterhin wurden auch 16S-23S rDNA (ITS) [46-48], 23S rDNA [15, 49] und 5S rDNA [37] sowie ribosomale Proteinsequenzen [19, 50] untersucht.

Bei der Nutzung von rDNA-Sequenzen muß allerdings auf Intraspezies-Variationen, intragenomische Heterogenität sowie methodische Unzulänglichkeiten geachtet werden [51-55]. Weitere Zielregionen bei taxonomischen Untersuchungen waren spezifische Gene. So nutzten Huddleston *et al.* [56] das Tryptophan-Synthase-Gen zum Sequenzvergleich von Streptomycin produzierenden Streptomyceten.

Sequenzanalyse der rDNA

Stackebrandt *et al.* [57] zeigten, daß die Auswahl der Targetsequenzen sehr wichtig für taxonomische Untersuchungen ist, da je nach Nutzung der verschiedenen Regionen (alpha-, beta-, gamma-Region) unterschiedliche Übereinstimmungen und damit Verwandtschaftsgrade erhalten werden. Kataokaa *et al.* [58] führten eine umfangreiche Untersuchung der gamma-Region von 89 Streptomyceten-Typstämmen durch, welche einige der Major-Cluster, die von Williams *et al.* [5] definiert wurden, umfassten. Es zeigte sich, daß die gamma-Region zur Untersuchung von Inter- und Intraspezies-Beziehungen genutzt werden kann, allerdings die Sequenzvariation zu hoch ist, um auf der Gattungsebene Beziehungen zu bestimmen. Nach Veröffentlichung dieser Studie hat dieselbe Arbeitsgruppe bei mittlerweile 485 Stämmen die gamma-Region sequenziert. Der Vergleich von Sequenzdaten der gamma-Region von wichtigen Vertretern der Major-Cluster [5] bestätigte diese Cluster, die aufgrund phänotypischer Merkmale aufgestellt wurden.

Hain *et al.* [47] untersuchten den Nutzen der 16S rDNA-Analytik zur Bestimmung von Intraspezies-Beziehungen innerhalb der Art *Streptomyces albidoflavus*. Sie zeigten allerdings, daß einzelne Stämme einer Spezies anhand ihrer 16S rDNA-Sequenz nicht unterschieden werden können. Diese Intraspezies-Unterscheidung war allerdings mit der 16S-23S rDNA-Region (ITS) möglich.

Von den 464 valide beschriebenen *Streptomyces* Spezies und 45 Subspezies [59] sind von ca. 120 Stämmen, welche etwa 70 Speziesgruppen umfassen, rDNA-Daten bekannt. Allerdings besteht weiterhin das Problem der schnellen Zuordnung neuer Stämme zu existierenden Spezies. Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Verbesserung der vorhandenen Methoden und die Schaffung eines polyphasischen Ansatzes zur Taxonomie der Familie *Streptomycetaceae*, der phänotypische, genotypische und phylogenetische Methoden einschließt.

1.3. Die DNA-Microarray-Technologie und ihre Anwendung

Die Nutzung von DNA-Microarrays eröffnet die Möglichkeit, die Genauigkeit der Sequenzanalyse von phylogenetisch interessanten Zielregionen mit der Schnelligkeit der Array-Technologie zu verbinden. Weiterhin stellt die DNA-Microarray-Technologie ein parallel arbeitendes Analysesystem dar [60], was die gleichzeitige Detektion von Organismen ermöglicht. Im folgenden Textabschnitt werden grundsätzliche Eigenschaften von DNA-Microarrays erläutert. Bei einem Array handelt es sich um eine zweidimensionale Anordnung von Biomolekülen auf einer Festkörperoberfläche (Substrat). Ein Microarray ist daher ein miniaturisiertes Array. Der Begriff entstand in Anlehnung an den Begriff "Microchip" aus der Halbleiter- und Microsystemtechnik. Die DNA-Microarray-Technologie entstand etwa 1990 aus der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Southern-Blot Methode. Die Entwicklung der Technologie ist in Ramsay [61] zusammengefasst. Seit Mitte der neunziger Jahre begann eine rasche kommerzielle Entwicklung, welche in Marshall [62] zusammengefasst ist. Die Entwicklung neuer DNA-Microarraysysteme hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen, allerdings ist keines der Systeme die verwendet wurde. So wird heute eine Vielzahl von Substanzen als Oberfläche verwendet. Das klassische Material war Glas. Es wird allerdings heute zunehmend durch andere Materialien ersetzt [62, 63]. Eine Unterteilung von Microarrays erfolgt erstens nach der Art der immobilisierten Biomoleküle (Sonden): Es werden sowohl DNA-Moleküle (Oligonukleotide, cDNA etc. [64]), als auch Proteine [65], Peptide und ganze Zellen eingesetzt [66]. Das in dieser Arbeit verwendete Microarray-Format entspricht einem DNA-Oligonukleotid-Microarray. Ein weiteres Unterscheidungskriterium ist die Art der Festkörperoberfläche (Substrat), geeignete Kunststoffe wie Nylon und Nitrocellulose ersetzt. Bedeutender für die Einteilung von DNA-Microarrays ist jedoch die Art der Herstellung des Microarrays. Es gibt eine Vielzahl von Herstellern und Methoden, die in Bowtell & Cheung zusammengefasst sind [67, 68]. Zwei Methoden spielen eine wichtige Rolle:

1. "*ex situ* Synthese"

Die Deposition „fertiger“ synthetischer Oligonukleotide auf ein Oberflächensubstrat bezeichnet man als "*ex situ* Synthese". Dabei werden Sondenmoleküle an eine definierte Stelle des Arrays aufgetropft ("Spotten") und anschließend orts aufgelöst auf dem Array über Anker-moleküle immobilisiert. Es werden Kontaktdruckverfahren (z.B. Contact Tip Deposition Printing, Micro Contact Printing, Elektrochemische Fokussierung) und kontaktfreie Verfahren (z.B. Piezoelektrisches Spotten, Bubblejet Printing) verwendet.

2. "in situ Synthese"

Bei der "in situ Synthese" werden die synthetischen Oligonukleotide auf einer definierten Stelle des Oberflächensubstrats schrittweise aus ihren Nukleotiden aufgebaut. Die dazu verwendeten Verfahren sind u.a. die Photolithographische Synthese mit Lochmasken sowie das MicroWetPrinting (μ WP: Einsatz strukturierter Membranen mit Fenstern).

Das Prinzip der Analyse der Wechselwirkungen einer Probe mit den (Gen)-Sondenmolekülen des Microarrays ist in Abb. 3 systematisch dargestellt.

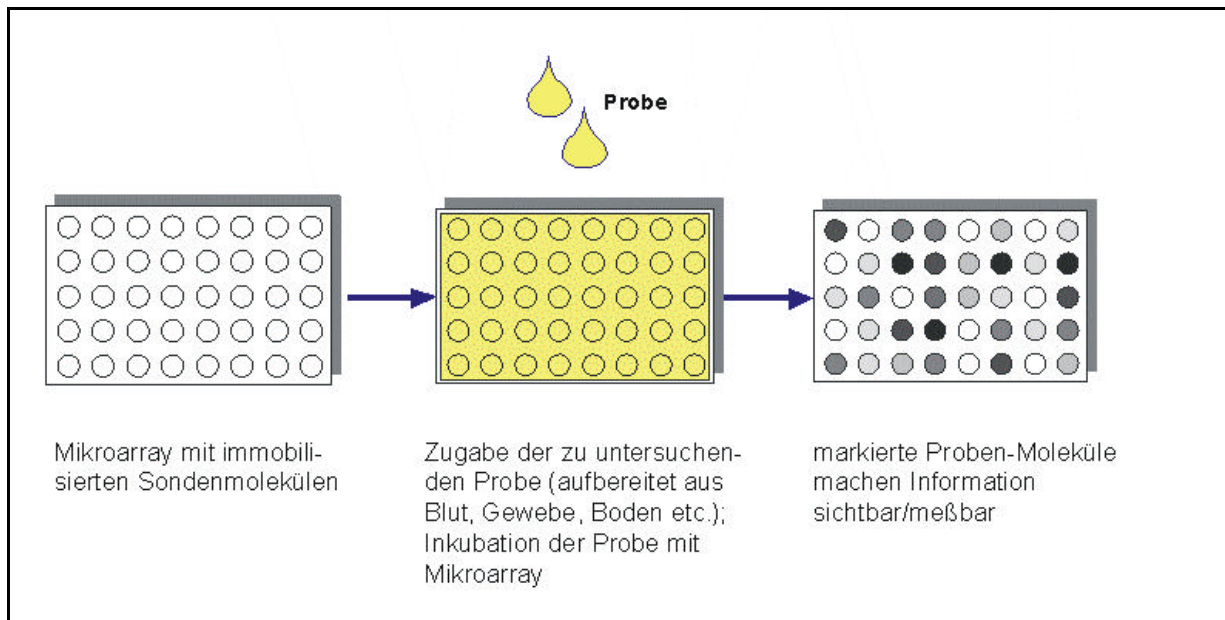


Abb. 3: Prinzip der Informationsgewinnung auf einem Microarray

Bei der Analyse der Wechselwirkungen auf dem Array spielen zwei Reaktionspartner eine wichtige Rolle. Dies wird im folgenden Text anhand eines DNA-Microarrays erläutert, da ein solches Array in dieser Arbeit verwendet wurde.

Die (**Gen**)-**Sonde** (engl. *probe*) ist die auf dem Substrat immobilisierte Substanz, in diesem Fall ein synthetisches DNA-Oligomer. Diese immobilisierten Oligonukleotide besitzen eine bekannte Sequenz (z.B. die spezies-spezifische Gensonde eines Mikroorganismus).

Die zu untersuchende **Probe** (engl. *target*) ist eine Nukleinsäure (z.B. PCR-Fragment welches aus der DNA des zu untersuchenden Organismus amplifiziert wurde), die an die immobilisierten Sondenmoleküle bindet.

Die Position der Gensonden auf dem Array ist bekannt. Damit ist eine orts aufgelöste Detektion der Hybridisierung (Wechselwirkung zwischen Gensonde und Targetsequenz der Probe) möglich. Dadurch ist über die Position der Gensonde die Wechselwirkung an einer bestimmten Gensondensequenz bestimmbar.

Bei einer positiven Wechselwirkung ist über die Sequenz der spezies-spezifischen Gensonde der zu detektierende Mikroorganismus erkennbar. Der Nachweis der Wechselwirkung erfolgt über eine Markierung einer der beiden Reaktionspartner (meistens der Probe). Gängige Markierungsmethoden sind in Tab. 1 aufgeführt.

Tab. 1: Markierungsmethoden für DNA-Microarrays

Targetmarkierung	Prozeß	Detektionsmethode
Fluoreszenzfarbstoffe (Cy-3, Cy-5, Texas Red, usw.)	Einbau markierter Nukleinsäurebausteine bei Probenaufarbeitung (z.B. PCR)	Konfokale Laserscanner Fluoreszenz-Mikroskope
radioaktive Markierung (^{32}P , ^{33}P , ^{35}S)	Einbau ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S markierter Nukleinsäurebausteine	Röntgenfilme, Autoradiographie-Imaging-Systeme
chemilumineszente Markierung (Digoxigenin, Biotin)	Markierung mit chemilumineszenten Molekülen oder Enzymen	Filme Lumineszenzreader-Systeme
Gold/Silber Methode	Markierung mit Gold-Partikeln (z.B. über Biotin/Streptavidin-Gold)	Durchlichtmessungen mit hochauflösender CCD-Kamera

Die Anwendungsgebiete für Microarrays sind sehr vielfältig, und die Technologie hat einen signifikanten Einfluß auf die Entwicklung von Genomstudien, da mit ihr das gleichzeitige Screening von einer Vielzahl an Genen möglich ist. So ist derzeit vor allem der Einsatz von Microarray-Technologie auf den Gebieten der Genexpressionsanalyse [69], Mutationsanalyse [70] und SNP-Analyse [71] häufig. In letzter Zeit nimmt ihr Einsatz aber auch auf den Gebieten der Pharmacogenomics [72, 73] und Toxicogenomics [74] zu.

Die Detektion von Mikroorganismen über spezies-spezifische Gensonden ist ein relativ neues Anwendungsgebiet, worauf im nächsten Kapitel eingegangen wird.

Bei allen Anwendungen ist jedoch die prinzipielle Vorgehensweise der Erstellung, Anwendung und Auswertung eines Microarrays gleich und in Abb. 4 dargestellt.

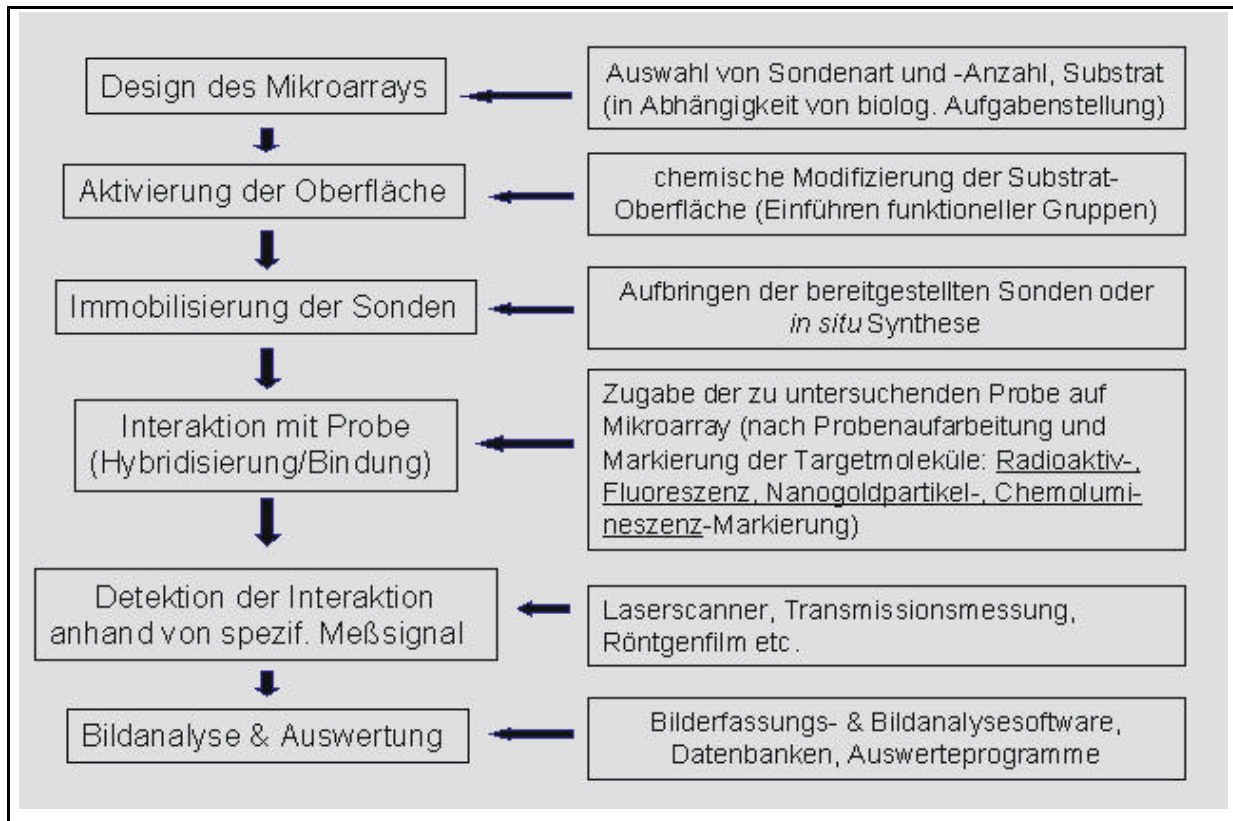


Abb. 4: Erstellung, Anwendung und Auswertung von Microarrays

1.4. Anwendung von DNA-Microarrays zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen.

Obwohl sich die Mehrzahl der Anwendungen von DNA-Microarrays vor allem auf Genexpressionsanalysen beschränken, expandiert die Technologie auch in neue Bereiche und Anwendungen. In der ökologischen Mikrobiologie geht die Entwicklung in Richtung der Auffindung von spezifischen Sequenzen in komplexen Umweltproben. Die DNA-Microarray-Technologie hat einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Methoden (s. Kap.1) [75]. Die Anzahl der Publikationen, die sich mit der Anwendung von DNA-Microarrays zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen befassen, steigt in den letzten Jahren ständig [75]. Ein Hauptproblem der ökologischen Mikrobiologie ist die unzureichende Kultivierbarkeit von vielen Mikroorganismen mit Standardmethoden.

Daher können manche Organismen in mikrobiellen Lebensgemeinschaften nicht erfaßt werden. DNA-Microarrays sind in der Lage dieses Problem zu lösen, da diese Technologie für die Detektion von Mikroorganismen keine Kultivierung benötigt.

Die potentiellen Einsatzgebiete für DNA-Microarrays sind dabei vielfältig, jedoch steht die Entwicklung dieser Technologie für den Einsatz zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen noch am Anfang.

So sind Probleme, wie die Detektionsempfindlichkeit in komplexen Gemischen oder Verunreinigungen durch organische Inhaltsstoffe (z.B. Huminsäuren) noch nicht vollständig bearbeitet. Vor allem das Grundproblem der Unterscheidung der Variationen in der Signalintensität aufgrund der Fülle verschiedener Oligonukleotidproben vom beabsichtigten Effekt, der durch Sequenzvariationen der Oligonukleotide ausgelöst wird, und der eine Unterscheidung und Detektion von Spezies ermöglicht, ist ungelöst.

Weiterhin muß bei dem Design des DNA-Microarrays auch auf die Länge der verwendeten Oligonukleotide geachtet werden. So zeigen lange Oligonukleotid-Sonden meist stärkere Signale, allerdings nimmt auch die Spezifität stark ab [76]. Bei kürzeren Sonden kehrt sich dieser Effekt um. Abhängig von der ausgewählten Zielregion, aus der die Oligonukleotid-Gensonde stammt, ist oft die Unterscheidung von einzelnen Mismatches (SNP) nötig. Daher sollten Oligonukleotide gewählt werden, die möglichst viele Mismatches im Vergleich zu anderen Sonden aufweisen, was eine Detektion erleichtert [77]. Im Folgenden soll der Stand der Literatur auf dem Gebiet der Anwendung von DNA-Microarrays zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen umrissen werden.

Call [78] untersuchte die Sensitivität und Spezifität von PCR-Amplifikationen kombiniert mit DNA-Microarray-Versuchen für die Detektion und Genotypisierung von pathogenen *E. coli* Stämmen (O157:H7). Der Versuchsaufbau beinhaltete eine initiale Multiplex-PCR von verschiedenen Virulenzfaktoren gefolgt von einer Hybridisierung auf einem Microarray mit 20-30mer Oligonukleotiden. Die Ergebnisse zeigten eine Detektion der Virulenzfaktoren im Femtogramm-Bereich, sowie eine eindeutige Zuordnung der fünf getesteten Stämme. Eine ähnliche Studie wurde auch von Chizhikov [79] durchgeführt. Dieser untersuchte 15 verschiedene Enterobakterienstämme (z.b. *Shigella*, *Salmonella*) in Bezug auf verschiedene Virulenzfaktoren. Auch hier war eine eindeutige Zuordnung der Stämme bei Verwendung von Reinkulturen möglich. Nach den Anthrax-Anschlägen in den USA (2001) entwickelten Wilson *et al.* [80] ein DNA-Microarray zur Detektion von 18 verschiedenen pathogenen Mikroorganismen, darunter Bakterien, Viren, Algen und Pilze. Das verwendete High-Density-Microarray beinhaltete 53.660 überlappende 20mer Oligonukleotide, welche die Pathogenitäts- und Virulenzgene der Organismen beinhalteten. Bei 91% der untersuchten Proben konnten die pathogenen Organismen direkt nachgewiesen werden. Thompson [81] untersuchte mit Microarrays, welche mit gesamtgenomischer DNA von Bakterien gespottet

wurden, die Identifizierbarkeit von unbekanntem Isolate. Bei Hybridisierungstemperaturen von 50°C und 50% Formamid konnte so zwischen den Spezies innerhalb einer Gattung unterschieden werden. Eine Unterscheidung auf der Subspeziesebene war nicht möglich. Diese war jedoch mit einer Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 65-75°C zu erreichen. In einer weiteren Studie [82] wurde mit Hilfe des GeneChip® Systems (Affymetrix, USA) die Möglichkeit der Nutzung des 16S rDNA-Operons zur Identifizierung mikrobieller Isolate untersucht. Das High-Density-Array beinhaltete ca. 62.000 20mer Oligonukleotide. Die erste Hälfte der Oligomere stellten den "Perfect Match" dar, d.h. sie stimmten mit den Sequenzen der untersuchten Organismen aus dem Ribosomal Database Project [38] vollständig überein. Die andere Hälfte der Proben zeigte alle am elften Nucleotid der 20mer Oligonukleotide einen Mismatch, um eventuelle unspezifische Hybridisierungen zu untersuchen. Mit dem so erstellten Microarray wurden 17 Typstämme mit medizinischer Bedeutung untersucht. Bei der Verwendung von Reinkulturen konnten 15 der 17 Stämme korrekt nachgewiesen werden. Allerdings war eine korrekte Zuordnung aus komplexen Gemischen der Typstämme nicht möglich. Liu und Mitarbeiter [77] erarbeiteten 2002 das Design für ein hierarchisches DNA-Microarray, das 30 Oligonukleotide (20mere) aus verschiedenen taxonomischen Klassen beinhaltete, und zur Identifikation von fünf nahe verwandten *Bacillus*-Spezies eingesetzt wurde. Alle untersuchten Spezies konnten aus Reinkulturen und in definierten Gemischen korrekt detektiert werden.

DNA-Microarrays gewinnen auch auf dem Gebiet der Untersuchung der mikrobiellen Diversität von bestimmten Habitaten zunehmend an Bedeutung. So publizierten Loy *et al.* [83] einen phylogenetischen Chip für sulfatreduzierende Prokaryoten ("SRP-PhyloChip") mit hierarchischer (unterschiedliche taxonomische Ebene) und paralleler (gleicher taxonomische Ebene) Spezifität. Das DNA-Microarray bestand aus 132 Oligonukleotiden (18mere), welche unterschiedliche Regionen des 16S rDNA-Operons beinhalteten. Es wurden 41 Reinkulturen sowie zwei bakterielle Lebensgemeinschaften untersucht. Wiederum war eine eindeutige Zuordnung der Stämme bei Verwendung von Reinkulturen möglich, allerdings zeigten sich viele falsch negative Ergebnisse bei der Untersuchung von gemischten Kulturen. Peplies [84] nutzte einen ähnlichen Versuchsaufbau mit 20 hierarchisch geordneten Oligonukleotid-Sonden (15-20mere), welche das 16S rDNA-Operon als Zielregion hatten. Diese Oligonukleotidsonden wurden mit Kontrollsonden verglichen, die jeweils ein Mismatch enthielten. Dazu wurden fünf zufällig ausgewählte Isolate als Modellorganismen genutzt. Die Studie diente vor allem der Untersuchung der Möglichkeit der Übertragung von für die FISH-Analyse (Fluoreszenz *In Situ* Hybridisierung) ausgewählten Sonden auf das Microarray-

format. Die Untersuchung zeigte, daß die Sonden eine hohe Spezifität aufwiesen und nur dann Kreuz-Hybridisierungen auftraten, wenn die Mismatches sich an den Enden der Oligonukleotide befanden. In einer Studie von Stine [85] wurde die Zusammensetzung einer komplexen marinen mikrobiellen Lebensgemeinschaft mit Hilfe von DNA-Microarrays untersucht. Dabei diente wiederum das 16S rDNA-Operon als Zielregion der Gensonden und es wurden aus vier verschiedenen Regionen innerhalb des Operons Oligonukleotidproben generiert. In allen Studien zeigte sich, daß DNA-Microarraydaten aus Hybridisierungsexperimenten mit Umweltproben schwierig zu interpretieren sind. Dies liegt an der großen Anzahl falsch positiver Signale, was mit der komplexen Zusammensetzung des Metagenoms dieser Proben zu begründen ist. Weiterhin konnten Small *et al.* [86] zeigen, daß die Zugänglichkeit von Gensonden während der Hybridisierung durch ihre Sekundärstruktur extrem variabel sein kann. Mit den verwendeten "Chaperon Detector"-Oligonukleotiden (Markeroligonukleotide) die zur Target-DNA gegeben wurden, konnten die Spezifität der Hybridisierungssignale verbessert werden und *Geobacter* Spezies direkt aus dem Boden nachgewiesen werden. Chandler [87] zeigte ebenfalls, daß sowohl die Sequenz der Gensonden als auch die Sekundärstruktur der Target-DNA die Haupteinflußfaktoren für eine hohe Spezifität der Sonden sind.

1.5. Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung der DNA-Microarray-Technologie als molekularbiologische Methode zur Detektion von Actinomyceten. Mit diesem "Taxonomie-Chip" soll vor allem die taxonomische Klassifizierung der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* verbessert werden.

Die beiden Actinomyceten-Gattungen beinhalten eine große Anzahl antibiotikaproduzierender Spezies. Ein Hochdurchsatzverfahren zur taxonomischen Einordnung würde die Suche nach Naturstoffproduzenten bei diesen Gattungen, und damit die Suche nach neuen Leitstrukturen für Antibiotika, erheblich erleichtern. Durch die steigende Zahl der Antibiotikaresistenzen ist ein Hochdurchsatzverfahren zur schnellen Identifizierung von bekannten und neuen Spezies nötig, da es das biologische Screening erheblich beschleunigen würde. Aufgrund der großen phänotypischen und chemotaxonomischen Gemeinsamkeiten der beiden Gattungen ist eine Diskriminierung mit herkömmlichen Methoden schwierig und zeitaufwendig. Beim Screening nach neuen Naturstoffproduzenten ist die sichere Zuordnung eines Bakterienstammes zu einer Gattung oder gar Spezies der zeitaufwendigste Teil der Isolierung.

Es kommt immer wieder zu einer unnötig langen Bearbeitung von Isolaten, die sich dann als schon bekannte Spezies erweisen. Dies liegt an den z.T. wenig aussagekräftigen morphologischen Merkmalen von Bakterienisolaten. Es sind oftmals aufwendige chemotaxonomische Untersuchungen notwendig, um ein Isolat sicher zuzuordnen.

Daher soll ein molekularbiologischer Ansatz zur taxonomischen Bestimmung erarbeitet werden, der eine schnelle und kostengünstige Möglichkeit bietet, in einem Vorscreening interessante Isolate auszuwählen, schon bekannte aber nicht weiter zu bearbeiten. Im ersten Teil der Arbeit muß zunächst eine geeignete Zielregion für die Gensonden ermittelt werden. Diese Zielregion muß einerseits konserviert sein und andererseits eine genügend hohe Variabilität aufweisen, um spezies-spezifisches Gensondendesign zu ermöglichen. Dazu eignet sich idealerweise die rDNA von Mikroorganismen, da sie funktionelle Konstanz besitzt, aber auch genügend Interspezies-Variabilität aufweist. Zunächst muß der genaue Bereich innerhalb des 16S-23S-5S rDNA-Operons definiert werden, der als Zielregion dienen soll.

Dazu werden in einem breiten Ansatz, der möglichst viele *Streptomyces* sowie *Kitasatospora* Spezies umfaßt, die vorhandenen Sequenzdaten für Bereiche des 16S-23S-5S rDNA-Operons aus Datenbanken auf ihre Eignung als Zielregion überprüft. Nach der Festlegung auf eine Zielregion sollen dann die vorhandenen Sequenzdaten durch zusätzliche Sequenzierungen von Typstämmen untermauert werden. Wenn genügend Sequenzdaten vorhanden sind, erfolgt dann die Auswahl von Oligonukleotid-Gensonden. Diese spezies-spezifischen und gattungsspezifischen Gensonden werden mit Hilfe von Datenbankalgorithmen (BLAST®, IDT Primer®) auf ihre Eignung überprüft.

Die Oligonukleotide werden auf ein neuartiges DNA-Microarrayformat übertragen. Dabei wird der Schwerpunkt des ersten Arraydesigns hauptsächlich bei Spezies der Gattung *Kitasatospora* liegen, um zuerst einmal die prinzipielle Machbarkeit des "Taxonomie-Chips" zu untersuchen. Nach der Einstellung der Reaktionsparameter für die Hybridisierung erfolgt dann die Funktionsanalyse des Microarrays. Dabei soll folgendermaßen vorgegangen werden: Durch PCR-Amplifikation werden markierte DNA-Fragmente der Zielregion generiert, die anschließend auf dem Microarray hybridisiert werden.

Diese Amplifikation erfolgt in einem ersten Schritt aus lysierten Reinkulturen der zu untersuchenden Stämme. Später folgt die Untersuchung von gemischten Kulturen. Nach erfolgreichem Abschluß dieser Schritte wird dann die direkte Isolierung von DNA aus Bodenproben zur PCR-Amplifikation durchgeführt.

Damit soll die Möglichkeit eines direkten Nachweises der Mikroorganismen ohne Kultivierungsschritt aus dem Boden untersucht werden. Dabei soll vor allem das Problem der ungenügenden Spezifität der Hybridisierungsergebnisse, daß bei allen bisherigen Studien auftrat, bearbeitet werden. Weiterhin soll versucht werden, eine direkte Detektion von DNA ohne PCR Amplifikation zu etablieren. Dazu sollen "capture-probe"-Oligonukleotide verwendet werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Chemikalien, Enzyme und Kits

2.1.1. Verwendete Enzyme und Kits

NucleoSpin[®] Extraction Kit (Clontech, Palo Alto, USA)

DNeasy Tissue Kit[®] (Qiagen, Valencia, USA)

Ultra Clean[®] Soil DNA Isolation Kit (MO BIO, Solana Beach, USA)

pGEM[®]-T-EASY (Invitrogen, Carlsbad, USA)

1kb Plus DNA Ladder (1µg/µl; 100-12.000bp) (Invitrogen, Karlsruhe)

Die nachfolgenden Enzyme wurden mit den empfohlenen Reaktionspuffern von Invitrogen, Karlsruhe bezogen:

*Bam*HI (10 U/µl), Puffer React 3[®]

*Eco*RI (10 U/µl), Puffer React 3[®]

*Pvu*II (10 U/µl), Puffer React 6[®]

Die folgenden Enzyme wurden mit den empfohlenen Reaktionspuffern von Amersham, Freiburg bezogen:

Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl), 10xPCR Reaction Puffer, 25mM MgCl₂ -Puffer

Die folgenden Enzyme wurden mit den empfohlenen Reaktionspuffern von Gibco, USA bezogen:

T4-DNA-Ligase, 5x Ligationspuffer

Die folgenden Enzyme wurden als Trockensubstanz von Fluka BioChemika, Berlin bezogen:
Lysozym (109000 U/mg), Proteinase K (500 U/mg)

Die folgenden Enzyme wurden mit den Reaktionspuffern von Qiagen, Valencia, USA bezogen:

Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl), 10xPCR Puffer, 25mM MgCl₂ -Puffer, Solution Q

2.1.2. Chemikalien, Materialien und Geräte

Amersham Pharmacia-Biotech, Freiburg

dNTPs

Becton-Dickinson and Company, Detroit, USA

Bacto[®]-Peptone, Yeast Extract

BioTech Trade & Service GmbH (bts), St. Leon-Rot

X-Gal

Clondia Chip Technologies, Jena

Poly-HRB-Streptavidin, AT[®] Reader Blockierungsreagenz, AT[®] Peroxidase-Substrat

Fluka BioChemika, Berlin

Calciumchlorid-Dihydrat ($\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$), N,N-Dimethylformamid (DMF),

β -D(+)-Glucose

Invitrogen, Karlsruhe

Agarose, DNA Typing Grade[®] 50x TAE Buffer

Koch-Light Laboratories Ltd, Colnbrook Bucks, GB

Triton-X-100

Merck, Darmstadt

Ammoniumsulfat ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), Bromphenolblau, Ethanol (96%), Ethidiumbromid (1%), Mangan(II)-chlorid (MnCl_2), Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), di-Natriumhydrogenphosphat-Heptahydrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Isopropanol, Natriumacetat (CH_3COONa), Kaliumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{K}_3\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$), Kaliumacetat (CH_3COOK)

Plano GmbH, Wetzlar

EM.STP/1, BBInternational, GB

Silver Enhancer Kit, BBInternational, GB

Roth, Karlsruhe

Ampicillin Natriumsalz, Dimethylsulfoxid (DMSO), Ethylendiamintetrasessigsäure (EDTA), Essigsäure, Ethanol, Glycerin (86% und 100%), IPTG, Bicine, Kaliumchlorid (KCl), Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$), Natriumchlorid (NaCl), Natriumhydroxid

(NaOH), Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, Salzsäure (HCl), SDS, TRIS, TRIS-Hydrochlorid, Kaliumchlorid (KCl), Ethylenglykol, PEG 1000, PEG 3350, Sorbitol

Sigma, Deisenhofen

Agar, Bromphenolblau, IGEPAL CA-630, Magnesiumchlorid (MgCl₂), β-Mercaptoethanol, MOPS, Xylen-Cyanol-FF

Geräte

Concentrator 5301 (Eppendorf, Hamburg)

Geldokumentationsanlage Gene Genius®, SynGene; Software: GeneSnap®
(Merck Eurolab, Darmstadt)

Horizontale Gelelektrophorese-Apparatur Power Pac 200 (Bio-Rad, München)

Inkubator Kelvitron® t (Heraeus Instruments, Hanau)

Laborzentrifuge 4K15C (Sigma, Taufkirchen)

PCR-Gerät: GeneAmp PCR-System 9700 (Perkin Elmer, Langen)

pH-Meter CG825 (Schütt Labortechnik, Göttingen)

Steril-Sicherheitswerkbank Microflow (Nunc, Wiesbaden)

Thermomixer compact 5436 (Eppendorf, Hamburg)

Tischzentrifuge 5415R (Eppendorf, Hamburg)

Ultraschall-Gerät UW2070 (Bandelin Electronic, Berlin)

UV-Flächenstrahler (Faust, Deutschland)

Inkubator Uno II (Biometra, USA).

AT®-Reader (Clondiag, Jena)

2.2. Verwendete Bakterienstämme

Die verwendeten Bakterienstämme und Plasmide sind in den Tab. 2 und Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 2: Verwendete Bakterienstämme

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Streptomyces fradiae</i>	ATCC 10745	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
(Waksman and Curtis 1916)	DSM 40063	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
	IMET 42051	Bacteriol., 80, 30, 225-420)

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Streptomyces alboniger</i> (Porter <i>et al.</i> 1952)	ATCC 12461 DSM 40043 IMET 43691	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces caelestis</i> (de Boer <i>et al.</i> 1955)	ATCC 14924 DSM 40084 IMET 43502	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Amycolatopsis orientalis</i> <i>subsp. orientalis</i> (Pittenger and Brigham 1956)	ATCC 19795 DSM 40040 IMET 7653	Int. J. Syst. Bacteriol. 36:35
<i>Streptomyces achromogenes</i> (Okami and Umezawa 1953)	ATCC 12767 DSM 40028 IMET 43080	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces antibioticus</i> (Waksman and Woodruff 1941)	ATCC 23879 DSM 40234 IMET 40227	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces coelicolor</i> (Müller 1908)	ATCC 10147 DSM 41007 IMET 40271	J. Gen. Microbiol. 72 , 49-58 , 1972
<i>Streptomyces parvulus</i> (corrig. Waksman and Gregory 1954)	ATCC 12434 DSM 40048 IMET 41380	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces</i> <i>viridochromogenes</i> (Krainsky 1914)	ATCC 3356 DSM 41027 IMET 40382	Int. J. Syst. Bacteriol. 30:405

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Streptomyces avermitilis</i>	ATCC 31272	U.S.Pat.4,412,991
Mutant strain from MA-4680.	IMET 43840	
	DSM 41443	
<i>Saccharopolyspora erythraea</i>	ATCC 11635	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
(Waksman 1923)	JCM 4026	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
	DSM40517	Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces albidoflavus</i>	DSM 46452	Int. J. Syst. Bacteriol. 30:369
(Rossi and Doria 1981)	IMET 40609	
<i>Streptomyces violaceoruber</i>	ATCC 14980	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
(Waksman and Curtis 1916)	DSM 40049	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
	IMET 40270	Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces cacaoi</i>	ATCC 19732	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
<i>subsp. cacaoi</i>	DSM 40057	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
(Waksman 1932)	IMET 40260	Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces violens</i>	ATCC 15898	Int. J. Syst. Bacteriol. 30:274
(Kalakoutskii and Krassilnikov	DSM 40597	
1960)	IMET 43407	
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	ATCC 27064	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
(Higgins and Kastner 1971)	DSM 40751	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
	IMET 43657	Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces violaceorectus</i>	ATCC 25514	SKERMAN McGOWAN and SNEATH
(Ryabova and	DSM 40279	(App.List of Bact. N., Int. J. Syst.
Preobrazhenskaya 1957)	IMET 43520	Bacteriol., 80, 30, 225-420)

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Streptomyces violascens</i> (Preobrazhenskaya and Sveshnikova 1957)	ATCC 23968 DSM 40183 IMET 42061	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces candidus</i> (Krasilnikov 1941)	ATCC19735 DSM 40141 IMET 40262	Int. J. Syst. Bacteriol., 1986, 36, 573-576.
<i>Streptomyces aureofaciens</i> (Duggar 1948)	ATCC 10762 DSM 40127 IMET 43577	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces cattleya</i>	IMET 43729 JCM 4925	(U.S. Pat. 4,247,640) U.S. Pats. 3,950,357;
<i>Streptomyces lincolnensis</i> (Mason <i>et al.</i> 1963)	ATCC 25466 DSM 40355 JCM 4287	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Saccharothrix mutabilis subsp.</i> <i>capreolus</i> (Grund and Kroppenstedt 1990)	ATCC 23892 DSM 40225	Int. J. Syst. Bacteriol. 40 320-321, 1990
<i>Streptomyces mobaraensis</i> (Nagatsu and Suzuki 1963)	ATCC 15003 DSM 41492 JCM 4924	Int. J. Syst. Bacteriol. 41 456-457, 1991
<i>Streptomyces cyanogenus</i>	ATCC 19836 DSM 40426	Int. J. Syst. Bacteriol. 41 456-457 ,1991
<i>Streptomyces celluloflavus</i> (Nishimura <i>et al.</i> 1953)	ATCC 29806 DSM 40839	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Streptomyces caelestis</i> (de Boer <i>et al.</i> 1955)	ATCC 14924 DSM 40084 IMET 43502	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces nodosus</i> (Trejo 1961)	ATCC 14899 DSM 40109 JCM 4297	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Streptomyces noursei</i> (Brown <i>et al.</i> 1953)	ATCC 11455 DSM 40636 JCM 4922	SKERMAN McGOWAN and SNEATH (App.List of Bact. N., Int. J. Syst. Bacteriol., 80, 30, 225-420)
<i>Kitasatospora phosalacinea</i> (Takahashi <i>et al.</i> 1985)	DSM 43860 JCM 3340	Takahashi, Y., Iwai, Y., Omura, S. J. Gen. Appl. Microbiol 30 377-387 1984
<i>Kitasatospora cochleata</i> (Nakagaito <i>et al.</i> 199) Zhang <i>et al.</i> 1997)	ATCC 51235 DSM 41652 JCM 8799	Nakagaito, Y., Yokota, A., Hasegawa, T. S J. Gen. Appl. Microbiol. 38 105-120
<i>Kitasatospora cystarginea</i> (Kusakabe and Isono 1992)	ATCC 49931 DSM 41680 JCM 7356	IJSB. List No. 46. Int. J. Syst. Bacteriol. 43 1993
<i>Kitasatospora azatica</i> , (Nakagaito <i>et al.</i> 199, Zhang <i>et</i> <i>al.</i> 1997)	ATCC 51237 DSM 41650 IFO 13803	Hata, T. <i>et al.</i> J. Antibiot. (Tokyo) Ser. A 26 181 1973
<i>Kitasatospora mediocidica</i> (Labeda 1988)	ATCC 49055 DSM 43929	Labeda, D. P. Int. J. Syst. Bacteriol. 38 287-290 1988
<i>Kitasatospora paracochleata</i> (Nakagaito <i>et al.</i> 1993, Zhang <i>et al.</i> 1997)	ATCC 51236, DSM 41656	Nakagaito, Y., Yokota, A., Hasegawa, T J. Gen. Appl. Microbiol 38 105-120 1992

Nomenklatur	Nummer	Referenz
<i>Kitasatospora griseola</i> (Takahashi <i>et al.</i> 1985)	DSM 43859 JCM 3339	Takahashi, Y., Iwai, Y., Omura, S. J. Gen. Appl. Microbiol 30 377-387 1984
<i>Kitasatospora kifunensis</i> (Nakagaito <i>et al.</i> 1993; Groth <i>et al.</i> 2003)	ATCC 51379 DSM 41654	Nakagaito, Y., Shimazu, A., J. Gen. Appl. Microbiol 38 627-633 1992
" <i>Kitasatospora melanogena</i> "	JCM 3337	Zhang,Z., Wang,Y. and Ruan,J. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (4), 1048-1054 ,1997
" <i>Kitasatospora streptosporus</i> "	IFO 14362	Zhang,Z., Wang,Y. and Ruan,J. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (4), 1048-1054 ,1997
<i>Kitasatospora cineracea</i>	DSM 44780 IFO 16452 JCM 10915	Tajima, K., Takahashi, Y., Seino, A., Iwai, Y., Omura, S.
" <i>Kitasatospora brunnea</i> "	IFO 14627	Zhang,Z., Wang,Y. and Ruan, J. Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (4), 1048-1054 ,1997
" <i>Kitasatospora gansuanensis</i> "	DSM 44786 HKI 0314	
<i>Kitasatospora</i> strain "HKI 2193-12"	Brasilianische Bodenprobe	
<i>Kitasatospora</i> strain "HKI 2122-22"	Bodenprobe	
<i>Kitasatospora setae</i> (Omura <i>et al.</i> 1983)	ATCC 33774, DSM 43861 JCM 3304,	Omura, S., Takahashi, Y., Iwai, Y., Tanaka, H. J. Antibiot. (Tokyo) 35 1013-1019 1982
<i>Kitasatospora putterlickiae</i> (Groth <i>et al.</i> 2003)	DSM 44665 Uni Bonn 18	Groth, I et al., M. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53, 2033-2040, 2003

Tab. 3: verwendete Plasmide

Plasmid	Größe [kb]	Herkunft/Referenz
pBluescript II SK+/-	3,0	Stratagene, San Diego, USA
pGEM®-T-EASY	3,1	Promega, Madison, USA

2.3. Zellanzucht

2.3.1. Nährmedien

Alle Lösungen und Medien wurden, falls nicht anders angegeben, durch 20 minütiges autoklavieren sterilisiert. Zur Herstellung von festen Nährböden wurde den Medien 1,5 % (m/v) Agar zugesetzt.

2.3.2. Zellanzucht der untersuchten Actinomyceten

Die Anzucht der zu untersuchenden Actinomyceten Stämme erfolgte bei 28°C über 2-3 Tage in flüssigem organischem "Medium 79" (pH 7,5) nach Prauser (s.Tab. 5) [88].

Tab. 4: LB Medium

Substanz	Masse [g]
Bacto Trypton	10
Hefeextrakt	5
NaCl	5
A. bidest	ad 1000

Tab. 5: Organisches "Medium 79"

Substanz	Masse [g]
Dextrose	10,0
Bacto-Pepton	10,0
Casein-Hydrolysat	2,0
Hefe Extrakt	2,0
NaCl	6,0
Agar	15,0
A. bidest	ad 1000

2.3.3. Zellanzucht der *E. coli*-Stämme

Alle *E. coli*-Stämme wurden aerob, bei 37°C schwenkend, in Flüssigkulturen in Reagenzgläsern oder Erlenmeyerkolben angezogen deren Volumina dem zehnfachen des Kulturvolumens entsprachen. Alle plasmidhaltigen Stämme wurden dabei stets durch Zugabe eines geeigneten Antibiotikums unter Selektionsdruck gehalten. Hauptkulturen wurden 2-3%-ig (v/v) mit einer Vorkultur angeimpft. Die Kultivierung auf festen Medien erfolgte beim Wachstum auf LBA-Platten bei 37°C über Nacht im Brutschrank (Heraeus Instruments, Hanau).

2.3.3.4. LB-Medium

Zur Kultivierung von *E. coli*-Stämmen wurde standardmäßig ein Luria-Bertani (LB) Medium [89] mit einer Zusammensetzung wie in Tab. 4 verwendet. Zur Bereitung von Agarplatten wurden dem Medium vor dem Autoklavieren pro 1 l Medium 15 g Agar zugegeben. Nach dem Autoklavieren läßt man das heiße Medium auf 50°C abkühlen. Falls die Agarplatten Antibiotika (s.Tab. 6) enthalten sollten, wurden diese nun zugegeben, und die Platten wurden mit einer Schichtdicke von ungefähr 5 mm zügig unter einer LAF-Box (Microflow, Nunc) gegossen. Zum Gelieren wurden die Platten bei RT gelagert. Wurden die Platten nicht sofort weiterverwendet, erfolgt die Lagerung bei 4°C im Kühlschrank.

2.3.3.5. Antibiotika und andere Medienzusätze

Sofern im Text nicht anders beschrieben, wurden Stammlösungen angesetzt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert. Die Lösungen wurden den autoklavierten Nährmedien nach deren Abkühlung auf circa 50°C in entsprechender Menge zugegeben (s. Tab. 6).

Tab. 6: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika und anderer Medienzusätze

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [μ g/ml]
Ampicillin	A. bidest	100	100
IPTG	A. bidest.	200	200
X-Gal	DMF	20	2

2.3.4. Stammhaltung der rekombinanten *E. coli*-Stämme

Für eine Konservierung der Stämme wurde eine Stammsammlung angelegt, die bei -80°C aufbewahrt wurde. Eine Reinkultur wurde über Nacht in LBA-Medium angezogen, 900 μ l entnommen und mit der gleichen Menge an 100%-igen Glycerin versetzt. Dieser Ansatz wurde in Kryoröhrchen (Nalgene, USA) sofort bei -80°C eingefroren.

2.4. Standardtechniken für das Arbeiten mit DNA

2.4.1. Behandlung von Geräten und Lösungen für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Zur Inaktivierung von Nukleasen wurden alle hitzestabilen Gefäße und Lösungen autoklaviert. Nicht autoklavierbares Gerät wurde mit 70 %-igen (v/v) Ethanol behandelt und falls möglich abgeflammt. Hitzelabile Lösungen wurden sterilfiltriert.

2.4.2. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion

Zur Extraktion von Proteinen wurden die DNA-Lösungen 1:1 mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1 (v/v/v)) versetzt und kräftig gemischt. Zur besseren Phasentrennung wurden die Proben 10 min in einer Kühlzentrifuge (5415 R, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert (13.000 rpm, 4°C) und die wäßrige, DNA-haltige Oberphase vorsichtig abgehoben. Anschließend erfolgte eine Fällung der DNA in der oberen Phase mit 100% Isopropanol.

2.4.3. Fällung von DNA mit Isopropanol oder Ethanol

Die DNA-Lösungen wurden mit 1/6 ihres Volumens mit 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und dem 2,5xVol. an kaltem (-20°C) unvergälltem Ethanol (96 % (v/v)) oder dem 0,7xVol. Isopropanol versetzt. Nach Durchmischung und Lagerung bei RT für 10 min konnte die DNA durch Zentrifugation (13.000 rpm, 4°C, 10 min) pelletiert werden.

Das Pellet wurde einmal mit eiskaltem, unvergälltem, 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und dann in der Vakuumzentrifuge (Concentrator 5301, Eppendorf, Hamburg) für 5-10 min getrocknet. Die so gewonnene DNA wurde in 50 µl A. bidest resuspendiert.

2.4.4. Agarosegelelektrophorese

Das Gel wurde aus einer Suspension von 0,9 g Agarose und 90 ml TAE-Puffer (s.Tab. 7) angesetzt. Diese Suspension wurde erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf ca. 50°C wurden zum Färben der DNA 2,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt und sofort kräftig gemischt.

Die Agarosegelkammer (BioRad, München) wurde zuvor nach Vorschrift zusammgebaut. Die abgekühlte Lösung wurde in die Kammer gegossen und der gewünschte Kamm in das Gel eingelassen. Danach erfolgt das Gelieren bei RT. Das fertige Gel wurde mitsamt der Kammer in die Laufvorrichtung gelegt und diese mit 1xTAE-Puffer (s. Tab. 7) befüllt. Der Kamm wurde vorsichtig herausgezogen.

Die DNA-Proben wurden mit 1/6 ihres Vol. mit DNA-Laufpuffer (s. Tab. 8) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Nach Anschluss der Gelkammern an des Netzgerät (Power Pac, BioRad, München) wurde die DNA im Gel mit 50–100 mA aufgetrennt und anschließend auf einer UV-Dokumentationsanlage (Gene Genius®, Syngene, USA) mit einer Wellenlänge von 280 nm bestrahlt.

Die durch das Ethidiumbromid markierte DNA konnte mit Hilfe des Programms Genesnap® (Syngene, USA) ausgewertet werden. Die Größenauswertung der DNA-Fragmente erfolgte durch eine mitgeführte DNA-Leiter (1kb plus-Ladder, Invitrogen, Karlsruhe).

Tab. 7: 1 x TAE-Puffer

Substanz	Konzentration
TRIS	40 mM
Essigsäure	bis pH 8,0
EDTA	1 mM
A. bidest	ad 1000 ml

Tab. 8: DNA-Ladepuffer

Substanz	Konzentration
Bromphenolblau	0,25 %
Xylen-Cyanol FF	0,25 %
Glycerin	30,00 %
A. bidest	69,50%

2.5. Isolierung von DNA

2.5.1. Präparation von DNA aus *Streptomyces* Reinkulturen

Zur Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region von verschiedenen Streptomycetenspezies wurden die *Streptomyces* Stämme wie in Kap. 2.3.2. beschrieben kultiviert. Die Schüttelkulturen wurden in Falcon-Reaktionsgefäße abzentrifugiert (3.000 rpm, 3 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die so erhaltenen Pellets wurden bei -20°C eingefroren oder sofort weiterverwendet.

Zur Lyse der Zellen wurden circa 20 µl der Bakterienzellmasse in 100 µl des frisch hergestellten Lysepuffers (s. Tab. 9) suspendiert. Die Arbeiten erfolgten innerhalb einer LAF-Box. Die Zugabe der Proteinase K zu dem Puffer erfolgte erst nach Behandlung (Intervall 6x30 sec; 30 sec Pause) der Proben mit einem Ultraschallgerät (Sonopuls, Bandelin, Berlin) zur Lyse der Bakterienzellen.

Anschließend wurden die Proben 1 h bei 37°C inkubiert und zur Inaktivierung der Proteinase K 10 min auf 80°C erhitzt. Die so gewonnenen Proben wurden einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterzogen. Eine Isolierung der DNA mit dem DNeasy Tissue Kit® (Qiagen, USA) wurde nicht durchgeführt, da bei den Streptomyceten keine vollständige Lyse erreicht werden konnte.

Tab. 9: Lysepuffer für Streptomyceten

Substanz	Volumen [µl]
1 M TRIS-HCl pH 8,8	134,0
1 M ((NH ₄) ₂ SO ₄)	33,2
Mercaptoethanol	10,0
1 M MgCl ₂	0,7
0,5 M EDTA	26,8
20% SDS	5,0
Proteinase K (200 mg/ml)	10,0
A. bidest	Ad 2000,0

2.5.2. Präparation von DNA aus *Kitasatospora* Reinkulturen

Die Isolierung der DNA wurde mit dem DNeasy Tissue Kit® (Qiagen, USA) durchgeführt. Von den tiefgekühlten bzw. frischen Kulturen der verschiedenen *Kitasatospora*-Stämme wurden circa 20 µl Zellmasse entnommen, und mit 180 µl DNeasy Tissue Kit® Lysepuffer (Zss.: s. Tab. 10) versetzt. Nach kräftigem Durchmischen erfolgte eine Inkubation im Wärmeschrank (37°C, 50 min).

Anschließend wurden 25 µl Proteinase K (DNeasy Tissue Kit®) zugegeben, gemischt und im Anschluss mit 200 µl AL-Puffer (DNeasy Tissue Kit®) versetzt und erneut durchgemischt. Es folgte wiederum eine Inkubation im Wärmeschrank (70°C, 60 min). Am Ende der Inkubationszeit wurde 200 µl 100% Ethanol zugegeben und erneut gemischt. Die weitere Behandlung erfolgte in den mitgelieferten Zentrifugensäulen des DNeasy Tissue Kit®. Dazu wurde der gesamte Ansatz in die Säule überführt und 1 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und die Säulen mit der an der Säulenmembran anhaftenden DNA weiterverwendet.

Zum Waschen wurden die Säulen erstens mit 500 µl AW 1-Puffer (DNeasy Tissue Kit®) befüllt und 1 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert und zweitens mit 500 µl AW 2-Puffer (DNeasy Tissue Kit®) befüllt und 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluß wurde jeweils verworfen. Um die so gewaschene DNA von den Säulen zu eluieren wurde 5 min bei RT mit 100 µl AE-Puffer (DNeasy Tissue Kit®) inkubiert und anschließend 2 min bei 8.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluß enthielt die DNA der jeweiligen Proben und wurde zur Weiterverarbeitung tiefgefroren (-20°C).

Tab. 10: Lysepuffer für *Kitasatospora*-Kulturen

Substanz	Volumen [μ l]
20 mM TRIS, 2 mM EDTA-Puffer	141,8
Triton X 100	2,2
Lysozym (10 mg/ml)	36,0
A. bidest	180,0

2.5.3. Plasmid Maxipräparation des Vektors Bluescript SK II (+)

Die zur Durchführung der Maxipräparation nötigen Lösungen sind in Tab. 11 zusammengefaßt. Eine Übernachtskultur (circa 200 ml) des Stammes *E. coli* Bluescript SK II (+) wurde am Vortag mit LBA-Medium angelegt und 24 h bei 37,0°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurden 4x50 ml in vier Falcon-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in jeweils 2,5 ml Lösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert.

Nach Zugabe von jeweils 5 ml Lösung II wurde vorsichtig geschwenkt und erneut 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von je 3,75 ml Lösung III und kräftigem Schütteln wurden die Falcon-Reaktionsgefäße 10 min auf Eis gelagert. Anschließend wurde 15 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Falcon-Reaktionsgefäße überführt und nach Zugabe von 0,6 Volumenteilen (7 ml) Isopropanol und kräftigem Schütteln 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 10 min bei 5.000 rpm abzentrifugiert. Der so gewonnene Niederschlag wurde mit je 650 μ l Ethanol 70% (v/v) gewaschen und 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Trocknen in der Trocknungszentrifuge wurden die Pellets in je 50 μ l A. bidest aufgenommen, die vier Plasmidlösungen vereinigt, aliquotiert und bei -20°C eingefroren. Zur Kontrolle der Maxipräparation wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 1 μ l Isolat der Maxipräparation auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese wie im Kap. 2.3.4 dieser Arbeit beschrieben durchgeführt.

Tab. 11: Lösungen I-III

Lösung I	0,9 g Glukose, 2,5 ml 1M Tris/HCL, 2 ml 0,5M EDTA, A. bidest ad 100 ml
Lösung II	8,5 ml A. bidest, 0,5 ml 20% SDS, 1 ml 2N NaOH.
Lösung III	60 ml 5M KOAc, 11,5 ml HOAc(100%), 28,5 ml A. bidest

2.5.4. Minipräparation von Plasmiden aus *E. coli* (Stamm: Top10) [90]

Eine Übernachtskultur (1,5 ml, LBA-Medium) der am Vortag von LBA-Platten gepickten transformierten Stämme (s. Kap. 2.7) wurde 24 h bei 37°C geschüttelt und anschließend abentrifugiert (4 min, 4.000 rpm).

Nach Abgießen des Überstandes wurden 100 µl LYR-Puffer (Tab. 12) zugefügt und mit der Pipette durchmischt. Anschließend wurde 10 min bei RT inkubiert und nach der Inkubationszeit und Zugabe von 200 µl frisch hergestelltem NaOH/SDS-Puffer vorsichtig durch Schwenken gemischt und 5 min bei RT inkubiert.

Tab. 12: LYR-Puffer

Substanz	Vol. [ml]
50mM Glucoselösung	0,1
10mM EDTA (pH 8,0)	0,1
25mM Tris-HCL (pH 8,0)	0,125
Lysozym (2 mg/ 100 µl)	0,5
RNAse (2 mg/100 µl)	0,5
A. bidest	ad 10,0

Tab. 13: NaOH/SDS-Puffer

Substanz	Volumen [ml]
2N NaOH	0,8
20% SDS-Lösung	0,4
A. bidest	6,4

Tab. 14: KoAc/HoAc-Puffer

Substanz	Volumen [ml]
5M Kaliumacetat	60,0 ml
Essigsäure	11,5 ml
A. bidest	ad 100 ml

Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl KoAc/HoAc-Puffer (s. Tab. 14) und nach dem durchmischen wurde 30 min bei RT inkubiert. Das Abzentrifugieren des Niederschlags erfolgte bei 13.000 rpm für 15 min bei 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und mit einem Volumenteil Isopropanol (400 µl) versetzt. Nach kräftigem Mischen wurde 10 min bei RT inkubiert.

Danach wurde abzentrifugiert bei 13.000 rpm für 15 min und 4°C. Der Niederschlag wurde mit 50 µl Ethanol 70% (v/v) gewaschen und 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Nach Trocknen in der Trocknungszentrifuge (Eppendorf, Hamburg) wurden die Pellets in 50 µl A. bidest aufgenommen.

2.5.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte durch Elektrophorese (100 mA, 1 h) in 1%-igem Agarosegel, wobei der gesamte Ansatz des Restriktionsverdau auf das Gel aufgetragen wurde (s. Kap. 2.3.4.).

Nach der elektrophoretischen Trennung wurden die Banden des geschnittenen Vektors auf einem UV-Flächenstrahler (Faust, Deutschland) mit einem Skalpell aus dem Gel sauber herausgetrennt und die im Gel vorhandenen Plasmide mit einem DNA-Säulenextraktionskit (NucleoSpin® Extraction Kit, Clontech, USA) isoliert. Nach Bestimmung der Gelmassen wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorfgefäßen mit dem mitgelieferten NT 1-Puffer versetzt. Dabei wurde pro 100 mg Gelprobe 300 µl Puffer verwendet. Die Proben wurden für 10 min bei 50°C inkubiert, dabei wurde alle 2-3 min kräftig gemischt um sicherzustellen, daß sich das Gel vollständig aufgelöst hat.

Anschließend wurden die Proben in Zentrifugensäulen (Nucleo-Spincup®) pipettiert und in Eppendorfgefäßen abzentrifugiert (13.000 rpm, 1 min). Der Durchfluß wurde verworfen und die Säulen mit den der Säulenmembran anhaftenden Plasmiden weiterverwendet. Zum Waschen wurden die Säulen zweimal mit dem mitgelieferten NT 3-Puffer (700 µl) befüllt und 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Der Durchfluß wurde jeweils verworfen. Um die Säulen von anhaftender Flüssigkeit zu befreien, wurde erneut 3 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Um die so gewaschenen Plasmide von der Säulenmembran zu eluieren, wurde 5 min bei RT mit 50 µl NE-Puffer (Clontech Kit) inkubiert und anschließend 2 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert.

Der Durchfluß enthielt die Plasmide der jeweiligen Proben und wurde zur Weiterverarbeitung tiefgefroren (-20°C). Zur Kontrolle der Reinigung des Verdau wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde 10 µl Isolat der Säulenextraktion (s.o.) auf ein 1%-iges Agarosegel aufgetragen und die Elektrophorese wie in Kap. 2.3.4. beschrieben durchgeführt.

2.5.6. Isolierung von DNA aus Bodenproben mit Hilfe des Ultra Clean® Soil DNA

Isolation Kits

Um DNA von *Kitasatospora*-Spezies aus Bodenproben zu isolieren wurde ein DNA-Isolierungskit verwendet (Ultra Clean® Soil DNA Isolation Kit, Mobio Laboratories, Inc, USA). Dabei wurde ein Protokoll für maximale Ausbeuten gewählt, da unbekannte Konzentrationen von DNA in den Bodenproben vorlagen. Dazu wurden 250 mg der getrockneten Bodenproben eingewogen und vollständig in die mitgelieferten Reaktionsgefäße überführt die 2 ml einer Bead-Lösung enthielten.

Die Mischung wurde vorsichtig gemischt, und mit 60 µl der bereitgestellten S 1-Lösung versetzt und erneut kurz gemischt. Um die Lösung von Inhibitoren der PCR-Amplifikation (z.B. Huminsäuren) zu befreien, wurden 200 µl der bereitgestellten IRS-Lösung ("Inhibitor Removal Solution") zugegeben und die Reaktionsgefäße horizontal mit Klebeband auf einem Vortex-Schüttler fixiert und für 10 min bei maximaler Geschwindigkeit gemischt. Um bestmögliche Scherung der Proben zu gewährleisten, wurde die Lage der fixierten Reaktionsgefäße alle 2 min um einen Winkel von 90° geändert.

Um den Überstand und die festen Bestandteile (Beads, Bodenreste) in den Reaktionsgefäße zu trennen, wurde dann für 30 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 R, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl der mitgelieferten S 2-Lösung wurde für 5 sec durchmischt und anschließend für 5 min bei 4°C inkubiert.

Nach dem Abzentrifugieren der Reaktionsgefäße (1 min, 10.000 rpm) wurde der gesamte Überstand erneut in ein Eppendorf-Tube überführt, 1,3 ml S 3-Lösung zugefügt und 5 sec durchmischt. Die gesamte Lösung wurde in Teilschritten zu je 700 µl in die mitgelieferten Zentrifugen-filtrerröhrchen überführt.

Dort wurde die Lösung durch Zentrifugation (1 min, 10.000 rpm) durch den integrierten Filter gedrückt. Der Durchfluß wurde jeweils verworfen. Zur Reinigung der isolierten DNA, die sich adsorbiert am Filter befand, wurden 300 µl der mitgelieferten S 4-Lösung auf den Filter gegeben und abzentrifugiert (30 sec, 10.000 rpm). Anschließend wurde noch einmal zentrifugiert, (1 min 10.000 rpm) um eventuelle Flüssigkeitsreste im Filter zu entfernen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, um eventuell vorhandene Inhibitoren komplett zu entfernen. Der Filter des Zentrifugenfiltrerröhrchens wurde in ein neues sauberes Eppendorfgefäß überführt, wobei darauf geachtet wurde, daß keine Reste der S 4-Lösung (Kit) anhafteten.

Zum Lösen der an dem Filter anhaftenden DNA wurden 50 µl S 5-Lösung (Kit) direkt auf die Mitte der Filtermembran pipettiert und dort für 2 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde abzentrifugiert (1 min, 10.000 rpm) und die so gewonnene DNA sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren.

2.6. Enzymatische Modifikationen von DNA

2.6.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA durch Endonukleasen

2.6.1.1. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA (pBluescript SK II(+)) mit *PvuII*

Ein Teil der bei der Minipräparation (s. Kap. 2.4.2.) gewonnenen Plasmidlösung wurde anschließend einem Restriktionsverdau (s. Tab. 15) unterworfen. Der Verdau wurde 2 h bei

37°C durchgeführt (Inkubator: Uno II, Biometra, USA). Die Restriktionsendonuklease *PvuII* schneidet den Vektor (pBluescript SK II (+); ca. 3.000 bp) jeweils vor und nach der Multiplen Klonierungsstelle (MCS). Dabei ergibt sich ein DNA-Bruchstück von 2.500 bp, welches den Restvektor darstellt, und ein Bruchstück von 500 bp, welches die herausgeschnittene MCS beinhaltet. Wenn die Klonierung der gesuchten Gensequenz erfolgreich war, verlängert sich das kleinere Bruchstück um die Zahl der in die MCS klonierten Basenpaare auf ca. 800 bp (ITS-Region ca. 300 bp). Es erfolgte eine Überprüfung des Verdau mittels Gelelektrophorese in 1%-igen Agarosegel unter den Bedingungen wie in Kap. 2.3.4. beschrieben. Dazu wurde der komplette Ansatz aus dem Verdau auf das Gel aufgetragen.

Tab. 15: Restriktionsverdau mit *PvuII*

Substanz	Volumen [µl]
<i>PvuII</i>	1,5
Puffer React 6®	2,0
Plasmidlösung	ad 20,0

2.6.1.2. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA (pBluescript SK II(+)) mit *EcoRI/BamHI*

Zeigte die Überprüfung der Maxipräparation des Vektorplasmids (s. Kap. 2.4.3) mittels Gelelektrophorese ein positives Ergebnis, wurde der Vektor pBluescript SK II (+) anschließend an der Multiplen Klonierungsstelle an zwei Stellen mit Restriktionsenzymen geschnitten, um dort eine spätere Klonierung zu ermöglichen. Dazu wurde eine Verdünnung (1/10, v/v) der Maxipräparationslösung verwendet und mit *BamHI* sowie *EcoRI* über 4 h bei einer Temperatur von 37°C im Inkubator verdaut (s. Tab. 16).

Tab. 16: Restriktionsverdau mit *EcoRI/BamHI*

(pBluescript SK II (+))

Substanz	Volumen [µl]
Vektor pBluescript SK II (+) Verd.1/10	1
<i>EcoRI</i>	3
<i>BamHI</i>	3
Puffer React 3®	6
A. bidest	47

2.6.1.3. Restriktionsverdau von PCR-Fragmenten mit *EcoRI/BamHI*

Zeigte die Überprüfung der DNA-Amplifizierung (s. Kap. 2.6.) mittels Gelelektrophorese ein positives Ergebnis, wurden die PCR-Fragmente an den über die modifizierten Primer (s. Kap. 2.6.) eingeführten Endonukleaseschnittstellen mit den Restriktionsenzymen *BamHI* und *EcoRI* geschnitten um dort eine spätere Klonierung zu ermöglichen. Dazu wurden 40 µl des PCR-Ansatzes mit *BamHI* sowie *EcoRI* über 4 h bei einer Temperatur von 37°C im Inkubator verdaut (Zss. Tab. 17).

Tab. 17: Restriktionverdau mit *EcoRI/BamHI*

(PCR-Fragmente)

Substanz	Volumen [µl]
PCR-Ansatz	40
<i>EcoRI</i>	3
<i>BamHI</i>	3
Puffer React 3®	6
A. bidest	6

2.6.1.4. Restriktionsverdau von Plasmid-DNA (pGEM®-T- EASY)

mit *EcoRI*

Ein Teil der Transformationen von kompetenten Zellen wurde mit dem pGEM®-T-EASY Vektor-System (Promega, USA) durchgeführt. Die Plasmid-Minipräparationen aus diesen Transformationen wurden einem Restriktionsverdau mit der Restriktionsendonuklease *EcoRI* unterworfen (s. Tab. 18) Der Verdau wurde 2 h bei 37°C durchgeführt.

EcoRI schneidet den Vektor pGEM®-T- EASY (ca. 3.000 bp) zweimal innerhalb der MCS, jeweils circa 50 bp von der Klonierungstelle entfernt. Dabei ergibt sich ein DNA-Bruchstück von 2.900 bp, welches den Restvektor darstellt und ein Bruchstück von 100 bp aus der MCS. Wenn die Klonierung der gesuchten Gensequenz erfolgreich war, verlängert sich das kleinere Bruchstück um die Zahl der in die MCS klonierten Basenpaare auf circa 400-500 bp. Es erfolgte eine Überprüfung des Verdaus mittels Gelelektrophorese in 2%-igem Agarosegel unter den Bedingungen wie in Kap. 2.3.4. beschrieben.

Tab. 18: Restriktionsverdau mit *EcoRI***(pGEM®-T- EASY)**

Substanz	Volumen [µl]
<i>EcoRI</i>	1,5
Puffer React 3®	2,0
Plasmidlösung	ad 20,0

2.6.2. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei einer Ligation wird eine Phosphodiesterbindung zwischen DNA-Fragmenten gebildet, die mindestens ein freies 3'-Hydroxyende und 5'-Phosphatende besitzen. Das Verhältnis von Insert-DNA zu Vektor-DNA lag bei den verwendeten Vektorsystemen [(pBluescript SK II (+) sowie pGEM®-T-EASY bei etwa 10:1 (s. Tab. 19). Bei Verwendung des pBluescript SK II (+)-Vektors entstanden durch den vorherigen Restriktionsverdau der PCR-Fragmente sowie des Vektors (s. Kap. 2.5.1.2) DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden, die bei 16°C über Nacht ligiert wurden.

Vor der Ligation wurden die Restriktionsenzyme in den Vektor-DNA-haltigen Lösungen durch eine Hitzebehandlung (10 min, 70°C) inaktiviert. Bei Verwendung des pBluescript SK II (+) Vektors wurden die verdauten PCR-Fragmente (20 µl) mit 1/5xVol. eines fünffach konzentrierten ATP-haltigen Ligationspuffers (Gibco, USA), mit 3 µl Vektorlösung sowie mit 1 µl (1 U) *T4*-DNA-Ligase (Gibco, USA) versetzt (s. Tab. 19) Bei Verwendung des pGEM®-T-EASY-Vektor Systems erfolgte die Ligation über den Zeitraum von 1 h bei RT unter Verwendung von *T4*-DNA-Rapid Ligase (Promega, USA).

Eine Inaktivierung von Restriktionsenzymen war hier nicht nötig, da der Vektor bereits geschnitten vorliegt, und die Ligation an T-Überhängen des Vektors erfolgt, die eine Hybridisierung mit den A-Überhängen, welche bei Verwendung von *Taq*-Polymerase bei der Amplifikation an den PCR-Fragmenten entstehen, ermöglichen.

Beide Ligationsansätze konnten ohne weitere Behandlung zur Transformation in kompetente Zellen eingesetzt werden. Bei beiden Ligationen erfolgte eine Überprüfung der Transformation mit Positiv-Kontrolle und Background.

Tab. 19: Ligationsansatz pGEM®-T-EASY System

Substanz	Vol. Ansatz [µl]	Vol. Kontrolle [µl]	Vol. Background [µl]
2xRapid Ligation Puffer	5	5	5
pGEM®-T-EASY-Vektor	1	1	1
PCR-Produkt	3	-	-
Kontroll-DNA	-	1	
A. bidest	-	1	3
T4-Ligase	1	1	1

2.7. Amplifikation von DNA mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR)

2.7.1. Allgemeine PCR-Vorgehensweise

Bei der PCR wird ein DNA-Molekül (Template) *in vitro* amplifiziert. Falls erforderlich werden die zu amplifizierenden DNA-Bereiche mit neuen Restriktionsschnittstellen versehen, weshalb die Primer entsprechend der neuen Schnittsequenzen Fehlpaarungen zum DNA-Matrizenstrang aufweisen. Die verwendeten Primer (JenaBioscience, Jena) mit ihren Modifikationen sind in Tab. 20 aufgeführt. Der zwischen den beiden Primern liegende DNA-Bereich wurde über folgendes, mehrfach zu durchlaufendes Zyklenschema amplifiziert:

1. Thermische Denaturierung der DNA
2. Hybridisierung der Oligonukleotid-Primer an die Zielsequenz bei optimaler Bindungstemperatur
3. Primerverlängerung durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase

Die Annealing-Temperatur ist abhängig von der Länge und Zusammensetzung der Oligonukleotid-Primer. Je G+C-reicher die Primer sind, umso höher liegt die Hybridisierungstemperatur. Dabei gilt die Näherung: $TD (^{\circ}C) = (2 \times [A+T] + 4 \times [C+G])$
A, T, C und G stellen die Anzahl der jeweiligen Basen dar. Zur Durchführung der PCR-Läufe wurden programmierbare Thermoblöcke (GeneAmp-PCR-System 9700, PE Applied Biosciences, USA) verwendet. Für die PCR wurden verschiedene *Taq*-Polymerasen verwendet (Amersham Biosciences/Qiagen, s. Kap. 2.1.).

Tab. 20: verwendete Primer

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Konz. [pmol/μl]	Lit.	Modifikation
SGK I	GGTTGGATCCACCTCCTT	100	[20]	-
SGK I 5 'b	GGTTGGATCCACCTCCTT	100	[20]	5'-Biotinylierung
SGK II 5 'b	TGCCAAGGCATCCAC	100	[20]	5'-Biotinylierung
SGS I	CCGGGATCCGGTTGGATCCA CCTCCTT	100	[20]	<i>Bam</i> HI-Schnittstelle
SGS II	AAGGAATTC TGCCAAGGCAT CCAC	100	[20]	<i>Eco</i> RI-Schnittstelle
SGS I large	CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT	100	-	-
SGS I 5'bio large	CAGCTCGTGTCTGTGAGATGT	100	-	5'-Biotinylierung

Da die Reaktionsbedingungen stark von der verwendeten Polymerase, dem Primerpaar und der Template-DNA abhängen, sind sie in den folgenden Absätzen aufgeführt. Die Reinigung des PCR-Amplifikats von Primern, Polymerase und Nebenprodukten erfolgte durch Fällung der DNA mit der oben beschriebenen Methode (s. Kap. 2.3.3.). Anschließend erfolgte eine Kontrolle der Amplifizierung mittels Gelelektrophorese.

2.7.2. Amplifikation der 16S-23S rDNA von *Streptomyces* und *Kitasatospora* zur Klonierung

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR wurde im obigen Absatz beschrieben. Für die Amplifikation von PCR-Fragmenten der 16S-23S rDNA-Region (ITS) von Actinomyceten, die später in Vektoren kloniert werden sollten, wurden die folgenden Reaktionsparameter gewählt. Die gewählten Primer stellen Sequenzen dar, welche die gesuchte intergenetische Spacer-Sequenz zwischen 16S (SGS I) und 23S (SGS II) rDNA flankieren (s. Abb. 5). Gleichzeitig besitzen die Primer die Schnittstellen für *Eco*RI bzw. *Bam*HI, was eine spätere Klonierung in den Vektor (pBluescript SK II (+)) ermöglicht (s. Kap. 2.5.2.). Die Primer wurden auch für Klonierungen in den Vektor pGEM®-T-EASY verwendet, der zwar keine Schnittstellen benötigt (s. Kap. 2.5.2.), diese jedoch auch keinen negativen Einfluss auf die folgende Ligation haben.

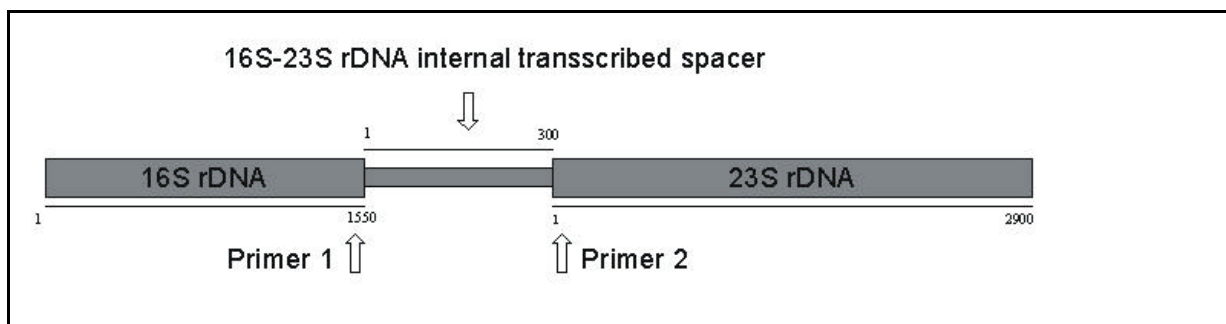


Abb. 5: 16S-23S rDNA-Operon (Primer 1: SGS I, Primer 2: SGS II)

Einstellung Thermocycler:	Primer:	Forward:	SGS I
Hotstart 2 min 94°C		Revers:	SGS II
33 Zyklen 30 sec 94°C			
30 sec 57°C			
2 min 68°C			
Ende 10 min 68°C			

Für den PCR-Ansatz (s. Tab. 21) wurde ein Prämix ohne *Taq*-Polymerase und Template hergestellt und kräftig gemischt. Nach einpipettieren in 100 µl PCR-Reaktionsgefäße wurde bei RT die zuvor auf Eis aufgetaute *Taq*-Polymerase und das Template hinzugefügt, die Reaktionsgefäße sofort in das PCR-Gerät gestellt und mit der Amplifikation begonnen.

Tab. 21: PCR Ansatz (Amersham, USA)

Substanz	Volumen [µl]
10xPuffer (Amersham)	5,0
dNTP's	1,0
Primer SGS I	1,6
Primer SGS II	1,6
DMSO (100%)	2,5
MgCl ₂ (25 mM)	1,6
A. bidest	36,0
Template	1,0
<i>Taq</i> -Polymerase (Amersham)	0,4

2.7.3. Amplifikation der 16S-23S rDNA aus *Streptomyces* und *Kitasatospora* für Hybridisierungsexperimente

Die allgemeine Vorgehensweise bei der Amplifikation von DNA-Sequenzen mittels PCR wurde im obigen Absatz beschrieben. Für die Amplifikation der 16S-23S rDNA aus Rein- kulturen von Actinomyceten zur Verwendung als markierte Proben auf einem DNA-Micro- array wurden die folgenden Reaktionsparameter gewählt. Die Primer stellen Sequenzen dar, welche die zu amplifizierende intergenetische Spacer-Sequenz zwischen 16S (SGK I 5'b / SGK I) und 23S (SGK II 5'b) rDNA flankieren. Gleichzeitig ermöglicht die Biotinylierung der Primer am 5'Ende die Einführung eines Biotin-Substituenten in die amplifizierten PCR- Fragmente. Damit wird nach der Hybridisierung der Proben mit Gensonden auf dem DNA- Microarray durch die Biotinylierung der PCR-Fragmente eine Detektion über eine Strepta- vidin / Gold-Konjugation ermöglicht (s. Kap. 2.9.).

Durch die Entwicklung des zweiten Chipdesigns "*Kitasatospora* II" wurde eine Verlängerung des PCR-Fragments nötig, da das neue Microarray auch Gensonden enthielt, die aus den Se- quenzen des Endbereichs der 16S rDNA generiert worden waren.

Daher wurden für Hybridisierungsexperimente mit dem DNA-Microarray '*Kitasatospora* II' die Primer SGS I large / SGS I 5'bio large (s. Tab. 14) als forward-Primer verwendet, die beide an der Position 1.000 der 16S rDNA binden.

Der reverse-Primer wurde beibehalten. Das neue größere PCR-Fragment (ca. 800 bp) umfaßt damit den Endbereich der 16S rDNA sowie den kompletten intergenetischen Spacer.

Einstellung Thermocycler:

(Gene Amp PCR system 9700)

Hotstart	15 min 95°C	Primer:	Forward:	SGK I 5 'b /
45 Zyklen	60 sec 95°C			bzw. SGS I large / SGS I
	60 sec 52°C			5'bio large
	2 min 72°C		Revers:	SGK II 5 'b
Ende	10 min 72°C			

Für den PCR Ansatz (s.Tab. 21) wurde ein Prämix ohne *Taq*-Polymerase und Template her- gestellt und kräftig gemischt. Nach einpipettieren in 100 µl PCR-Reaktionsgefäße wurde bei RT die zuvor auf Eis aufgetaute *Taq*-Polymerase und die DNA-Matrize hinzugefügt, die Reaktionsgefäße sofort in das PCR-Gerät gestellt und mit der Amplifikation begonnen.

2.7.4. Amplifikation der 16S-23S rDNA nach DNA-Extraktion aus Bodenproben

Für die Amplifikation der 16S-23S rDNA aus metagenomischer Gesamt-DNA, die aus Bodenproben isoliert worden war, erwies sich nach Vorversuchen die *Taq*-Polymerase (Qiagen, USA) unter Zugabe von Solution Q (Qiagen, USA) als geeignet (s. Tab. 22). Die Verwendung von Solution Q verändert die DNA-Struktur, indem sie den DNA-Doppelstrang auflöst. Damit kann die PCR-Amplifikation verbessert werden. Da die PCR-Fragmente als markierte Proben auf einem DNA-Microarray Verwendung finden sollten, wurden die gleichen Primer wie in Kap. 2.7.3. beschrieben gewählt. Die PCR-Fragmente wurden vor der Weiterverwendung einer Ethanol-fällung unterworfen. Dies war nötig, da der verwendete PCR-Ansatz Solution Q enthielt, welche die DNA-DNA-Hybridisierung auf dem Microarray durch Verhindern der Doppelstrangbildung empfindlich stört.

Tab. 22: PCR Ansatz für Bodenproben (Qiagen, USA)

Substanz	Volumen [μ l]
10xPuffer (Qiagen)	10,0
dNTP's (20 mM)	7,5
Primer SGK I 5 'b	1,6
Primer SGK II 5 'b	1,6
Solution Q	20
MgCl ₂ (25 mM)	1,6
A. bidest	56,2
Template	1,0
<i>Taq</i> -Polymerase (Qiagen)	0,5

2.8. Transformationsverfahren

2.8.1. Präparation von kompetenten Zellen nach Hanahan [91]

Aus einer *E. coli*-Vorkultur (Stamm: Top10 (s. Tab. 24), 5 ml LB-Medium, 12 h, 37°C) wurden 200 ml LB-Medium 1 %-ig (v/v) angeimpft, und mit 1 ml 1M KCl-Lösung sowie 2 ml 1M MgSO₄-Lösung versetzt. Danach wurde auf dem Rundschüttler exakt 2 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde die Kultur in vier 50 ml Falcon-Reaktionsgefäße überführt und zwischen den folgenden Arbeitsschritten immer auf Eis gelagert. Nach dem Abzentrifugieren (5.000 rpm, 5 min, 4°C, Zentrifuge 4K15, Sigma, Taufkirchen) wurde der Überstand abgegossen und die entstandenen Pellets in je 15 ml TFB I Puffer (Zss. s. Tab. 23) wieder aufgenommen. Nach der folgenden Inkubation auf Eis (10 min) wurde erneut abzentrifugiert (3.000 rpm, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die auf dem Boden der Falcon-Reaktionsgefäße entstandenen Pellets wurden in je 2 ml TFB II (Zss. s. Tab. 23) resuspendiert und sofort in 200 µl Einheiten in vorgekühlte Eppendorfgefäße aliquotiert. Die Zellen wurden entweder umgehend für eine Transformation genutzt oder bei -80°C gelagert.

Tab. 23: TFB I und TFB II

TFB I	30mM Kaliumacetat (SL 3M, pH 6.0), 50mM MnCl ₂ (SL 1M), 100mM KCl (SL 3M), 10mM CaCl ₂ (SL 1M), 15% (w/v) Glycerin
-------	--

TFB II	10mM MOPS (SL 1M, pH 7.0), 75mM CaCl ₂ (SL 1M), 10mM KCl (SL 4M), 15% (w/v) Glycerin
--------	---

Tab. 24: Relevante Eigenschaften Stamm *E. coli*-Stamm Top 10

Escherichia coli "Top 10" (F⁻, mcrA, ? (mrr-hsdRMS-mcrBC), ? 80lacZ? M15, ? lacX74, recA1, deoR, araD139, ? (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, (Str^R), endA1, nupG), Herkunft Invitrogen, Karlsruhe

2.8.2. Transformation der kompetenten *E. coli*-Zellen

Die eingefrorenen kompetenten *E.coli*-Zellen (Stamm: Top10, 200 µl) wurden auf Eis aufgetaut, mit dem gesamten Ligationsansatz gemischt und zur Adsorption der DNA an die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Die Aufnahme der DNA in die Zellen erfolgte durch einen Hitzeschock bei 42°C (120 sec). Anschließend wurde der Ansatz kurz auf Eis gelagert (120 sec) und nach Zugabe von 800 µl LB-Medium 1 h bei 37°C zur Ausprägung der Selektivmarker inkubiert.

Nach dem Abzentrifugieren (4 min, 4000 rpm) wurden 100 µl der Zellsuspension auf LBA-Agarplatten unter Selektivbedingungen ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Um die Selektion zu verbessern wurde der X-Gal-Test durchgeführt (s.u.).

2.8.3. Der X-Gal-Test zur Selektion auf rekombinante *E. coli*-Klone

Dieser Test wurde neben der plasmidkodierten Antibiotikaresistenz auf Ampicillin zur Selektion rekombinanter Klone verwendet und basiert darauf, daß die β -Galactosidase das eingesetzte X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid) enzymatisch spaltet und das Reaktionsprodukt durch Luftoxidation zu einem blauen Indigofarbstoff (5-Brom-4-Chlor-indigo) umgewandelt wird.

Viele Plasmide, z. B. der pBluescript-Reihe, enthalten neben dem Promotor- und Operator-Bereich des *lac*-Operons auch das 5'-Ende des *lacZ*-Gens, welches für das alpha-Peptid der β -Galactosidase kodiert.

Dieses wiederum kann die (aufgrund einer aminoterminalen Deletion) verkürzte, inaktive β -Galactosidase von verschiedenen *E. coli*-Klonierungsstämmen komplementieren, die nach der Induktion durch IPTG gebildet wird. Zur Durchführung dieses Tests wurden die LBA Platten etwa 4 h vor dem Ausplattieren der Transformanten mit einer frisch hergestellten Lösung aus 60 μ l IPTG (20 mg/ml) und 40 μ l X-Gal (20 mg/ml in DMF) komplett mit dem Plattierspatel bestrichen. Nach Wachstum konnten die Kolonien anhand ihrer Färbung unterschieden werden. Blaue Kolonien enthielten nur das religierte Plasmid, während bei den weißen Klonen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Insertion in der Multiklonierungsstelle (MCS) des *lacZ*-Gens stattgefunden hatte, so daß entweder kein vollständiges Transkript mehr gebildet wurde (wenn die integrierte DNA einen Transkriptionsterminator trug) oder es zur Bildung eines Hybridproteins kam, welches keine funktionelle alpha-Komplementation im Wirtsorganismus ermöglicht.

2.9. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid-DNA

Alle Sequenzierungen doppelsträngiger Plasmid-DNA wurden in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des HKI-Jena nach dem Prinzip des Kettenabbruch- oder Didesoxynukleotid-Verfahrens nach Sanger *et al.* [92] durchgeführt. Als Primer für die Sequenzierung der Klonierungsplasmide (pGEM®-T-Easy und pBluescript SK II (+)) wurden der T7 promoter-Primer und der pUC/M13 forward-Primer verwendet. Bei der Sequenzierungsreaktion wird die Matrizen-DNA zunächst mit dem Sequenzier-Primer hybridisiert. Die Primer sind am 5'-Ende mit einem Infrarotfarbstoff (IRD 800) markiert. Ausgehend von dem Primer erfolgt die enzymatische Synthese des komplementären Stranges mit Hilfe einer DNA-Polymerase. Die Synthese findet in vier Reaktionsgefäßen statt. Jedes Gefäß enthält Matrizen-DNA, markierten Primer (2pmol), Polymerase und alle vier dNTPs sowie zusätzlich eines der vier Didesoxynucleotidtriphosphate (ddNTPs).

Bei jeder der vier Einzelreaktionen laufen gleichzeitig zahlreiche Primer-Verlängerungen ab. Das Enzym akzeptiert dabei sowohl die dNTP's als auch das jeweilige ddNTP als Substrat. Wird allerdings ein ddNTP zur Kettenverlängerung verwendet, so bricht die Reaktion nach dessen Einbau (Kettenbruch) ab. Aufgrund des fehlenden 3'-Hydroxynukleotids kann kein weiteres Nukleotid angefügt werden. Man erhält so in jeder der vier Einzelreaktionen eine statistische Mischung aller Kettenlängender neu synthetisierten, markierten DNA-Fragmente. Das 5'-Ende jedes Fragments wird vom Sequenzier-Primer gebildet, während das 3'-Ende aus dem Didesoxynucleotid der entsprechenden Einzelreaktion besteht. Die Produkte der Sequenzierreaktion wurden mit dem Sequenzierautomat "Modell 4000" (LI-COR, USA) aufgetrennt und analysiert.

2.10 Hybridisierung von PCR-Fragmenten mit dem AT[®]-Reader-System

Um das Chipdesign des Taxonomie-Microarrays zu evaluieren, wurden verschiedene Hybridisierungsexperimente mit dem ArrayTube[®]-Reader-System (Clondiag, Jena) durchgeführt [93]. Das System basiert auf einem Standard-Reaktionsgefäß mit fest integriertem DNA-Microarray am Boden des Gefäßes (s. Abb 6). Alle Arbeitsschritte werden im Gefäß durchgeführt. Die Detektion der spezifischen Hybridisierung auf dem Microarray erfolgt über eine Gold-Silber-Markierung (s. Abb. 7). Die bei der PCR zur Amplifizierung der zu untersuchenden 16S-23S rDNA-Sequenzen eingesetzten Primer wurden am 5'-Ende biotinyliert. Dies ermöglicht bei erfolgreicher Hybridisierung der amplifizierten ITS-Sequenzen mit den



Gensonden auf dem Microarray eine Konjugation mit dem Biotin der PCR-Fragmente nach Zugabe einer Streptavidin-Gold-Verbindung (EM.STP/5). Mittels einer anschließend zugegebenen Silberlösung (Silver Enhancer Kit) kommt es zu einer goldinduzierten Silberpräzipitation. Die Detektion der sich bildenden dunklen Spots erfolgt dann durch Transmissionsmessung im AT[®]-Reader mit anschließender Auswertung der Daten durch die IconoClust-AT[®]-Software (Clondiag, Jena). Parallel zu dieser Markierungsmethode wurden alternative Markierungs- und Hybridisierungsmethoden getestet. So wurde die Möglichkeit des Nachweises einer Hybridisierung von Gesamt-DNA ohne einen PCR-Zwischenschritt mittels "capture-probe"-Oligonukleotiden untersucht (s. Kap. 2.11.).

Abb. 6.: Array Tube[®]

Desweiteren erfolgte der Einsatz einer veränderten Markierungs-reaktion durch ein enzymatisches Detektionsassay, welches die Reaktionszeit entscheidend verringert und die Empfindlichkeit des Systems erhöht.

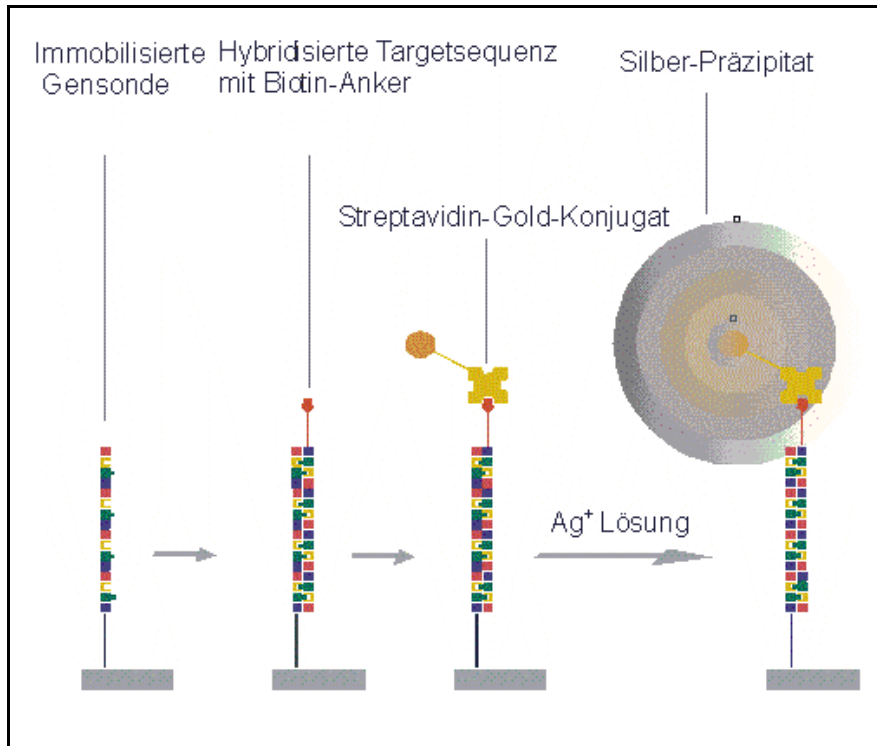


Abb. 7: Detektionsprinzip der Silberpräzipitation

2.10.1. Durchführung der Hybridisierung von 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten auf dem DNA-Microarray

Die mittels PCR amplifizierte, am 5'-Ende biotinylierte DNA-Fragmente der verschiedenen Stämme wurden zur Hybridisierung auf dem DNA-Microarray genutzt (s. Kap. 2.6.3.). Dazu wurde je nach Versuch die verwendete Menge PCR-Produkt (1 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 30 μ l) mit dem Hybridisierungspuffer (6xSSPE/ 0,1% SDS s. Tab. 25) auf 100 μ l aufgefüllt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend 2 min auf Eis gelagert. Dabei entspricht 1 μ l PCR-Produkt ca. 1 μ g DNA (Biophotometer (Eppendorf, Hamburg)).

Die Array-Tubes[®] wurden zweimal mit Hybridisierungspuffer vorgewaschen (5 min, 30°C, 550 rpm). Sämtliche verwendeten Lösungen wurden nach Ablauf der Reaktionszeit mit einer Plastik-Pasteurpipette vorsichtig entfernt. Dabei ist wichtig, das eingelassene Array auf dem Boden des Reaktionsgefäße nicht zu berühren. Anschließend wurden 100 μ l der denaturierten Probe in das Array-Tube[®] gegeben und je nach Versuch bei verschiedenen Temperaturen (50°C, 55°C, 60°C, 65°C oder 70°C) hybridisiert (60 min, 550 rpm).

Nach drei Waschschritten (1: 2xSSC/ 0,2% SDS, 5 min, 30°C, 550 rpm, 2: 2xSSC/ 5 min, 20°C, 550 rpm, 3: 0,2xSSC/ 5 min, 20°C, 550 rpm, s. Tab. 26) wurden 100 µl einer frisch hergestellten 2%-igen Blockierlösung (Clondiag, Jena) auf das Array gebracht (15 min. 30°C, 550 rpm), um dessen Hintergrundsignal abzuschwächen. Von der frisch hergestellten Streptavidin-Konjugationslösung (250 pg/µl, EM.STP/5) wurden anschließend 100 µl auf das Array pipettiert und für 15 min konjugiert (30°C, 550 rpm). Danach wurde wie oben beschrieben dreimal gewaschen, und nicht sofort mit Silberlösung behandelte Array-Tubes[®] verblieben bei 20°C im Thermomixer (Lagerung bis zu 3 h möglich). Zur Vorbereitung der Silberpräzipitation wurden 50 µl Silber-Enhancer (Silber-Enhancement-Kit) und 50 µl Silber-Initiator (Silber-Enhancement-Kit) vorsichtig gemischt. Das Array-Tube[®] wurde in den temperierten Ausleseschacht (25°C) des AT[®]-Readers eingelegt wo, unter Sichtkontrolle über die CCD-Kamera des Readers, die letzte Waschlösung entfernt und die Kamera des Readers fokussiert wurde. Unmittelbar darauf erfolgte die Zugabe der vorbereiteten Silberlösung und der Start der Messung mit der Auslesesoftware Iconoscan[®] (Clondiag, Jena). Die CCD-Kamera misst in 60 sec Intervallen insgesamt 41 mal die Transmission von Weißlicht durch das Array-Tube[®]. Die so gewonnenen Daten wurden mit der Software Iconoclust[®] ausgewertet

Tab. 25: 20xSSPE (pH 7,4)

SL für Hybridisierungspuffer

Substanz	Masse [g]
NaCl	175,3
NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	27,6
EDTA	7,4
A. bidest	Ad 1000 ml
NaOH	pH 7,4

Tab. 26: 20xSSC (pH 7,0)

SL für Waschpuffer

Substanz	Masse [g]
NaCl	175,3
K-Citrat	88,2
A. bidest	Ad 1000 ml
NaOH	pH 7,0

2.11. Hybridisierung von Gesamt-DNA mit dem AT[®]-Reader-System

Obwohl die PCR eine der wichtigsten Standardmethoden der Molekularbiologie darstellt, birgt sie auch Probleme und ist immer noch kosten- und zeitintensiv [52]. Daher wurde ein PCR-unabhängiger Experimentalansatz erprobt.

Das Taxonomie-Microarray sowie die Vorgehensweise bei den Hybridisierungsexperimenten mit dem ArrayTube[®]-Reader-System wurde dabei weitestgehend beibehalten. Die Detektion der spezifischen Hybridisierung der Targetmoleküle mit den Gensonden auf dem Microarray erfolgt ebenfalls über eine Gold-Silber-Markierung. Allerdings wurde direkt aus lysierten Bakterienzellen gewonnene un-markierte Gesamt-DNA verwendet. Zur Detektion dienen 5'-biotinylierte "capture-probe"-Oligonukleotide [86]. Diese "capture-probe"-Oligonukleotide sind 20mere, die in räumlicher Nähe zu den Zielsequenzen in einem konservierten Bereich der 16S-23S rDNA-Region binden. Die Bindung erfolgt an die bereits spezifisch an die immobilisierten Gensonden hybridisierte Gesamt-DNA. Dabei ist darauf zu achten, daß die Sequenzen der "capture-probe"-Oligonukleotide (s. Tab. 27) keine Hybridisierung mit den spezifischen immobilisier-ten Gensonden zulassen, was zu falsch positiven Ergebnissen führen würde. Bei erfolgreicher Hybridisierung der "capture-probe"-Oligonukleotide nach dem "Sandwich-Prinzip" auf dem Microarray wird durch Zugabe einer Streptavidin-Gold-Verbindung (EM.STP/5) ein Konjugat mit dem Biotinrest der "capture-probe"-Oligonukleotide gebildet. Nach Zugabe einer Silberlösung (Silver Enhancer Kit) kommt es ebenfalls zu einer goldinduzierten Silberpräzipitation. Die Detektion erfolgt dann durch Transmissionsmessung im AT[®] Reader. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der IconoClust-AT[®]-Software.

Tab. 27: Sequenzen der "capture-probe" Oligonukleotide

"capture-probe" Oligonukleotid I	"capture-probe" Oligonukleotid II	"capture-probe" Oligonukleotid III
5'-GGTCGTTGTTTGAGAA CTGCA-3'	5'-GGGCACGTTGTTGG GTCCTGAGG-3'	5'-ACGGGCGGTGTGT-3

2.11.1. Durchführung der Hybridisierung von Gesamt-DNA

Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.10.2. beschrieben. Abweichend wurden 20 µl Gesamt-DNA-Lösung (ca. 20µg DNA) eingedampft und mit Hybridisierungspuffer (s Tab. 25) auf 100 µl auf-gefüllt, und 1 µl der "capture-probe"-Oligonukleotid-Lösungen I-III zugegeben (s. Tab. 27). Die weitere Vorgehensweise war identisch zur Hybridisierung der 5'-biotinylierten PCR-Fragmente auf dem DNA-Microarray.

2.12. Detektion der Hybridisierung der 5'-biotinylierter PCR-Fragmente durch enzymatisch katalysierte Farbbildung

Zur Detektion der Hybridisierung von 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten wurde eine veränderte Markierungsreaktion eingesetzt, die durch Kopplung einer an Streptavidin gebundenen Peroxidase (Poly-HRB-Streptavidin) funktioniert. Nach Konjugation des Streptavidin/Peroxidase-Komplexes an die 5'-biotinylierten PCR-Fragmente erfolgt nach Zugabe eines Peroxidase-Substrats eine enzymkatalysierte Farbbildung an den positiven Spots. Die experimentelle Vorgehensweise war nahezu identisch mit dem für die Silberpräzipitation beschriebenen Verfahren. Es wurde lediglich kein Streptavidin/Gold-Konjugat zugegeben, sondern Poly-HRB-Streptavidin in 1xPBS (100 pg/ml) sowie anstatt der Silberlösungen 100 µl Peroxidase-Substrat. Die Detektion erfolgt ebenfalls wie in Kap. 2.11. beschrieben im AT-Reader[®] durch Transmissionsmessung (60 Intervalle, a 10 sec). Weiterhin muss das in den herkömmlichen Puffern zugesetzte SDS durch Triton ersetzt werden (6xSSPE/ 0,05% Triton, 2xSSC/ 0,1% Triton).

2.13. Analyse der DNA-Sequenzen

2.13.1. Sequenz-Alignment

Die 16S-23S rDNA-Region der sequenzierten Actinomyceten, sowie auf der NCBI-GenBank-Datenbank [39] hinterlegte 16S-23S rDNA-Sequenzen, wurden mit einem DNA-Sequenzalignment-Programm zum Abgleich der Basenfolgen bearbeitet (MegAlign[®], DNA Star, USA). Zuvor wurden die Bereiche der Sequenzen, die, bedingt durch die Primerwahl, Abschnitte der 16S bzw. 23S rDNA darstellten, entfernt. Zum Alignment nutzt das Programm den Clustal V-Algorithmus [94]. Dieser gruppiert Sequenzen in Cluster durch Prüfung von Sequenzunterschieden. Zuerst werden einzelne Paare verglichen und in einem zweiten Schritt diese Paare zusammen als Gruppen behandelt um dadurch ein Gesamtalignment zu erreichen.

2.13.2. Berechnung der prozentualen Übereinstimmung der Sequenzen der 16S-23S rDNA-Region

Zum Vergleich der 16S-23S rDNA-Sequenzen innerhalb der untersuchten Actinomyceten wurde ein Variationsindex mit Hilfe des Programms MegAlign[®] berechnet. Es wurden jeweils zwei Sequenzen miteinander verglichen und deren prozentuale Unterschiede errechnet, wobei sowohl Punktmutationen als auch Insertionen/Deletionen berücksichtigt wurden. Dieser Koeffizient betrug 0% für identische Sequenzen.

2.13.3. Phylogenetische Analyse der Sequenzdaten

Die phylogenetischen Beziehungen wurden aus den Sequenzdaten mit Hilfe der Neighbor-Joining-Analyse Funktion von MegAlign[®] erstellt [25]. Das Programm leitet einen Gesamtkonsensus-Baum ab.

2.13.4. Auswahl der Oligosequenzen für das DNA-Microarray

Die Qualität von Daten aus DNA-Microarray-Untersuchungen ist stark abhängig von einer optimalen Sonden Auswahl für das Array [95]. Dabei ist die Genauigkeit der erhaltenen Daten umso höher, je spezifischer eine ausgewählte Sonden Sequenz für einen Organismus ist. Verwandte Organismen müssen genügend Basenfehlpaarungen (Mismatches) in der ausgewählten Sonden Sequenz aufweisen. Dies verringert die Gefahr von falsch positiven Ergebnissen und das „Hintergrundrauschen“ der Proben. Grund dafür ist eine niedrige freie Hybridisierungsenergie für den gesuchten Genabschnitt im Vergleich zu einer relativ hohen freien Hybridisierungsenergie der untersuchten Genbereiche aus dem gesamten Hybridisierungspool. Diese Energie steigt mit der Zahl der Basenfehlpaarungen. Da die freie Hybridisierungsenergie der Proben-DNA nicht allein von der Sequenz dieser DNA abhängt, sondern auch von ihrer Struktur und Konzentration ist ihre Vorausberechnung derzeit noch nicht sicher möglich. Empirisch kann man jedoch bei mindestens 4 Basenfehlpaarungen von einer ausreichenden Differenz der Hybridisierungsenergien ausgehen [97]. Daher wurde bei allen ausgewählten Oligonukleotiden darauf geachtet, daß mindestens 4 Basenfehlpaarungen (Mismatches) zu allen anderen DNA-Sequenzen, die auf der NCBI-GenBank hinterlegt sind, vorhanden waren. Dies wurde mit der BLAST[®] Funktion [96] "search for short nearly exact matches" auf dem NCBI Server überprüft [39]. Bei dem Alignment der Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die 16S-23S rDNA-Regionen der untersuchten Stämme sowohl Bereiche hoher Stabilität als auch Bereiche hoher Variabilität aufweisen.

Diese Bereiche hoher Variabilität sind in ihrer Sequenz teilweise einmalig für den jeweiligen Organismus und unterscheiden sich so signifikant von allen anderen Organismen. Diese hohe Varianz ruft daher schon bei kurzen Probesequenzen ("short DNA oligonucleotides") eine ausreichend hohe Anzahl an Basenfehlpaarungen hervor. Aus den bearbeiteten Sequenzen wurden deshalb kurze DNA-Oligomere (26 bp) ausgewählt, deren Basenfolge ausschließlich nur bei den zu untersuchenden Organismen zu finden sind und damit zu ihrer sicheren Identifizierung dienen können. Dabei wurden wie oben erwähnt nur Sequenzen ausgewählt, deren ähnlichste Nachbarsequenzen mindestens 4 Basenfehlpaarungen (Mismatches) zur verwendeten Sequenz aufwiesen.

Da Fehlpaarungen im Mittelbereich von Oligonukleotiden falsch positive Hybridisierungen besser verhindern, wurden die Oligonukleotide entsprechend ausgewählt. Die so erhaltenen Oligomere wurden mit dem Programm Primer 3 [97] auf Übereinstimmung der Schmelzpunkte geprüft und ggf. um Basenpaare aus der Originalsequenz verlängert oder verkürzt. Des Weiteren wurden die in den Arbeiten von Kane [64] und Lockhart [98] aufgestellten Anforderungen an Sonden-Oligomere für DNA-Microarrays überprüft. Dazu zählt:

1. Die Ähnlichkeit der verwendeten Sondensequenzen sollte 75% nicht übersteigen um Kreuz-Hybridisierungen und damit eine Erhöhung des Hintergrundsignals zu vermeiden. (Auswertung: MegAlign[®], Option:"sequence distance")
2. Größere Abschnitte von 100%-iger Ähnlichkeit sollten in den Sondensequenzen vermieden werden. (Auswertung: BLAST[®] [96])
3. Kein Nukleotid sollte einen Gesamtanteil über 50% innerhalb der Sequenz haben. (Auswertung: Genomatix Tools[®] [99])
4. Die Länge von kontinuierlichen Basenfolgen darf 25% der Gesamtsequenz nicht übersteigen. (Auswertung: Genomatix Tools[®] [99])
5. Der (G+C) Gehalt der Probesequenz sollte bei 40-60% liegen. (Auswertung: Genomatix Tools[®] [99])
6. Es dürfen keine Selbsthybridisierungsmöglichkeiten innerhalb der Sondensequenz bestehen. (Auswertung: IDT Oligo Analyzer 2.5[®], Integrated DNA Technologies, Inc., USA)

Die so gewonnenen Sequenzinformationen wurden zum Aufbau des DNA-Microarrays genutzt.

2.14. Synthese der DNA-Microarrays

Die ausgewählten Oligonukleotide wurden im 1 µmol-Maßstab synthetisiert und eine Standard-Aufreinigung durchgeführt. Dabei wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende mit einem C₆-Aminolink substituiert, der zur Kopplung der Sonden-Oligonukleotide an die Oberfläche des Microarrays dient. Das Spotten der Oligonukleotide auf die DNA-Microarrays erfolgte durch die Firma Clontech Chip Technologies.

3. Ergebnisse

3.1. Auswahl einer geeigneten Zielregion der Gensonden für das DNA-Microarray

50 auf der NCBI-GenBank Datenbank hinterlegte *Streptomyces* 16S rDNA-Sequenzen sowie alle *Kitasatospora* 16S rDNA-Sequenzen wurden einem Alignment unterzogen und innerhalb der Sequenz auf einen Bereich hin untersucht, der geeignet wäre, als Zielregion der Gensonden zu dienen. Die vorhandenen Sequenzdaten für die 16S rDNA aus der Datenbank zeigten jedoch eine zu geringe Varianz der Sequenzen, so dass die gestellten Anforderungen (s. Kap. 2.13.4) an die Gensonden nicht erfüllt werden konnten. Daraufhin wurde die Region des 16S-23S rDNA-intergenetischen Spacers (ITS) mit Hilfe der Datenbank auf ihre Eignung als Zielregion überprüft. Hier zeigte sich eine viel höhere Varianz der Sequenzen. Daraufhin wurden dann die vorhandenen Sequenzdaten durch zusätzliche Sequenzierungen von Typstämmen untermauert. Die Vorgehensweise ist in den folgenden Kapiteln beschrieben.

3.2. Amplifizierung und Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region von Actinomyceten

Für die spätere Auswahl von Oligonukleotid-Gensonden aus dem Bereich der Zielregion sowie zur Überprüfung dieser Sonden wurden die Sequenzen der ITS-Region des ribosomalen Operons von ca. 50 *Streptomyces* und *Kitasatospora* Stämmen ermittelt und verglichen.

3.2.1. Amplifizierung der 16S-23S rDNA-Region

Mit den Primern SGS 1 und SGS 2 (s. Kap. 2.7.) wurde die 16S-23S rDNA-Region sowie Teile der 16S rDNA und der 23S rDNA amplifiziert. Zur Kontrolle der PCR-Amplifikation wurden jeweils 10 µl der PCR-Ansätze auf 1%-igen Agarose-Gelen aufgetrennt. Die PCR-Amplifikate der 16S-23S rDNA-Region der verschiedenen Spezies der Gattungen *Kitasatospora* und *Streptomyces* wiesen zahlreiche Längenpolymorphismen auf und ihre Größe variierte zwischen 250 und 350 bp. Diese Polymorphismen traten jedoch verstärkt innerhalb der Gattung *Streptomyces* auf (s. Abb. 8), während die Spezies der Gattung *Kitasatospora* ein homogeneres Bild lieferten und sich die amplifizierten ITS-Regionen in ihrer Länge nicht so stark unterschieden. Die Abb. 8 und Abb. 9 zeigen einige Beispiele von erfolgreichen Amplifikationen der 16S-23S rDNA-Region der beiden Gattungen.



Abb. 8: PCR-Fragmente der 16S-23S rDNA-Region von Spezies der Gattung *Streptomyces* in 1%-igen Agarosegel

Bahnen (von links nach rechts)

1. *S. violaceoruber*, 2.-3. *S. violens*,
4. *S. rochei*, 5. *S. clavuligerus*,
6. *S. violaceus*, 7. *S. candidus*,
8. *S. violaceorectus*, 9. *S. aureofaciens*,
10. *S. cattleya*, 11. *S. achromogenes*,
12. *S. parvulus*, 13. *S. viridochromogenes*,
14. 1kb plus DNA-Leiter

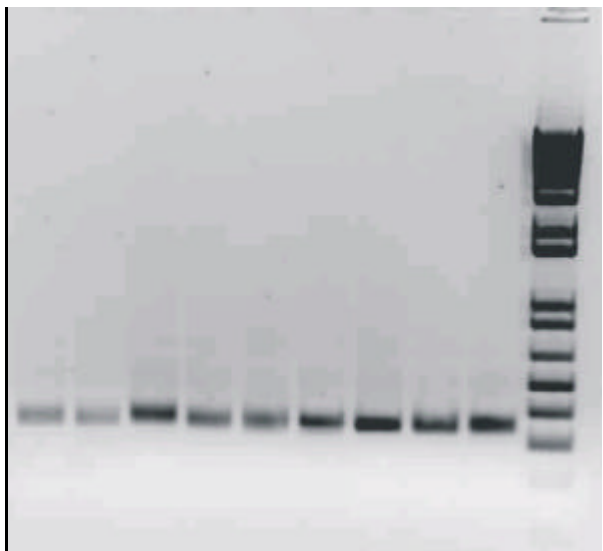


Abb. 9: PCR-Fragmente der 16S-23S rDNA-Region von Spezies der Gattung *Kitasatospora* in 1%-igen Agarosegel

Bahnen (von links nach rechts)

1. *K. phosalacinea*, 2. *K. setae*,
3. *K. cochleata*, 4. *K. cystarginea*,
5. *K. kifunensis*, 6. *K. azatica*,
7. *K. paracochleata*, 8. *K. mediocidica*,
9. *K. griseola*, 10. 1kb plus DNA-Leiter

3.2.2. Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region der Actinomyceten

Die Sequenzierung der 16S-23S rDNA-Region wurde in der Abteilung Zell- und Molekularbiologie des HKI Jena durchgeführt. Dazu wurden die amplifizierten PCR-Fragmente der Gesamt-ITS-Region in die Vektoren pGEM[®]-T-Easy und pBluescript SK II (+) kloniert sowie in kompetente *E.coli*-Zellen transformiert und mit anschließender Blau-Weiss-Selektion und Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen (s. Kap. 2.6) der Erfolg der Transformation überprüft. Bei erfolgreicher Transformation wurden die Vektoren mit der Insert-DNA sequenziert. Die Sequenzen wurden anschließend nachbearbeitet.

Das bedeutet, Restsequenzen der Vektoren wurden entfernt. Die Sequenzdaten der 16S-23S rDNA für ca. 47 *Streptomyces*- und *Kitasatospora*-Spezies wurden so ermittelt und sind im Anhang A dieser Arbeit hinterlegt.

3.3. Alignment und Sequenzanalyse der 16S-23S rDNA-Region

Die Abb. 10 zeigt einen Ausschnitt aus dem Alignment der ITS-Sequenzen aller untersuchten *Streptomyces*- und *Kitasatospora*-Stämme. Das Alignment zeigt deutlich eine hohe Variabilität der Sequenzen innerhalb der ITS-Region bei beiden Gattungen. Diese Variabilität ist größer als in 16S oder 23S rDNA-Bereichen des Operons. Der Sequenzvergleich zeigte außerdem eine höhere Längen- und Sequenzvariabilität der ITS-Region von Streptomyceten gegenüber der ITS-Region der Gattung *Kitasatospora*. Vergleicht man die ITS-Regionen aller Spezies miteinander, so zeigen sich neben den variablen auch konservierte Regionen.

Beispiele dafür sind die Sequenzen 5'-CGCTGTTGGGTGTCTGAGGG-3' (Position: ca. 180-200) und 5'-GCCGGCCCCGTGAA-3' (Position: ca. 220-234), die sich in nahezu allen untersuchten Spezies fanden. Allerdings war der Konservierungsgrad dieser Regionen bei der Gattung *Kitasatospora* deutlich höher als bei *Streptomyces*-Spezies. Diese teilweise Konservierung mit generell höherer Übereinstimmung der Sequenzen bedingt eine deutliche Clusterbildung von einzelnen Speziesgruppen innerhalb des Gesamtalignments. So bilden z.B. die Spezies der Gattung *Kitasatospora* einen Cluster innerhalb der untersuchten Stämme, da sie eine große Zahl an Bereichen mit generell höherer Übereinstimmung der Sequenz aufweisen. (Bsp. A. 5'-GGTCGTTGTTTGAGAACTGCACAGTG-3', Position: ca. 240-266, Bsp. B. 5'-GTGTCGGGCACGTTGTTGGGTCCTGAGGGA-3', Position: ca. 131-162).

Typisch für diese Bereiche ist das universelle Vorkommen bei allen Spezies der Gattung *Kitasatospora*. Bei der Gattung *Streptomyces* zeigen nur wenige Spezies exakt übereinstimmende Sequenzbereiche und nie alle Spezies der Gattung. Dies zeigt die große Heterogenität der Gattung *Streptomyces*. Außerdem weisen alle *Kitasatospora*-Stämme typische Deletionen, also das Fehlen bestimmter Sequenzbereiche, gegenüber der Gattung *Streptomyces* auf. In Abb. 10 ist deutlich eine Deletion von etwa 30 bp (Position: ca. 10-40) bei allen Spezies der Gattung *Kitasatospora* zu erkennen. Einige Streptomyceten zeigen die gleiche Deletion, der Großteil aber nicht. Weiterhin konnten die neun typischen *Kitasatospora*-Nukleotide (5'-TTGTTGGGT-3') [20] bei allen untersuchten *Kitasatospora*-Spezies nachgewiesen werden.



Abb. 10: Ausschnitt Sequenzalignment der untersuchten *Streptomyces*- und *Kitasatospora*-Stämme

3.3.1. Variabilität der 16S-23S rDNA-Region bei den untersuchten Actinomyceten

Um die ITS-Sequenzen der untersuchten Spezies vergleichen zu können, wurde eine Ähnlichkeitsmatrix mit Hilfe des Programms MegAlign[®] erstellt. Dieses basiert auf dem Clustal V-Algorithmus [94]. Diese Matrix drückt die prozentuale Unterschiede zwischen jeweils zwei Sequenzen aus und berücksichtigt sowohl Punktmutationen als auch Insertionen / Deletionen. Die Berechnung dieses Indexes erfolgte auf der Basis der gesamten sequenzierten 16S-23S rDNA-Region. Die vollständige Similaritätsmatrix ist in Anhang C hinterlegt. Innerhalb der beiden Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* wurden für diese Ähnlichkeitsmatrix Werte zwischen ca. 20 und 80% Similarität (prozentualer Übereinstimmung) erhalten. Die Werte schwanken bei den einzelnen Stämmen stark, allerdings sind deutliche Trends erkennbar:

1. Actinomyceten, die nicht den Gattungen *Streptomyces* oder *Kitasatospora* angehören (z.B. *Saccharothrix erythraea*, *Amycolathopsis orientalis*), zeigen eine niedrige prozentuale Übereinstimmung zu Spezies der Gattung *Kitasatospora* und *Streptomyces* (ca. 20-40%).
2. Die Streptomyceten zeigen ein sehr heterogenes Bild in der prozentualen Übereinstimmung der Sequenzen der ITS-Region der untersuchten Stämme. Sie schwankte zwischen 20-70%. Die Begründung hierfür liegt in der breiten Auswahl der untersuchten Stämme aus den zahlreichen Spezies der Gattung *Streptomyces*. Allerdings ist auch hier eine deutliche Clusterbildung mit hohen Werten für die prozentuale Übereinstimmung bei einzelnen Gruppen innerhalb der Gattung erkennbar.
3. Die untersuchten Spezies der Gattung *Kitasatospora* zeigen eine sehr hohe prozentuale Übereinstimmung (60-80%) innerhalb der gesamten Gattung. Dagegen ist die prozentuale Übereinstimmung zu Spezies der Gattung *Streptomyces* deutlich geringer (20-60%).

3.3.2. Stammbaum der untersuchten Actinomyceten

Die phylogenetischen Beziehungen wurden aus den Sequenzen der 16S-23S rDNA-Region mit MegAlign[®] abgeleitet. Der Neighbour-Joining-Stammbaum ist im Anhang B dieser Arbeit hinterlegt und die Analyse zeigt, daß die Stämme der Gattung *Kitasatospora* einen Cluster bilden, der sich deutlich von anderen Streptomyceten abgrenzt.

Die von Zhang [20] beschriebene großen Divergenz in der Sequenz der ITS-Region von *Streptomyces*- und *Kitasatospora*-Spezies konnte also auch mit einer höheren Anzahl an untersuchten Stämmen bestätigt werden.

3.4. Auswahl der Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign

3.4.1. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign "*Kitasatospora I*"

Für das erste Microarraydesign wurden zunächst 12 Spezies der Gattung *Kitasatospora* ausgewählt. Die beim Alignment der 16S-23S rDNA-Region dieser 12 Spezies gefundenen Bereiche hoher Variabilität wurden zum Aufbau des DNA-Microarrays genutzt. Dazu wurden zwei hochvariable ITS-Sequenzabschnitte gewählt (Region 1: 5'- 3'; ca.110-140 bp und Region 2: 5'- 3'; ca. 60-90 bp). Aus diesen Regionen wurde für jede Spezies ein ca. 26 bp langes Oligonukleotid ausgewählt und zunächst manuell mit den Sequenzen der anderen untersuchten Spezies auf eventuelle Übereinstimmungen und Eignung als Gensonde geprüft. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Sequenz für jede andere Spezies sich um mindestens vier Basenfehlpaarungen von dem ausgewählten Oligonukleotid unterschied.

Damit können falsch positive Hybridisierungssignale durch ähnliche Sequenzen vermieden werden. Weiterhin wurde darauf geachtet, daß die Basenfehlpaarungen im mittleren Bereich der Oligomere lagen, da Fehlpaarungen im Randbereich von Oligomeren noch eine Hybridisierung im Mittelbereich zulassen und damit ebenfalls zu falsch positiven Signalen führen.

Durch „Verschieben“ der ausgewählten Oligonukleotidsequenzen auf dem DNA-Strang wurden die Basenfehlpaarungen in den Mittelbereich des Oligonukleotides verlagert. Um die Spezifität der Oligonukleotide für die jeweilige Spezies zu prüfen, wurden diese mit dem Sequenzvergleichs-Algorithmus des Programms BLAST[®] auf dem NCBI-Server untersucht (Daten nicht gezeigt) [39].

Keines der ausgewählten Oligonukleotide besaß eine Sequenz, die einer der in dieser Datenbank vorhandenen Sequenz so ähnlich war, daß eine Hybridisierung der ausgewählten Oligonukleotide mit DNA-Regionen anderer Organismen wahrscheinlich wäre.

Damit sind die ausgewählten Oligonukleotid-Gensondensequenzen weitestgehend spezies-spezifisch für die gesuchten Zielsequenzen auf der 16S-23S Region des rDNA-Operons. Die Tab. 28 zeigt die für das erste Microarraydesign ausgewählten Oligonukleotide.

Tab. 28: Ausgewählte Oligonukleotide für Microarray "Kitasatospora I"

Nummer	Sequenz der Gensonde 5'-3'	Nomenklatur
1	agacagggaccgcttgggtgtcggg	<i>K. phosalacinea</i>
2	gaaagcgttcgtctggcgtcgggt	<i>K. setae</i>
3	ggtcaccagcttgggtgtcgggcac	<i>K. cochleata</i>
4	gtgggtttgtgactgggtcgtcgg	<i>K. cystarginea</i>
5	gaaagcgtttcttgagtctgggtgt	<i>K. kifunensis</i>
6	agacggttcattgggtcgggtgtc	" <i>K. melanogena</i> "
7	gaacgcaggtcctgaagcgggtgtc	" <i>K. brunnea</i> "
8	gaaagcttcagcgggtcgggtgt	<i>K. mediocidica</i>
9	gaagagattctggatgcagtgtc	<i>K. paracochleata</i>
10	gaacgcgggttcggagtcgggtgt	<i>K. griseola</i>
11	tggaacgcggtaccgctgggtgtcc	" <i>K. streptosporus</i> "
12	ttcggcacgctcgggtgatgccgc	" <i>K. melanogena</i> "
13	attcggcacacacggtgacggactgc	" <i>K. brunnea</i> "
14	attcggcacactcggtaggatcactag	<i>K. cochleata</i>
15	attcggcacggttcgggatcggccact	<i>K. cystarginea</i>
16	attcggcacacgcggtgatgaccgtc	<i>K. griseola</i>
17	attcggcacactgggtgatggttcgtg	<i>K. kifunensis</i>
18	gcacacacggttgggtgtaccagta	<i>K. mediocidica</i>
19	attcggcacaggaagtgaacagagagct	<i>K. paracochleata</i>
20	attcggcacacacggttgggatctgc	<i>K. phosalacinea</i>
21	attcggcacgatgaacgagacgagcgg	<i>K. setae</i>
22	attcggcacacatggttaggacctgcc	" <i>K. streptosporus</i> "
23	gctcatgggtggaacgttgactattcg	<i>Kitasatospora universal I</i>
24	gtgctcccccgccaattct	<i>Archea</i>
25	gctcatgggtggaacgttgactattcg	<i>Kitasatospora universal I MWG</i>
26	gtgctcccccgccaattct	<i>Archea MWG</i>
27	accgcttgcgggccc	<i>Bacteria</i>
28	tgaatcagaattctgagaaagtctt	Pflanze-Negativ-Kontrolle
29	gacaattaaaccgtttcaataca	Hefe-Negativ-Kontrolle

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Oligonukleotide (s. Anhang D) wurden auf die in den Arbeiten von Kane [64] und Lockhart [69] aufgestellten Forderungen hin überprüft, um ihre Eignung als Gensonde festzustellen.

Zusätzlich zu den spezies-spezifischen Gensonden der *Kitasatospora*-Spezies wurden einige Universal-Oligonukleotide ausgewählt, die als Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt wurden. Sie wurden ebenfalls mit den genannten Methoden auf Eignung überprüft. Ihre Sequenzen sind allerdings nicht hoch spezifisch, sondern umfassen z.B. eine Gattung wie die Sonde "*Kitasatospora* universal I". Alle untersuchten Eigenschaften der Oligonukleotide sind nachfolgend zusammengefaßt:

1. Keine der ausgewählten Gensondensequenzen zeigt eine Übereinstimmung von über 75 % mit einer der anderen Sequenzen auf dem Microarray.
2. Keine Gensondensequenz besitzt Bereiche 100%-iger Übereinstimmung mit anderen Gensondensequenzen, die sich über einen großen Bereich der Sequenz erstrecken.
3. In keiner der Gensondensequenzen hat eine der DNA-Basen einen Anteil deutlich über 50% (Ausnahme "*Propionibacterium* universal").
4. Keine Gensondensequenz besitzt eine kontinuierliche Basenfolge, die über 25% der Gesamtsequenz ausmacht.
5. Der G+C-Gehalt der Gensondensequenzen liegt im Durchschnitt über den geforderten 60% was im allgemein hohen G+C Gehalt der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* begründet ist.
6. Keine Gensondensequenz zeigt nach der rechnerischen Auswertung eine starke Selbsthybridisierungstendenz.

3.4.2. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign "*Kitasatospora* II"

Die Auswahl der Sequenzen für das zweite Microarray erfolgte wie Kap. 3.4.1. beschrieben.

Für das zweite Arraydesign wurden einige neue Universal-Gensonden gewählt sowie einige neue *Kitasatospora*-Spezies und Stämme auf das Array aufgenommen. Weiterhin wurden einige FISH-Sonden aus einer Datenbank [100] auf ihre Eignung als Gensonden überprüft.

Die neuen Gensonden-Oligonukleotide des Arrays "*Kitasatospora* II" sind in Tab. 29 aufgeführt, die Sonden der Nr. 1-30 wurden vom ersten Arraydesign übernommen (s. Tab. 28).

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Oligonukleotide (s. Anhang D) wurden abschließend ebenfalls überprüft, um ihre Eignung als Gensonde festzustellen. Dabei erwiesen sie sich als geeignet.

Tab. 29: Ausgewählte Oligonukleotide für Microarray "Kitasatospora II"

Nummer	Sequenz der Gensonde 5'-3'	Nomenklatur
31	agcacctgttggtcctgaa	<i>Micromonospora spec.</i> universal
32	cggtctgttgccctcacaagtactgc	Stamm "HKI-2050-15"
33	acacaacccggaaaacaccaggtcggtcc	Stamm "HKI-2122-22"
34	cagtacctggtggttcagccgggacgcg	Stamm "HKI-2291-12"
35	ctcgggttggtggcccgtcagtactgctg	<i>S. aureofaciens</i>
36	actgggtttggtcctgtagtactgctt	<i>K. putterlickiae</i>
37	atgggtggaacgttgactattcggca	<i>Streptomyces spec.</i> universal I
38	gctcattagtgagcactggctaact	<i>Streptosporangium spec.</i> uni.
39	gcctgtacacaccgccgtcacgtca	Actinomycetes universal I
40	agcccgcgtgtaccc	Archea universal
41	gctcgttgccggacttaacc	Bacteria universal
42	tagaaagggcagggga	Eucaria universal
43	ttcaggccggcctggtgctcgtatgggtgg	<i>Frankia spec.</i> universal
44	ccagccccaccttcgac	Actinomycetes universal II
45	acatcgagtatgggtctgctcagtactgc	Stamm "HKI-2291-42"
46	acagtggatagcatctttgtagaa	<i>Propionibacterium spec.</i> Uni.
47	ttggtggtggggtgtggtgtttga	<i>Mycobacterium spec.</i> universal
48	accctctgggagggagccgtcgaaggtggg	<i>Coryneb. Nocard. spec.</i> universal

3.4.3. Oligonukleotid-Sequenzen für das Microarraydesign "Kitasatospora III"

Für das dritte Arraydesign wurden einige neue *Kitasatospora*-Spezies und Stämme auf das Array aufgenommen. Weiterhin wurden die Gensonden, die in den bisherigen Experimenten keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferten, nicht wieder aufgenommen. Bei einigen spezies-spezifischen Gensonden wurde die Sequenz modifiziert und sie wurden mit veränderter Sequenz auf das Arraydesign "Kitasatospora III" gespottet. Dabei wurde die ursprüngliche Oligonukleotidsequenz auf der DNA in 5'-Richtung "verschoben", um ihre Hybridisierungsfähigkeiten zu verbessern. Sie wurden entsprechend ihrer Stämmen benannt und mit dem Zusatz "B" bzw. "C", bei einer weiteren Verschiebung, versehen. Die neuen Oligonukleotide des Arrays "Kitasatospora III" sind in Tab. 30 aufgeführt, die Sonden der Nr. 1-24 wurden vom ersten Arraydesign übernommen (s. Tab. 28).

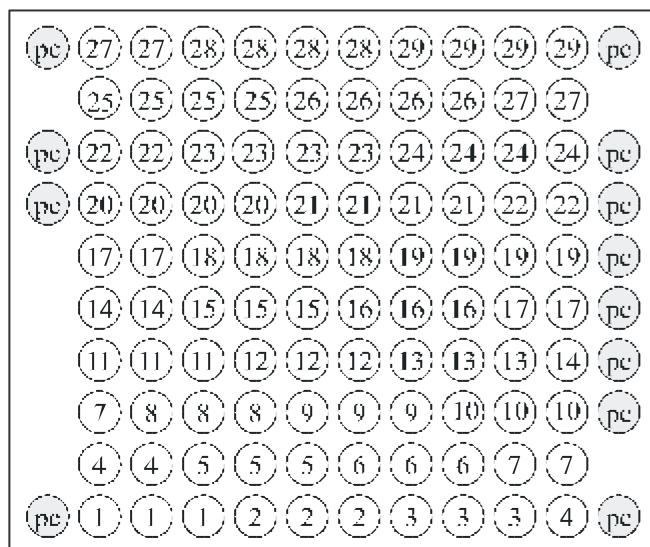
Tab. 30: Ausgewählte Oligonukleotide Microarray "Kitasatospora III"

Nummer	Sequenz der Gensonde 5'-3'	Nomenklatur
24	cgtggaacgcaggtcctgaagcgggt	" <i>K. brunnea</i> " B
25	ttcagcggggtcgggtgtgtcgggca	<i>K. mediocidica</i> B
26	cgccggaagagattctggatgcagtg	<i>K. paracochleata</i> B
27	tggaacgcggtaccgctgggtgtgcc	" <i>K. streptosporus</i> " B
34	cggcacgctcggttgatggccgccag	" <i>K. melanogena</i> " B
35	actattcggcacacacgggtgacggactgc	" <i>K. brunnea</i> " B
37	ggcacgggtcgggatcgccactagt	<i>K. cystarginea</i> B
38	gacctgccagtactccctcttctcg	" <i>K. streptosporus</i> " C
39	cagtacctggtggttcagccgggacgcg	Stamm "HKI-2291-12" B
41	gtatgggtctgtcagtactgtctctc	Stamm "HKI-2291-42" B
42	gctcatgggtggaacgttgactattc	<i>Kitasatospora</i> universal II
43	ataggtctacgtgatgtgggttga	" <i>K. nipponensis</i> I"
44	gtctgaggagcggccacgattggc	" <i>K. nipponensis</i> II"
45	gcacgttggtggtcctgagggaa	<i>Kitasatospora</i> universal III

Die physiko-chemischen Eigenschaften der Oligonukleotide (s. Anhang D) wurden abschließend ebenfalls überprüft um ihre Eignung als Gensonde festzustellen. Dabei erwiesen sie sich als geeignet.

3.5. Ergebnisse der DNA-Microarray Evaluierung

Die Abb. 11 zeigt die Anordnung der einzelnen Oligonukleotide auf dem ersten DNA-Microarray. Dabei wurden zusätzlich Biotinsonden auf den Randbereich des Arrays immobilisiert



(Spot "pc"-positive control). Diese dienen als Positiv-Kontrolle, da durch die Reaktion des Biotins mit dem zur Detektion ein-gesetzten Streptavidin/Gold-Konjugat sich an diesen Sonden immer ein Spot bildet. Des weiteren lassen sich aus der Intensität der Biotinsonden Aussagen über das Verhältnis Probenmenge zu vorhandenen Gensonden treffen.

Abb. 11. Microarray "Kitasatospora I"

Die Intensität der Spots, die auf spezifischen Gensonden entstehen, sollte die Intensität der Biotinsonden nicht überschreiten, da dies auf eine Überladung des Arrays mit der PCR-Fragmenten hindeutet, was zu falsch positiven Ergebnissen führt. Zur Erstellung einer geeigneten methodischen Vorgehensweise für das Taxonomie-DNA-Microarray wurden verschiedene Vorversuche durchgeführt. Diese Hybridisierungsexperimente mit dem ArrayTube®-Reader-System dienten der Auffindung von geeigneten Reaktionsparametern für die Untersuchungen.

Target: PCR-Fragment mit 5'-Biotinmarkierung (siehe Abschnitt 2.6.)

Länge: circa 250 bp

Exp. 1: *Kitasatospora phosalacinea*

Exp. 2 : *Kitasatospora griseola*

Exp. 3: *Kitasatospora cochleata*

Exp. 4: Gemisch aus *K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*

Volumen der Proben: Exp. 1-3: 30 µl (ca. 30 µg DNA)

Exp. 4: 3x 10 µl (ca. 3x10 µg DNA)

Hybridisierungstemperatur: 50°C

Hybridisierungsdauer: 1 h

Hybridisierungspuffer: 6xSSPE

Die Abb. 12 zeigt eine fotografische Aufnahme des DNA-Microarrays nach Experiment 1 (*K. phosalacinea*), welches wie in Kap. 2.6. beschrieben durchgeführt wurde. Die sehr stark ausgeprägten Spots zeigen, daß die prinzipiellen Versuchsparmeter mit dem Vorversuch gefunden wurden. Allerdings sind folgende Punkte zu verbessern:

1. Die Selektivität ist unzureichend, da neben den zu erwartenden Spots (s. Abb. 12 : Spot-Nr. 23 (*Kitasatospora* MWG), Spot-Nr. 25 (*Kitasatospora* universal I) und Spot-Nr. 1 und 20 (*K. phosalacinea*) sich auch eine große Zahl anderer Spots bildeten, so z.B. Spot-Nr. 10 (*K. griseola*) und Spot-Nr. 4 (*K. cystarginea*). Eine eindeutige taxonomische Zuordnung ist also noch nicht möglich, da noch zu viele Sonden positiv reagieren.
2. Die Intensität der universellen Biotinsonden (Spot: "pc"-positive control) des DNA-Microarrays ist deutlich geringer als die Intensität der spezifischen Gensonden des Arrays. Dies deutet auf eine Überladung des Arrays mit Probenmaterial hin.

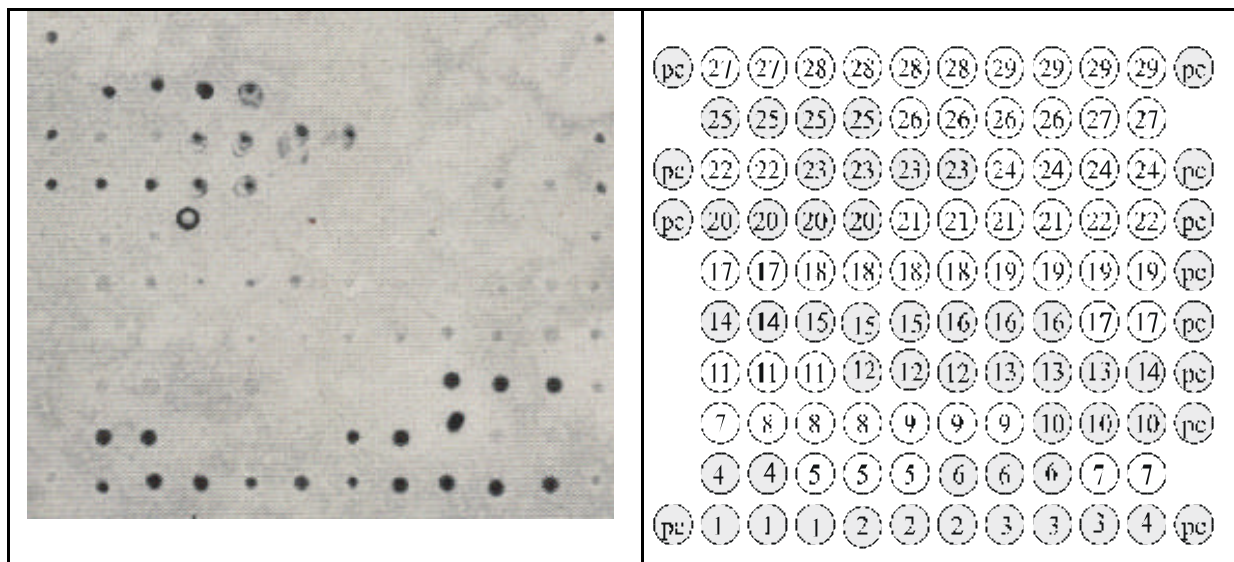


Abb. 12: Microarray "Kitasatospora I", Exp. 1: *K. phosalacinea*, 30 µg, 50°C

Die Experimente 2 (*K. griseola*) und 3 (*K. cochleata*) ergaben ähnliche Ergebnisse. Auch hier zeigte sich eine unzureichende Selektivität und eine zu hohe Intensität der spezifischen Gensonden im Vergleich zu den Biotinsonden (Daten nicht angegeben). Das Experiment 4 (Gemisch der Spezies) zeigte ein differenzierteres Bild, mit einer deutlich geringeren Intensität der Spots der spezifischen Gensonden im Vergleich zu den Biotinsonden. Dies deutet auf ein günstigeres Probenmenge/Gensonden Verhältnis hin, und läßt sich durch den Einsatz von nur 10 µg Proben-DNA erklären. Des weiteren war die Kreuzreaktivität der spezifischen Gensonden auf dem Array zwar immer noch so hoch, daß zu viele falsch positive Hybridisierungssignale erschienen, jedoch war die Intensität der Spots der spezifischen Gensonden, die den tatsächlich auf das Array gegebenen Proben entsprechen, sehr hoch. Daher wurde in den folgenden Versuchen wie folgt vorgegangen:

1. Schrittweise Absenkung der eingesetzten Probenmengen, um eine Überladung des DNA-Microarrays zu vermeiden und damit unspezifische Hybridisierungen zu verhindern.
2. Schrittweise Erhöhung der Hybridisierungstemperatur, um die Stringenz des Systems zu erhöhen. Durch die Erhöhung der Temperatur können PCR-Fragmente mit Fehlpaarungen ("Mismatch") in der Zielsequenz schlechter an die spezifischen Gensonden binden, da sie durch die resultierende Erhöhung der freien Hybridisierungsenergie stärker von der Gensonde dissoziieren als PCR-Fragmente mit übereinstimmender Zielsequenz ("Perfect Match").

Dazu wurden folgende Parameter zum Vorversuch verändert:

Exp. 5: *Kitasatospora phosalacinea*, Exp. 6: *Kitasatospora griseola*, Exp. 7: *Kitasatospora cochleata*, Exp. 8: Gemisch aus *K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*

Vol. der Proben: Exp. 5-7: 1 μ l (1 μ g DNA), Exp. 8: 3x 1 μ l (3x1 μ gDNA), Hybridisierungstemperatur: 55°C

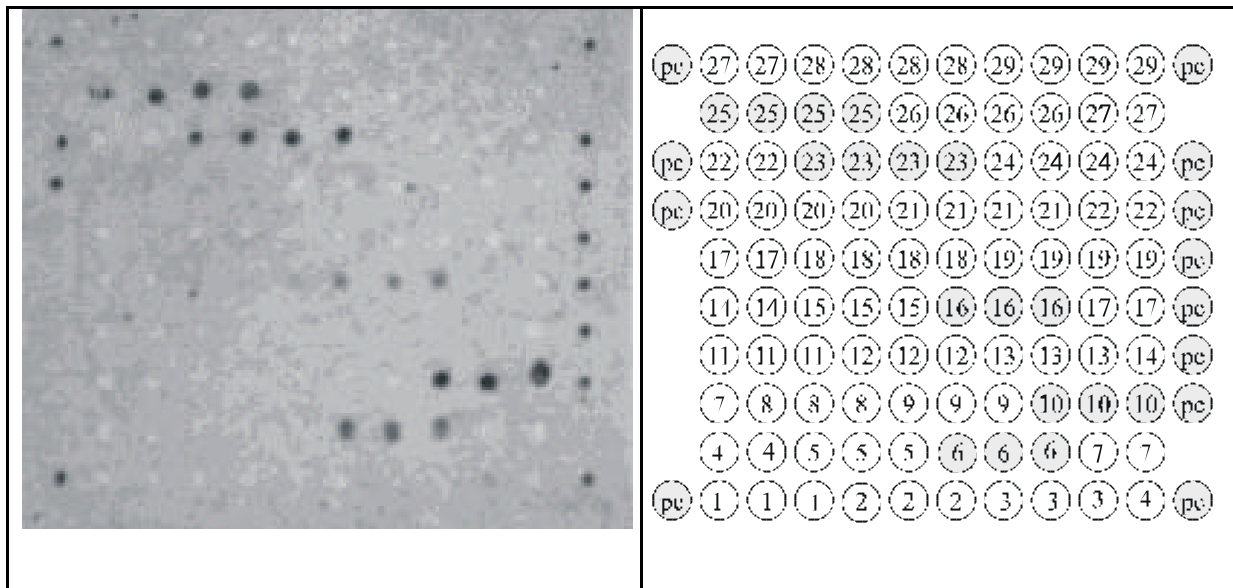


Abb. 13: Microarray "Kitasatospora I", Exp. 6: *K. griseola*, 1 μ g, 55°C

Abb. 13 zeigt die photographische Aufnahme des Hybridisierungsexperiments mit 1 μ g einer *K. griseola* Probe bei einer Hybridisierungstemperatur von 55°C (Exp. 6). Es ist zu erkennen, daß die Verringerung der Probenmenge und die Erhöhung der Temperatur in einer deutlich reduzierten Zahl an falsch-positiven Spots resultiert. Positive Hybridisierungssignale zeigten nur die Gensonden *Kitasatospora* universal I / *Kitasatospora* MWG (Spot-Nr. 23/25), die beiden spezies-spezifischen *K. griseola* Gensonden (Spot-Nr. 10/16) sowie die "*K. melanogena*"-Gensonde (Spot-Nr. 6). Die Zahl der falsch positiven Ergebnisse ist stark verringert. Dies ergaben auch die drei anderen untersuchten Proben mit verringerter Probenmenge und erhöhter Temperatur (Exp. 5, 7 und 8). Die Anzahl der Spots verringerte sich erheblich, und die Zahl von falsch positiven Hybridisierungsergebnissen sank (Daten nicht angegeben). Daraufhin wurden folgende Parameter verändert:

Exp. 9: *Kitasatospora phosalacinea*, Exp. 10: *Kitasatospora griseola*, Exp. 11: *Kitasatospora cochleata*, Exp. 12: Gemisch aus *K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*

Hybridisierungstemperatur: 60°C

Die Abb. 14 zeigt eine photographische Aufnahme des Hybridisierungsexperiments mit 1 μ g einer *K. griseola* Probe bei einer Hybridisierungstemperatur von 60°C (Exp. 10). Deutlich positive Hybridisierungssignale zeigten nur die Gensonden *Kitasatospora* universal I / *Kitasatospora* MWG (Spot-Nr. 23/25) und die beiden *K. griseola* Gensonden (Spot-Nr. 10/16). Die im Experiment 6 (*K. griseola*, 55°C, 1 μ g) noch stark positive "*K. melanogena*" Gensonde (Spot-Nr. 6) zeigte nur noch ein sehr schwaches Hybridisierungssignal.

Die weitere Erhöhung der Temperatur resultierte wieder in einer Reduzierung der Signalstärke der falsch-positiven Signale.

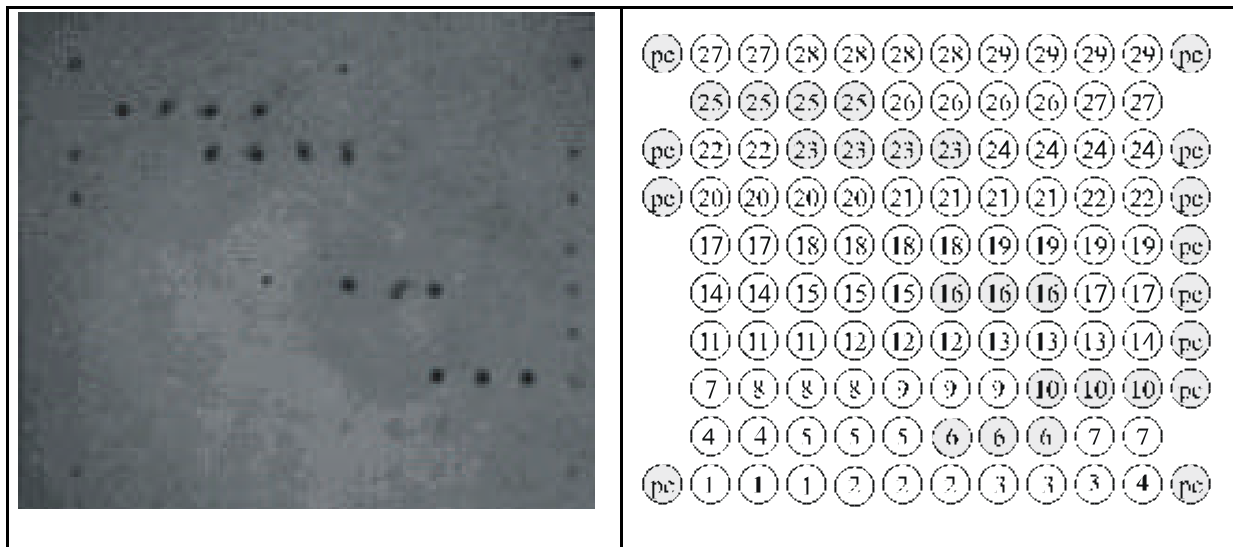


Abb. 14: Microarray "Kitasatospora I", Exp. 10: *K. griseola*, 1 µg, 60°C

Auch in den Versuchen 9, 11 und 12 zeigte sich nach der Erhöhung der Hybridisierungstemperatur auf 60°C eine deutliche Verringerung der Signalstärke der falsch-positiven Hybridisierungsergebnisse. Daher wurde erneut die Hybridisierungstemperatur gesteigert und folgende Parameter zum Vorversuch verändert:

Exp. 13: *Kitasatospora phosalacinea*, Exp. 14: *Kitasatospora griseola*, Exp. 15: *Kitasatospora cochleata*, Exp. 16: Gemisch aus *K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*
Hybridisierungstemperatur: 65°C

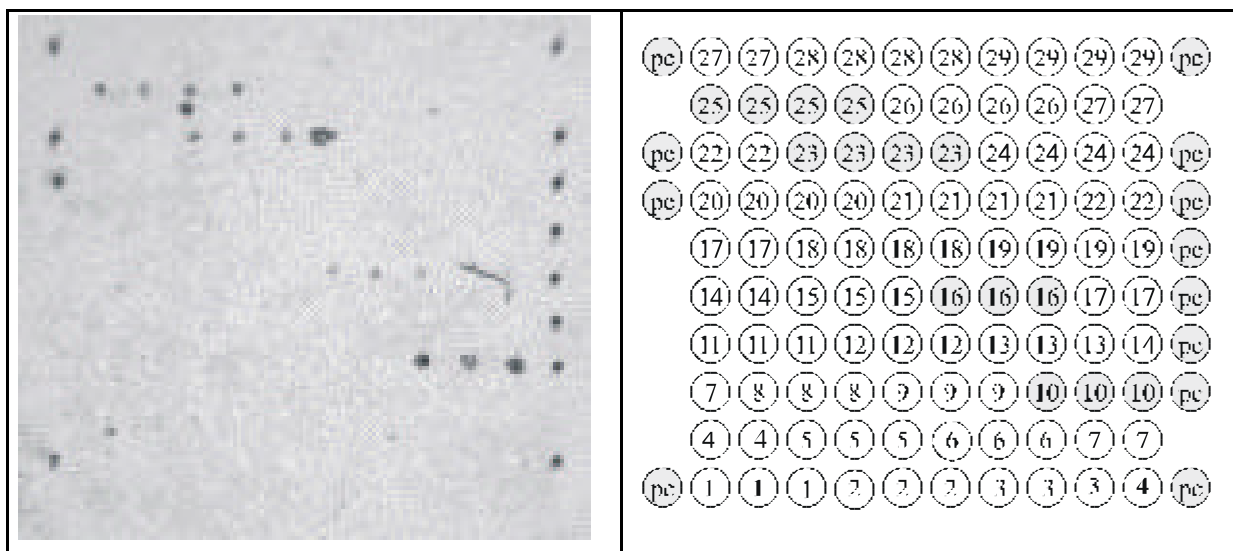


Abb. 15: Microarray "Kitasatospora I", Exp. 10: *K. griseola*, 1 µg, 65°C

Im Experiment 10 (Abb. 15) zeigte sich eine Verminderung der Signalstärke aller Gensonden, bedingt durch die hohe Temperatur von 65°C. Allerdings konnten alle falsch-positiven Signale verhindert werden.

Nur die *Kitasatospora* universal I / *Kitasatospora* MWG (Spot-Nr. 23/25) Gensonden und die beiden spezies-spezifischen *K. griseola* Gensonden (Spot-Nr. 10/16) zeigten positive Hybridisierungssignale. Keine andere Gensonde war positiv. Das bedeutet, daß bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C das DNA-Microarray streng spezifisch auf die zu untersuchende Probe reagiert.

Dies verdeutlicht auch die Abb. 16 die das Experiment 16 (Gemisch der drei Spezies) zeigt. Stark positive Hybridisierungssignale ergaben nur die Gensonden *Kitasatospora* universal I / *Kitasatospora* MWG (Spot-Nr. 23/25), die beiden spezies-spezifischen *K. griseola* Gensonden (Spot-Nr. 10/16), die beiden spezies-spezifischen *K. phosalacinea* Gensonden (Spot-Nr. 1/20) und die beiden spezies-spezifischen *K. cochleata* Gensonden (Spot-Nr. 3/14) sowie die Sonde Nr. 19 (s. Kap. 3.6.4.). Alle weiteren Experimente mit PCR-Produkten aus Reinkulturen wurden daher, soweit nicht anders angegeben, bei einer Hybridisierungstemperatur von 65°C sowie einer Probemenge von 1 µl durchgeführt. Dies entspricht laut unseren spektroskopischen Messungen etwa einer DNA-Menge von 1 µg.

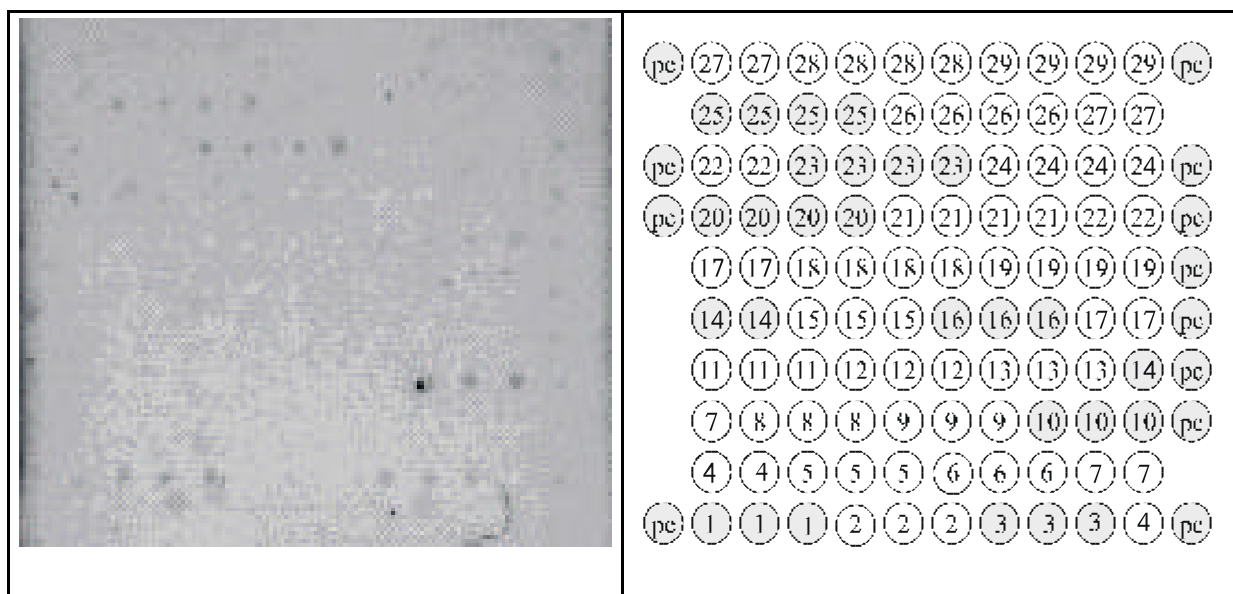


Abb. 16: Microarray "*Kitasatospora* I", Exp. 16: Gemisch *K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*, 1 µg, 65°C

Bei der grundsätzlichen Parametereinstellung wurde auch die Eignung von Oligonukleotid-Gensonden verschiedener Hersteller überprüft. Die identischen Gensonden verschiedener Hersteller *Kitasatospora* I (JenaBioscience, Jena) und *Kitasatospora* MWG (MWG Biotech, Ebersberg) unterschieden sich jedoch nicht in ihren Hybridisierungseigenschaften. Im weiteren Text werden sie deshalb als "*Kitasatospora* universal I" bezeichnet.

3.6. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "*Kitasatospora I*"

Zum Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden wurden Experimente mit 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten (250 bp) durchgeführt. Die Amplifizierung der PCR-Fragmente erfolgte mit der Template-DNA, die aus Reinkulturen der entsprechenden *Kitasatospora*-Spezies isoliert worden war. Die Isolierung der DNA erfolgte wie in Kap. 2.4. und 2.6. beschrieben. Die Eignung der Gensonden für den Nachweis von *K. griseola* wurde bereits in Kap. 3.5. beschrieben. Die Hybridisierungsbedingungen wurden wie in Kap. 3.5. eingestellt (1 µg, 65°C).

3.6.1. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. azatica*

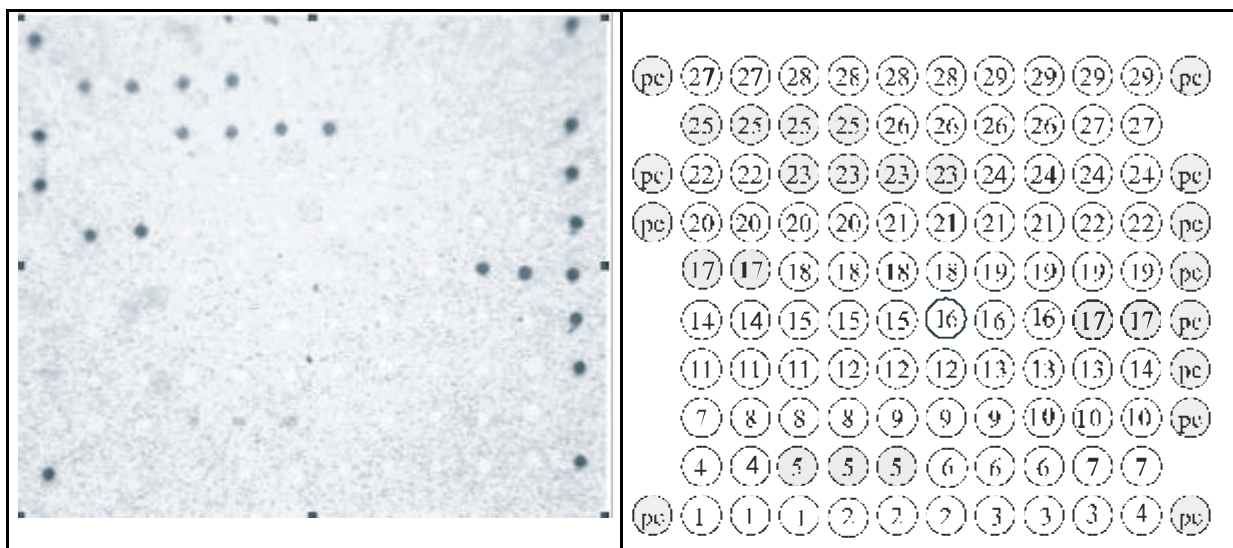


Abb. 17: Microarray "*Kitasatospora I*", *K. azatica*, 1 µg, 65°

Die Abb. 17 zeigt das Ergebnis des Hybridisierungsexperiments mit aus *K. azatica* amplifizierten PCR-Fragmenten. Deutlich positive Signale zeigten die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 5 und 17, welche *K. azatica* / *kifunensis* I und II entsprechen. Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden Nr. 25 und 23 (*Kitasatospora* universal I) deutlich positiv. Falsch-positive Signale sind nicht auf dem Microarray zu erkennen.

3.6.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. setae*

Wie in Abb. 18 ersichtlich, zeigte das Hybridisierungsexperiment mit PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. setae* deutlich positive Signale bei den spezies-spezifischen Gensonden Nr. 2 (*K. setae* I) und Nr. 21 (*K. setae* II). Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Gensonden Nr. 25 und 23 (*Kitasatospora* universal I). Falsch-positive Signale waren nicht zu erkennen.

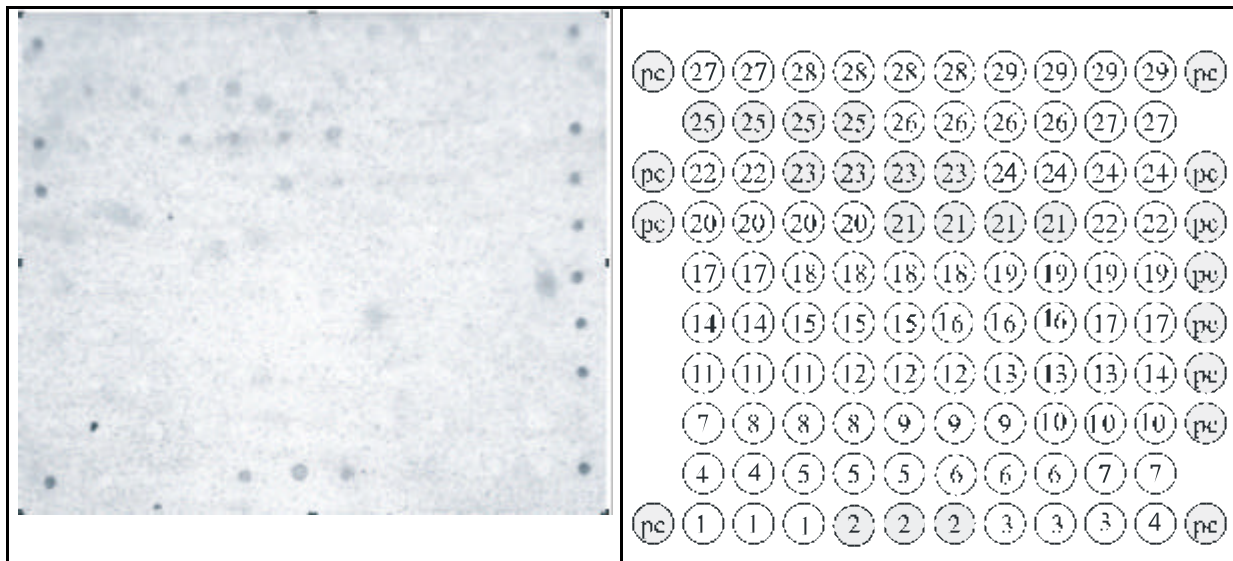


Abb. 18: Microarray "*Kitasatospora* I", *K. setae*, 1 µg, 65°C

3.6.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. phosalacinea*

Deutlich positive Signale ergaben die beiden spezies-spezifischen Gensonden Nr. 1 (*K. phosalacinea* I) und Nr. 20 (*K. phosalacinea* II). Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden Nr. 25 und Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I).

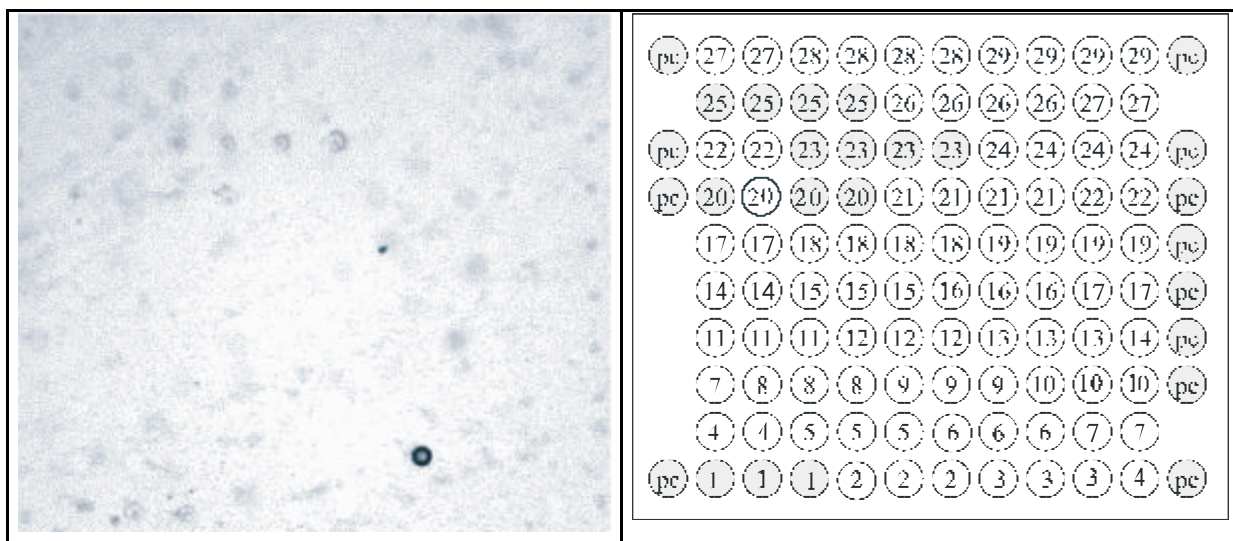


Abb. 19: Microarray "*Kitasatospora* I", *K. phosalacinea*, 1 µg, 65°C

3.6.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. cochleata*

Abb. 20 zeigt ein Hybridisierungsexperiment mit mit *K. cochleata*. Positive Signale sind nur bei der spezies-spezifischen Gensonde Nr. 3 (*K. cochleata* I) zu erkennen. Die zweite spezies-spezifische Gensonde Nr. 14 (*K. cochleata* II) reagierte erst bei einer zugegebenen Menge von 5 µg PCR-Fragment (s. Abb. 20). Dies führte jedoch auch zu einem falsch positiven Signal für *K. paracochleata* (Nr. 19). Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden Nr. 23/25.

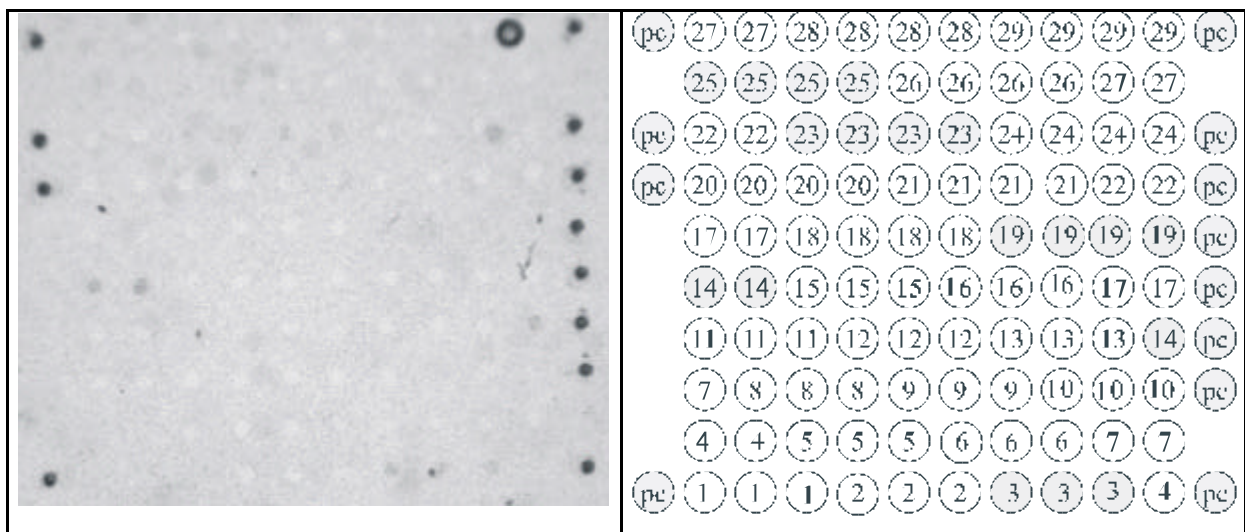


Abb. 20: Microarray "*Kitasatospora* I", *K. cochleata*, 5 µg, 65°C

Daher wurde das Experiment bei einer Hybridisierungstemperatur von 68°C unter sonst identischen Bedingungen wiederholt. Wie Abb. 21 zeigt, konnte dadurch das falsch positive Signal der Gensonde Nr.19 verhindert werden.

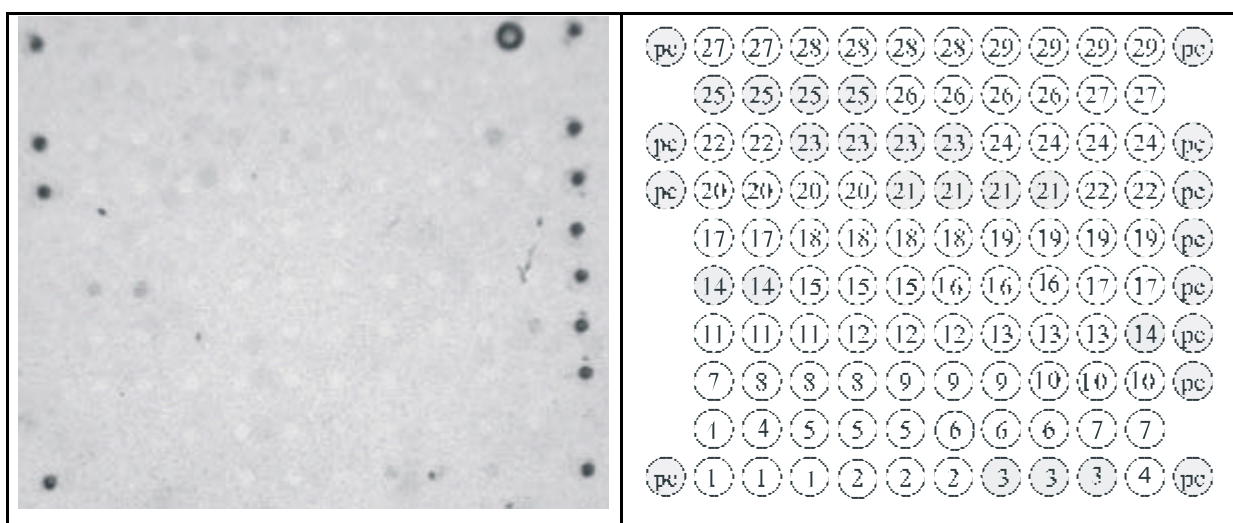


Abb. 21: Microarray "*Kitasatospora* I", *K. cochleata*, 5 µg, 68°C

3.6.5. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. mediocidica* und *K. cystarginea*

Für die beiden Stämme wurden Hybridisierungsexperimente mit PCR-Fragmenten durchgeführt. Bei beiden Versuchen waren deutlich positive Signale nur bei jeweils einer der spezies-spezifischen Gensonden (Nr. 18, *K. mediocidica* II, s. Abb. 22 bzw. Nr. 4, *K. cystarginea*, Daten nicht dargestellt) zu erkennen. Die anderen spezies-spezifischen Gensonden (Nr. 8, *K. mediocidica*, bzw. Nr 15. *K. cystarginea*) reagierten erst bei einer zugegebenen Menge von 5 µg PCR-Fragment. Dies führte jedoch zu falsch positiven Signalen. Eine Erhöhung der Hybridisierungstemperatur brachte hier keine Verbesserung der Spezifität der Sonden. Daraufhin wurden die nicht funktionierenden spezies-spezifischen Gensonden Nr. 8 (*K. mediocidica*) sowie Nr. 15 (*K. cystarginea*) modifiziert und in veränderter Sequenz auf das Arraydesign *Kitasatospora* III gespottet (Kap.3.7.).

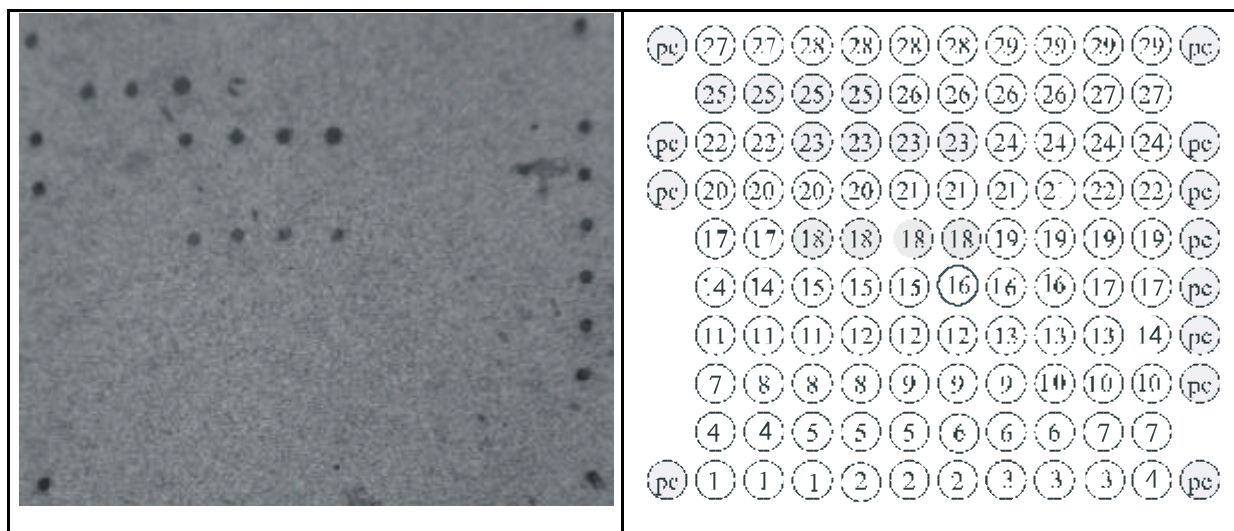
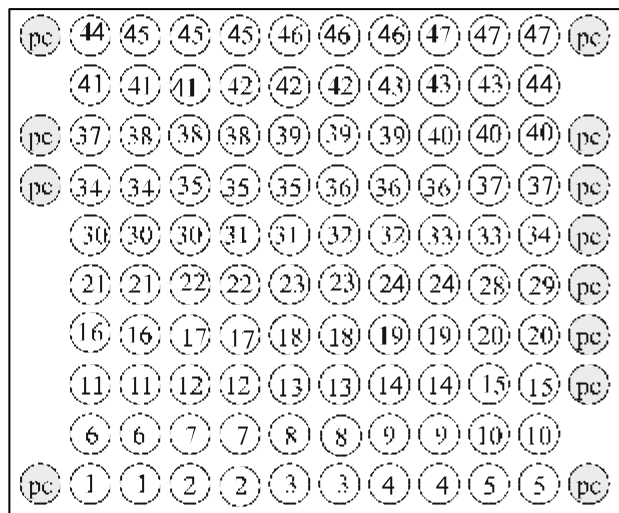


Abb. 22: Microarray "*Kitasatospora* I", *K. mediocidica*, 1 µg, 65°C

3.7. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "*Kitasatospora* II"

Im Laufe dieser Arbeit wurde ein zweites Microarraydesign erstellt. Die dazu verwendeten Gensonden wurden wie in Kap. 3.4.2. beschrieben gewählt. Außerdem wurden einige in der Literatur beschriebene gattungsspezifische Gensonden zusätzlich aufgenommen (s. Abb 25). Zum Test der Hybridisierungsfähigkeiten einiger neuer spezies-spezifischer sowie gattungsspezifischer Gensonden wurden Experimente mit 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten (1000 bp, Primer II SGS I 5'bio large, s. Kap. 2.7.1.), die aus Reinkulturen amplifiziert wurden, durchgeführt.

Dazu wurden auch einige schon untersuchte Gensonden erneut getestet, um Unterschiede in den Hybridisierungssignalen bei PCR-Fragmenten der Größe 300 bp bzw. 1000 bp



festzustellen. Die Amplifikation der PCR-Fragmente nach Isolierung von DNA aus den Reinkulturen erfolgte wie in den Kap. 2.5. und 2.6. beschrieben. Die Hybridisierungstemperatur wurde aufgrund der Ergebnisse der Vorversuche bei 65°C gehalten. Die eingesetzte Menge PCR-Produkt lag bei 1-10 µg.

Abb. 25: Microarray "Kitasatospora II"

3.7.1. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. azatica*

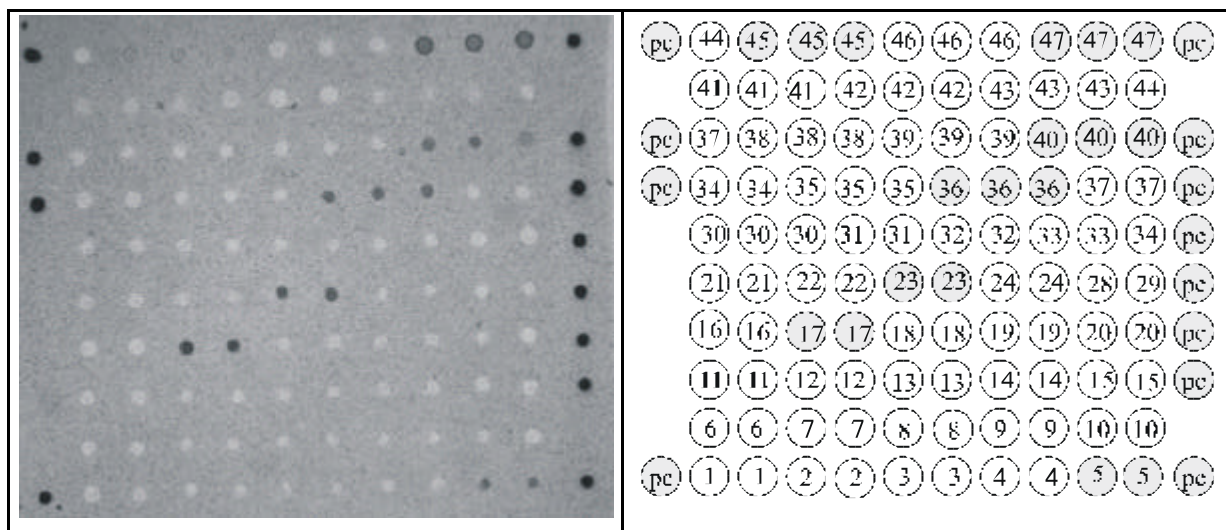


Abb. 23: Microarray "Kitasatospora II", *K. azatica*, 1 µg, 65°C

Die Abb. 23 zeigt das Ergebnis des Hybridisierungsexperiments mit dem verlängerten 5'-biotinylierten PCR-Fragment (1000bp), amplifiziert aus *K. azatica*. Ein positives Signal zeigten die spezie-spezifischen Gensonden der Nr. 5 und Nr. 17, die *K. azatica/kifunensis* I und II entsprechen. Weiterhin reagierte die gattung-spezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I).

3.7.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. medicidica*

Das Hybridisierungsexperiment mit größeren PCR-Fragmenten (1000 bp) von *K. medicidica* zeigte positive Signale bei der spezies-spezifischen Gensonde Nr. 18 (*K. medicidica* I), sowie der gattungsspezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I) und anderen der gattungsspezifischen Sonden (s. Kap 3.11.1). Die Verlängerung des PCR Fragments auf 1000 bp hat also keinen negativen Einfluss auf Hybridisierungsspezifität und Signalstärke.

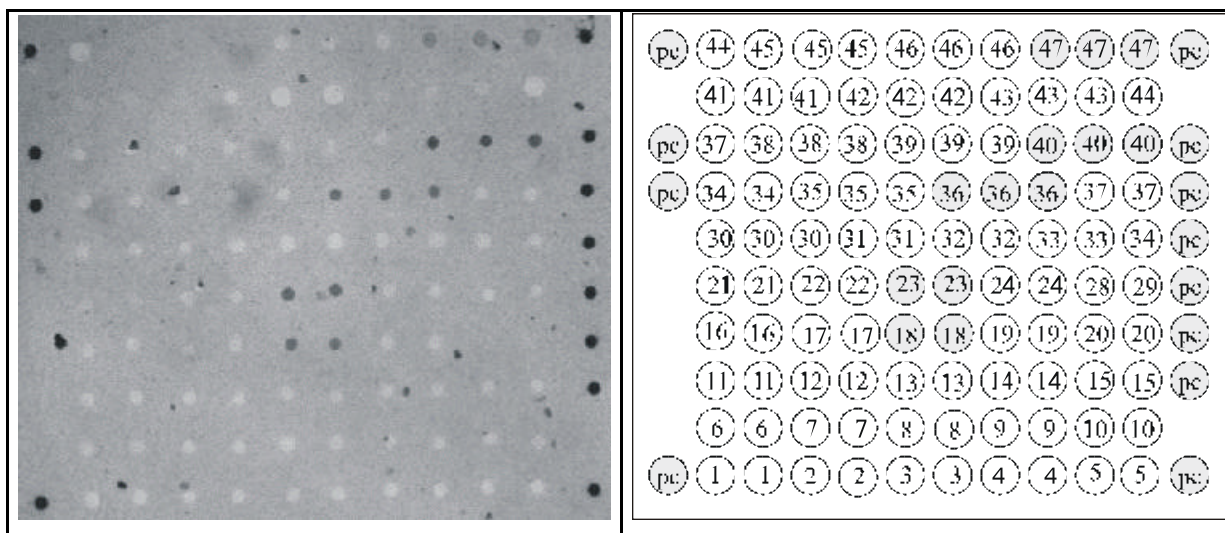


Abb. 24: Microarray "*Kitasatospora* II", *K. medicidica*, 1 µg, 65°C

3.7.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. putterlickiae*

Das Hybridisierungsexperiment mit PCR-Fragmenten (1000 bp), amplifiziert aus *K. putterlickiae* zeigte positive Signale bei der spezies-spezifischen Gensonde Nr. 36 (*K. putterlickiae* - nur eine Gensonde vorhanden). Weiterhin reagierten die gattungsspezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora* uni. I). und andere gattungsspezifische Sonden..

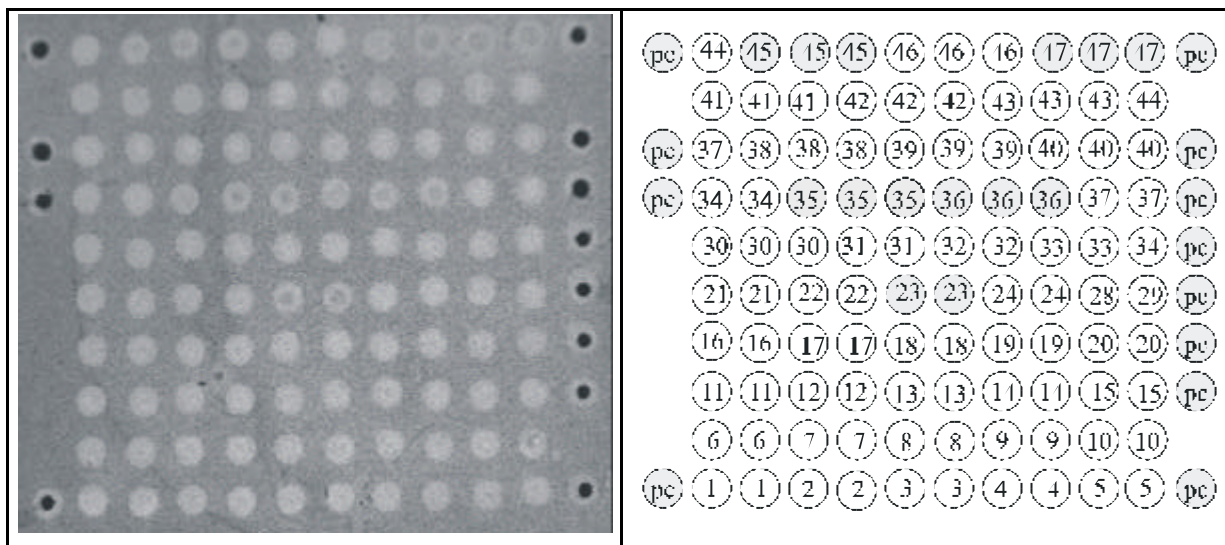


Abb. 25: Microarray "*Kitasatospora* II", *K. putterlickiae*, 1 µg, 65°C

3.7.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten amplifiziert aus *K. gansuanensis*

Das Hybridisierungsexperiment mit aus *K. gansuanensis* amplifizierten PCR-Fragmenten ergab positive Signale bei der spezies-spezifischen Gensonde Nr. 32 (*K. gansuanensis* - nur eine Gensonde vorhanden). Weiterhin reagierten die gattungsspezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I) und einige der gattungsspezifischen Sonden (s. Kap 3.11.1). Als deutliches Nebensignal war allerdings auch die spezies-spezifische Gensonde Nr. 10 (*K. griseola* I) zu erkennen (Daten nicht gezeigt).

3.8. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit PCR-Fragmenten aus Bodenisolaten und Bodenproben auf dem Microarray "Kitasatospora II"

3.8.1 Hybridisierung von PCR-Fragmenten von *Kitasatospora* Stamm "HKI-2122-22"

Der *Kitasatospora* Stamm "HKI-2122-22" wurde aus einer Bodenprobe isoliert. Genauere morphologische, chemotaxonomische und physiologische Untersuchungen zeigten, daß der Stamm der Spezies *Kitasatospora kifunensis* zugehörig ist [101].

Der Stamm "HKI-2122-22" unterscheidet sich jedoch in seiner 16S-23S rDNA-Sequenz deutlich von der Spezies *K. kifunensis*. Ziel des Versuches war die Klärung der Frage, ob Stämme auf der Intraspezies-Ebene unterschieden werden können, also die Untersuchung ob ein Stamm der sich vom Typstamm der Spezies deutlich unterscheidet, auch innerhalb einer Spezies detektierbar ist.

Wie in Abb. 26 ersichtlich, war sowohl eine Zuordnung zum Typstamm *K. kifunensis* als auch eine Zuordnung zum Isolat "HKI-2122-22" möglich. Positive Signale zeigten die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 5 (*K. azatica*/*K. kifunensis* I), und Nr. 17 (*K. azatica*/*K. kifunensis* II). Das stärkste Signal zeigte die "stamm-spezifische" Gensonde Nr. 33 (Stamm "HKI-2122-22"). Weiterhin reagierten die gattungsspezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I) und einige der anderen gattungsspezifischen Sonden (s. Kap 3.11.1).

Der Stamm "HKI-2122-22" konnte anhand des stärksten Signals eindeutig identifiziert werden. Gleichzeitig war die Einordnung des Stammes innerhalb der Spezies *K. kifunensis* möglich. Die Spezifität des Sondendesigns reicht demnach bis in die Intraspezies-Ebene.

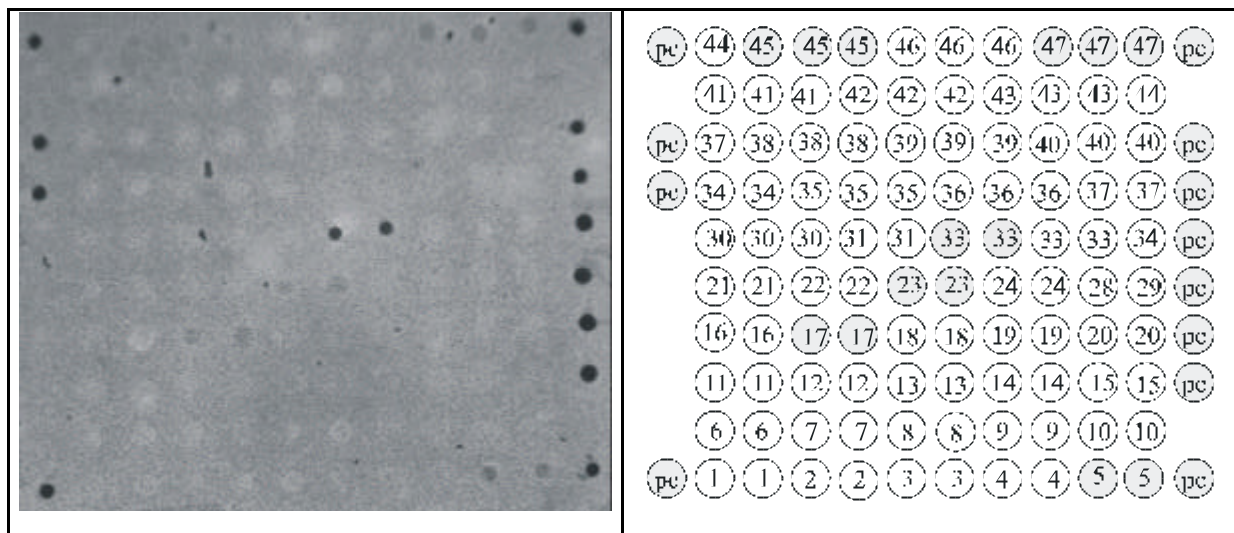


Abb. 26: Microarray "*Kitasatospora II*", Stamm "HKI-2122-22", 1 µg, 65°C

3.8.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus Bodenisolat "J07"

Zum Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden bei Verwendung von Bodenisolaten, die einer bestimmten Spezies zugeordnet werden konnten, wurde ein weiterer Stamm getestet.

Dies diente der Klärung der Frage, ob Isolate, die nicht aus Stammsammlungen bereitgestellt wurden, und sich in ihrer ITS-Sequenz deshalb wahrscheinlich von den Typstämmen unterscheiden, trotzdem ein genügend starkes Signal auslösen. Damit wäre die Spezifität des Arrays nicht zu hoch. Dazu wurde das Bodenisolat "J07" (FSU Jena, Professur für Mikrobielle Phytopathologie) ausgewählt, daß aufgrund seiner morphologischen, chemotaxonomischen und physiologischen Merkmale der Gattung *Kitasatospora* zugerechnet werden konnte.

Die Sequenzierung der 16S rDNA und der 16S-23S rDNA-Region ergab eine hohe Übereinstimmung mit der Spezies *Kitasatospora mediocidica*. Allerdings war keine 100% -ige Übereinstimmung der 16S-23S rDNA-Sequenz vorhanden.

Die Abb. 27 zeigt ein Hybridisierungsexperiment, das mit dem Bodenisolat "J07" durchgeführt wurde. Positive Signale zeigte die spezies-spezifische Gensonde Nr. 18 (*K. mediocidica* I). Weiterhin reagierten die gattungsspezifische Sonde Nr. 23 (*Kitasatospora universal* I) und einige der anderen gattungsspezifischen Sonden. Die Zuordnung des Isolates zur Spezies *Kitasatospora mediocidica* konnte also bestätigt werden. Die Gensonden detektieren somit auch Stämme, die nicht zur Gewinnung der Sequenzinformation genutzt wurden, was bedeutet daß kleinere Sequenzvariationen nicht sofort zu einem Funktionsverlust der Gensonden führen.

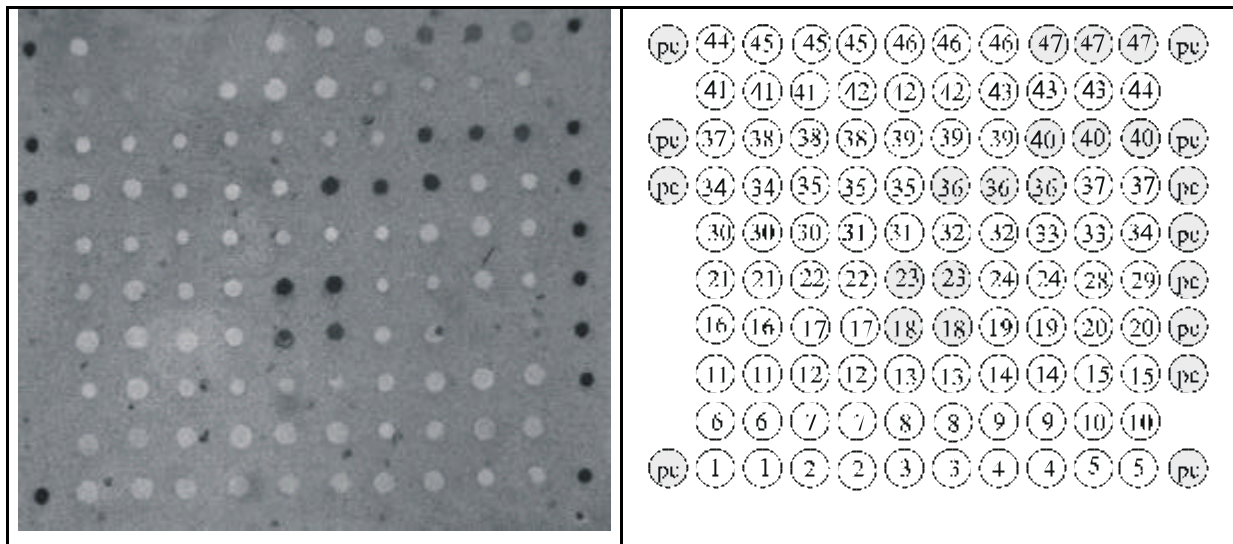


Abb. 27: Microarray "*Kitasatospora II*", Bodenisolat "J07" 1 µg, 65°C

3.8.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus inokulierten Bodenproben

Zur Evaluierung der Isolierungsmethode für DNA aus Bodenproben mit dem Ultra Clean Soil Kit® (MoBio, USA) wurden Hybridisierungsexperimente mit PCR-Fragmenten durchgeführt, die aus DNA amplifiziert wurden, die direkt aus inokulierten Bodenproben gewonnen worden waren. Die untersuchten Spezies waren *K. azatica* (s. Abb. 28) und *K. mediocidica*, die in sterilem Mischwaldboden (hitzeesterilisiert, 200 °C, 3 h) inokuliert wurden. Bei beiden untersuchten inokulierten Bodenproben zeigten sich identische Hybridisierungsmuster im Vergleich zu ihren Reinkulturen. Das genutzte Ultra Clean Soil Kit® war nach einigen Modifikationen zur Isolierung der Actinomyceten-DNA in PCR-tauglicher Reinheit geeignet. Drei zusätzliche Waschschrte mit der Solution 4 des Ultra Clean Soil Kit®, sowie eine Behandlung mit Lysozym (109000 U/mg) vor Beginn der Lyse (37°C, 1h) wurden eingeführt.

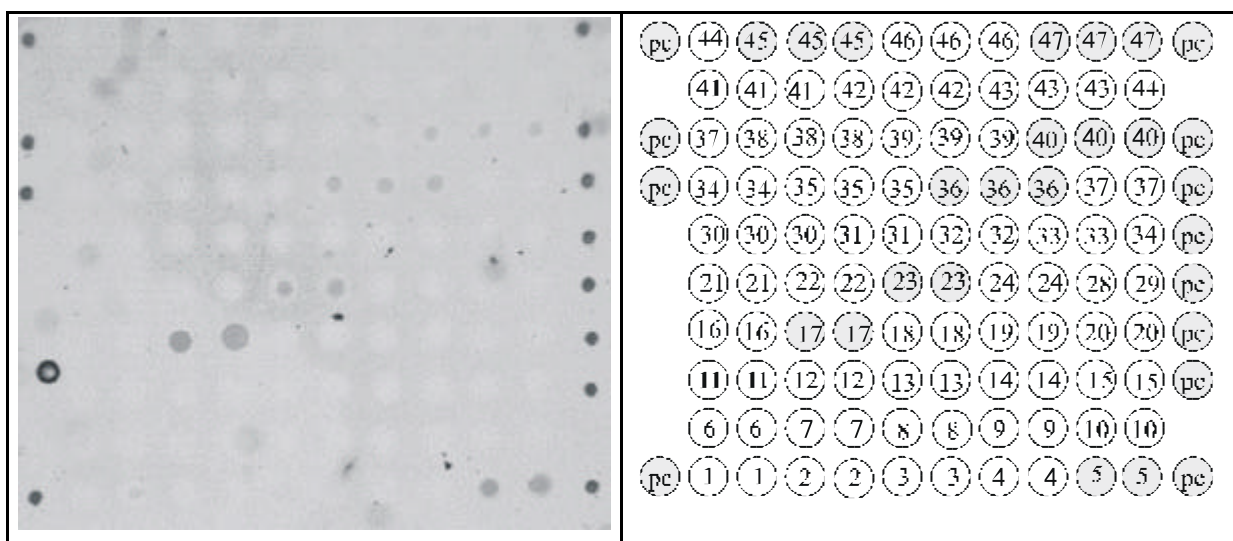


Abb. 28: Microarray "*Kitasatospora II*", inokulierte Bodenprobe, *K. azatica*, 1 µg, 65°C

3.8.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus nativen Bodenproben

Nach Evaluierung der Isolierungsmethode für DNA aus Bodenproben mit dem Ultra Clean Soil Kit® wurden Hybridisierungsexperimente mit PCR-Fragmenten durchgeführt, die aus DNA amplifiziert wurden, welche direkt aus nativen Bodenproben gewonnen worden war.

Diese Experimente dienten der Untersuchung der Möglichkeit des direkten Nachweises von *Kitasatospora* Spezies in nativen Bodenproben. Dazu wurde die Bodenprobe genutzt, aus welcher der Stamm "J07" (s. Kap. 3.8.) isoliert worden war, der als *K. mediocidica* identifiziert werden konnte (Probe „Wald/LG/Jena/*K. mediocidica*).

Die Abb. 29 zeigt das Hybridisierungsexperiment der nativen Bodenprobe. Ein schwach positives Signal zeigte die spezies-spezifische Gensonde Nr. 18 (*K. mediocidica* I) Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden Nr. 23 (*Kitasatospora* universal I) und einige der anderen gattungsspezifischen Sonden. Daneben reagierte die spezies-spezifische Sonde Nr. 21 (*K. setae* I). Der Stamm "J07" konnte also direkt in der nativen Bodenprobe ohne vorhergehende Isolierung und Anzucht nachgewiesen werden.

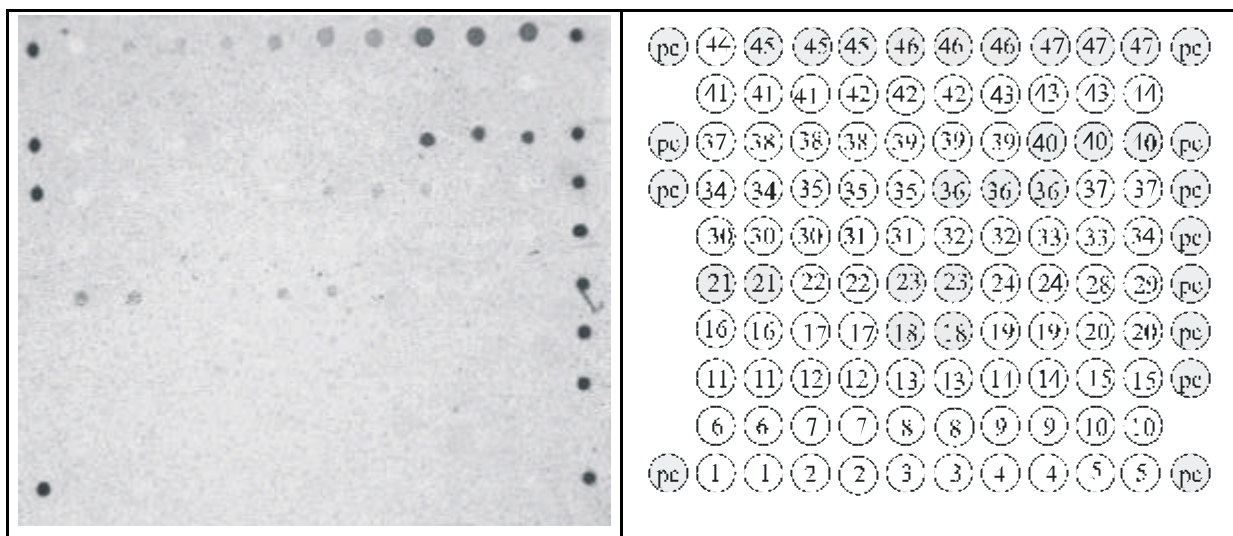
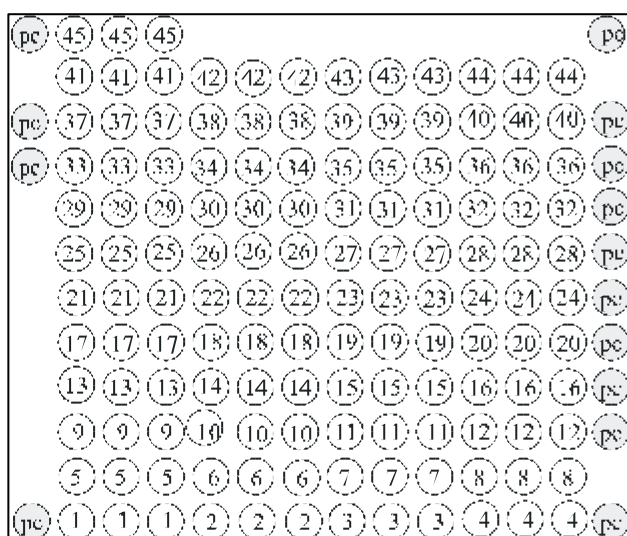


Abb. 29: Microarray "*Kitasatospora* II", Bodenprobe "Wald/ LG/Jena/"*K. mediocidica*", 30 µg, 65°C

3.9. Test des Hybridisierungsverhaltens der spezies-spezifischen Gensonden mit dem DNA-Microarray "*Kitasatospora III*"

Das dritte Microarraydesign diente der Überprüfung der neu erstellten spezies-spezifischen Gensonden (s.Abb. 30), die anstelle nicht funktionierender Sonden auf das Array aufgenommen worden waren. Außerdem wurden einige neue spezies-spezifische Gensonden generiert. Zum Test der Hybridisierungsfähigkeiten einiger der neuen spezies-spezifischen



sowie gattungsspezifischen Gensonden wurden Experimente mit 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten durchgeführt die aus Reinkulturen amplifiziert wurden. Die Hybridisierungstemperatur wurde nach den Ergebnissen der Vorversuche auf 65°C eingestellt. Die eingesetzte Menge PCR-Produkt lag bei 1-25 µg.

Abb. 30: Microarray "*Kitasatospora III*"

3.9.1. Hybridisierung von PCR Fragmenten aus Reinkulturen von *K. mediocidica* und *K. cystarginea*

Mit beiden Spezies wurden bereits Hybridisierungsexperimente mit dem DNA-Microarray "*Kitasatospora I*" durchgeführt. Deutlich positive Signale waren nur bei jeweils einer der spezies-spezifischen Gensonden (Nr. 18, *K. mediocidica* II,) bzw. (Nr. 4, *K. cystarginea* (Daten nicht dargestellt)) zu erkennen. Die zweite spezies-spezifische Gensonde (Nr. 8, *K. mediocidica*, bzw. Nr. 15. *K. cystarginea*) beider Stämme reagierte schlecht. Deshalb wurden die nicht funktionierenden spezies-spezifischen Sonden Nr. 8 (*K. mediocidica*) sowie Nr. 15 (*K. cystarginea*) modifiziert und in veränderter Sequenz auf das Microarraydesign "*Kitasatospora III*" gespottet.

Dabei wurde die ursprüngliche Gensondensequenz auf der DNA in 5'- Richtung "verschoben" um ihre Hybridisierungsfähigkeiten zu verbessern. Die Abb. 31 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung von *K. cystarginea*. Es sind positive Signale für die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 4, 15 und 37 sowie bei den gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 42, 45, 33 und 36) zu erkennen.

Bei *K. mediocidica* zeigte sich ein ähnliches Bild. Wie in Abb. 32 ersichtlich, reagierten die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 18 und Nr. 25 sowie die gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 42, 45, 33). Die Sonde Nr. 25 ist die in 5'-Richtung um 5 bp verschobene Sonde Nr. 8. Die Hybridisierungsfähigkeiten wurden also durch die Veränderung entscheidend verbessert.

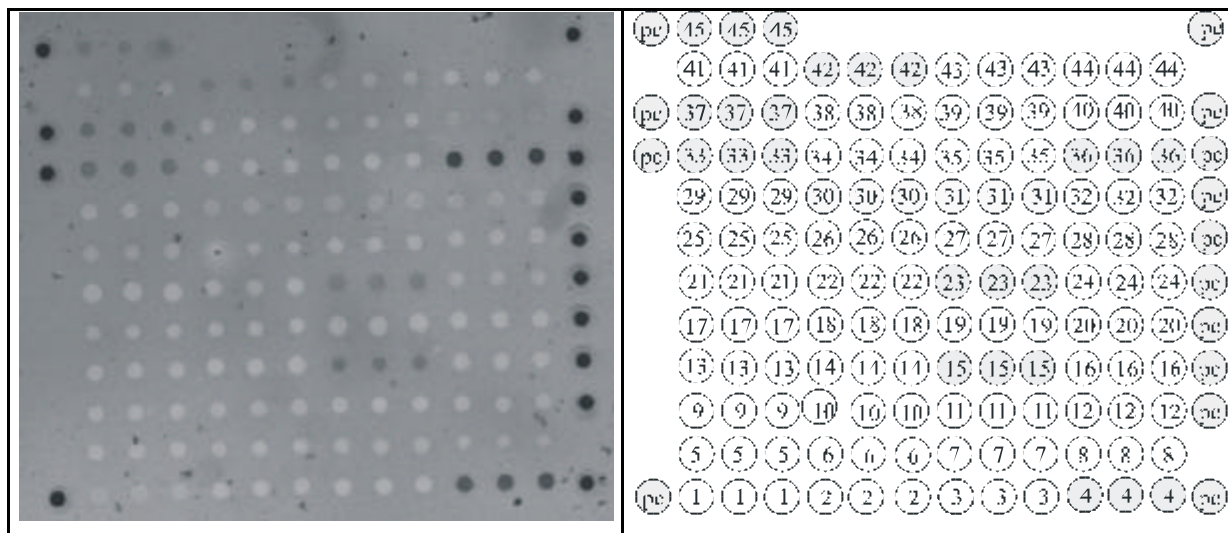


Abb. 31: Microarray "*Kitasatospora III*", *K. cystarginea*, 1 µg, 65°C

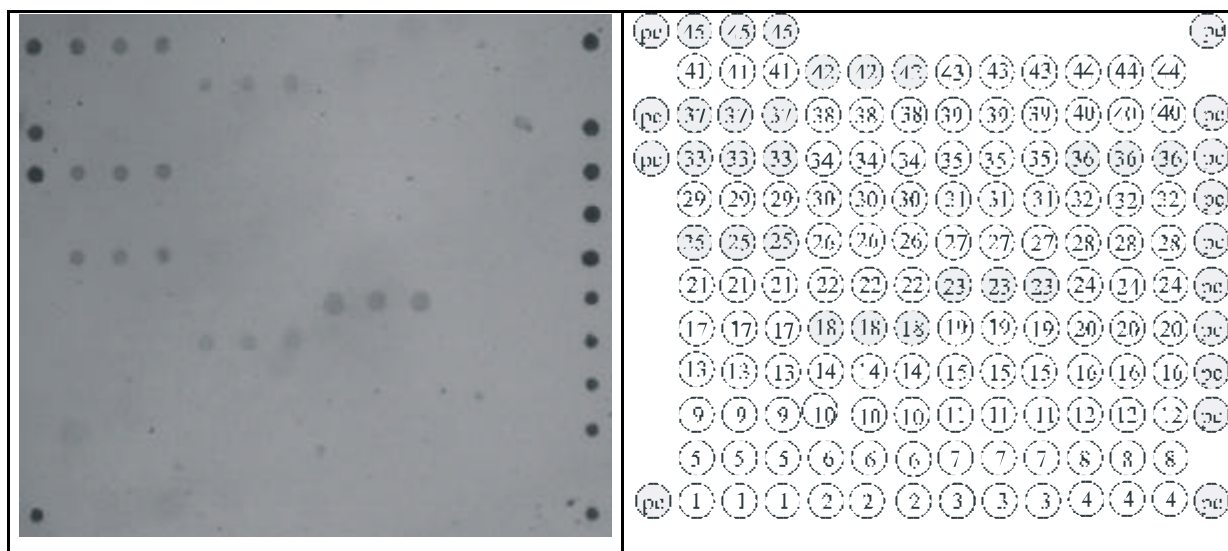


Abb. 32: Microarray "*Kitasatospora III*", *K. mediocidica*, 1 µg, 65°C

3.9.2. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus nicht valide beschriebenen

Kitasatospora Spezies

Spezifische Gensonden für drei nicht valide beschriebene Spezies der Gattung *Kitasatospora* waren bereits auf dem ersten Microarraydesign "*Kitasatospora I*" vorhanden, wurden jedoch nicht untersucht, da die Stämme zu diesem Zeitpunkt noch nicht zugänglich waren.

Dabei handelte es sich um "*Kitasatospora melanogena*", "*Kitasatospora brunnea*" und "*Kitasato-spora streptosporus*". Die drei Stämme wurden dann mit Hilfe des Microarraydesigns 'Kitasatospora III' untersucht. Bei "*Kitasatospora melanogena*" (s. Abb. 33) waren deutlich positive Signale nur bei den spezies-spezifische Gensonden (Nr.6, 12, 34), sowie bei den gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 45) zu erkennen.

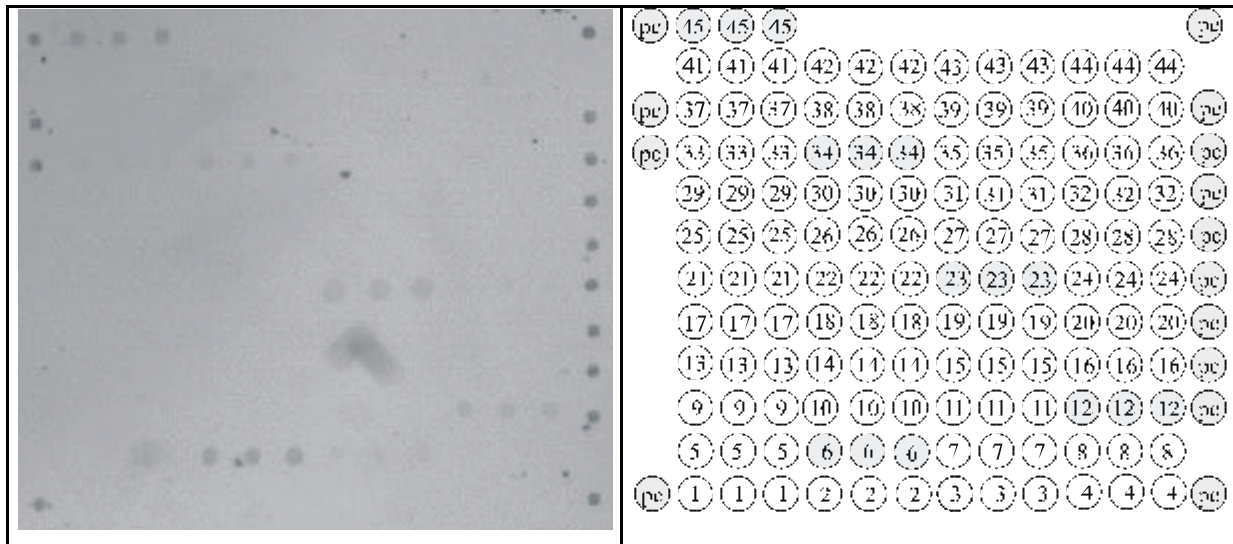


Abb. 33: Microarray "Kitasatospora III", "*K. melanogena*", 1 µg, 65°C

Für "*Kitasatospora streptosporus*" (s. Abb. 34) waren deutlich positive Signale nur bei den spezies-spezifische Gensonden (Nr.11, 22, 27, 38), sowie bei den gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 42, 45, 33, 36) zu erkennen. Für "*Kitasatospora brunnea*" (s. Abb. 35) waren deutlich positive Signale nur bei den spezies-spezifischen Gensonden (Nr. 7, 24), sowie den bei den gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 42, 45, 36) zu erkennen.

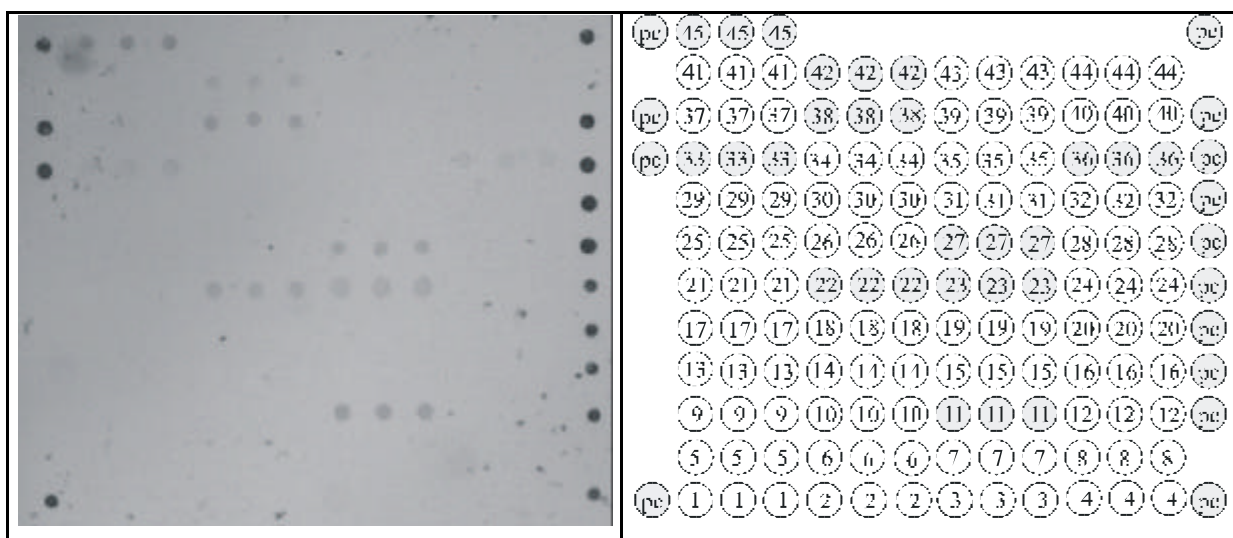


Abb. 34: Microarray "Kitasatospora III", "*K. streptosporus*", 1 µg, 65°C

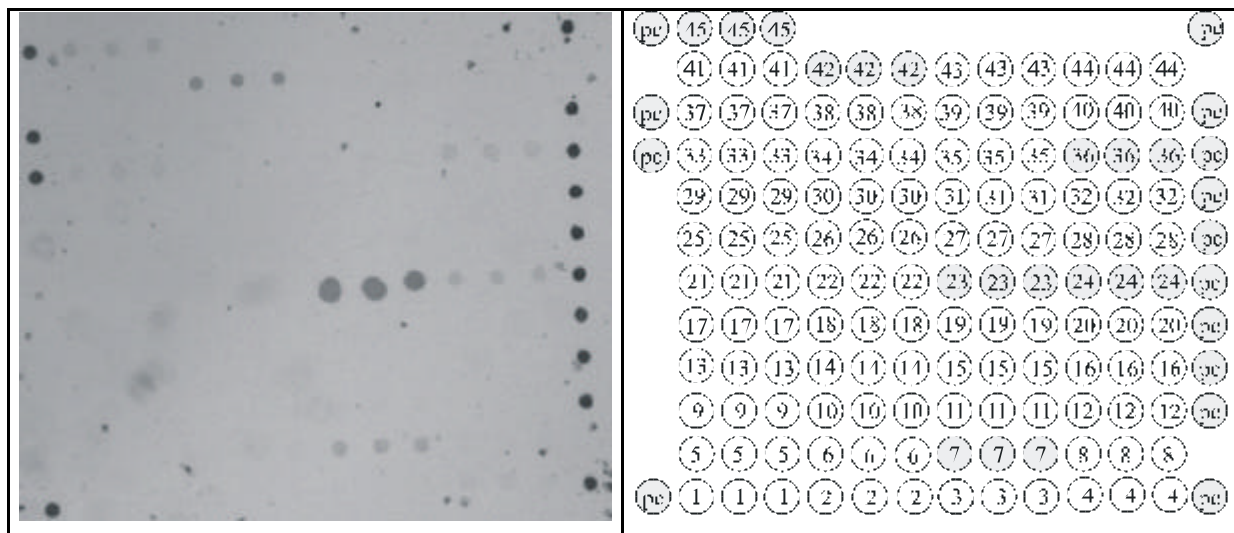


Abb. 35: Microarray "*Kitasatospora III*", "*K. brunnea*", 1 µg, 65°C

3.9.3. Hybridisierung von PCR-Fragmenten generiert aus der nativen Bodenprobe "HKI-2293"

Es wurden Hybridisierungsexperimente mit 5'-biotinylierten PCR-Fragmenten durchgeführt die aus DNA amplifiziert wurden, welche direkt aus der nativen Bodenproben "HKI-2293" (Herkunft: Brasilien) gewonnen worden war.

Parallel dazu wurde diese Bodenprobe in der AG Groth (Taxonomie, Abteilung MNF, HKI Jena) mit morphologischen und chemotaxonomischen Methoden auf *Kitasatospora*-Stämme untersucht.

Dieses Experiment diente der Überprüfung der Übereinstimmung der Resultate bei herkömmlicher Methodik der Bodenprobenanalyse und der direkten Nachweismethode mittels DNA-Microarray-Technologie. Vor Verwendung dieser Bodenprobe wurden vielfältige PCR-Versuche durchgeführt, was der Findung einer geeigneten PCR-Methodik diente.

Es zeigte sich, daß die *Taq*-Polymerase von Qiagen unter Verwendung von Solution Q am besten geeignet war eine Amplifikation aus metagenomischer DNA durchzuführen. Sie wurde für die folgenden Experimente genutzt.

Die Abb. 36 zeigt das Hybridisierungsexperiment der nativen Bodenprobe "HKI-2293". Deutlich positive Signale zeigten die spezies-spezifische Gensonden für *K. setae* (Nr. 2), *K. cochleata* (Nr. 3), *K. cystarginea* (Nr. 4, 15, 37), "*K. melanogena*" (Nr. 6, 12, 34), "*K. brunnea*" (Nr. 7, 13, 24, 35), "*K. streptosporus*" (Nr. 11, 22, 38) und *K. medicidica* (Nr. 18, 25) sowie die Sonde für den Stamm "HKI-2122-22" (Nr. 29).

Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden Nr. 23, 42, und 45 (*Kitasatospora* universal I-III) sowie die gattungsspezifische Sonde "*Streptomyces/Kitasatospora*" (Nr. 33).

Die so erhaltenen Ergebnisse wurden mit denen verglichen, die durch Isolierung von Stämmen aus der Bodenprobe und anschließender chemotaxonomischer Charakterisierung gewonnen worden waren (s. Diskussion, Kap. 4.3.)

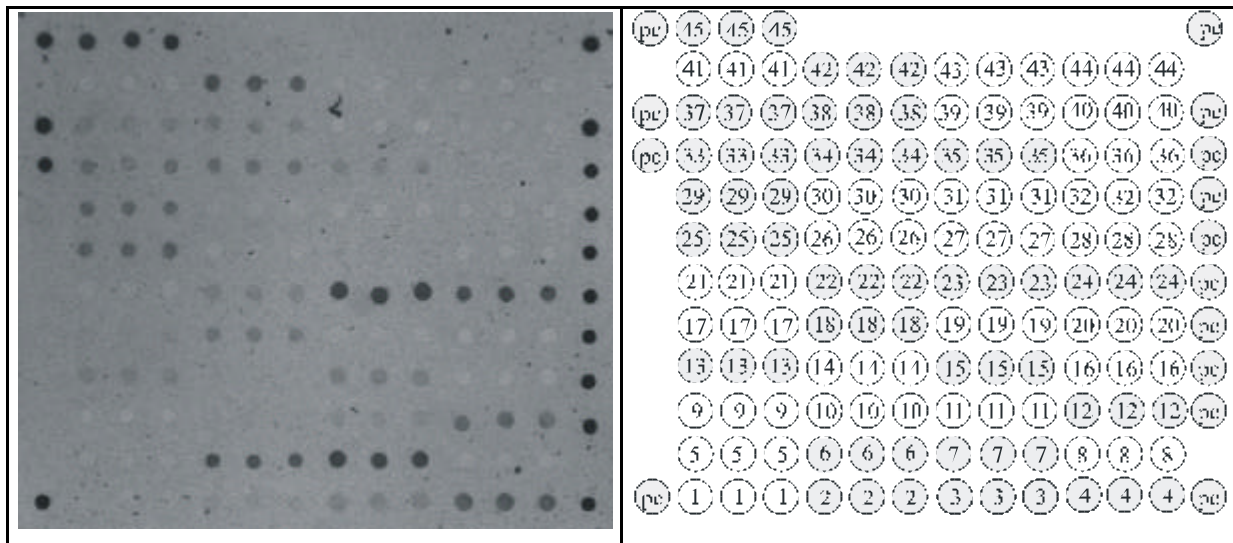


Abb. 36: Microarray "*Kitasatospora III*", "Bodenprobe "HKI-2293", 25 µg, 66°C

3.9.4. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus *K. cystarginea* und Detektion mittels enzymatisch katalysierter Farbbildung

Mit aus *K. cystarginea* isolierter DNA wurden 5'-biotinylierte PCR-Fragmente amplifiziert. Damit wurden, wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben, Hybridisierungsexperimente mit Gold / Silber-Markierung durchgeführt. Zur Überprüfung des enzymatischen Markierungs-Verfahrens wurden die experimentellen Bedingungen bis auf die in Kap. 2.12. beschriebenen Änderungen exakt eingehalten, um die beiden Methoden vergleichen zu können.

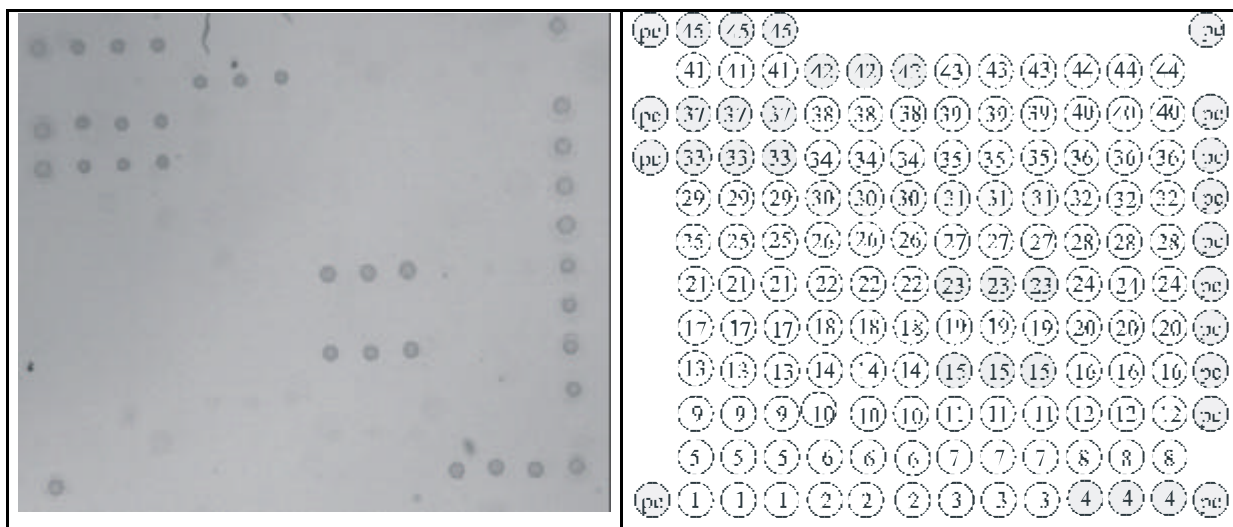


Abb. 37: Microarray "*Kitasatospora III*", *K. cystarginea*, 1 µg, 65°C, enzymatische Markierung

Die Abb. 37 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung von *K. cystarginea* mit Detektion durch enzymatische Farbbildung. Es sind positive Signale für die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 4, 15 und 37 sowie für die gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 33, 36, 42 und 45) detektierbar. Es sind nahezu keine Hintergrundsignale zu erkennen. Die Abbildung zeigt den Zustand des Arrays 30 sec nach Zugabe des Peroxidase-Substrats.

3.9.5. Hybridisierung von PCR-Fragmenten aus Bodenprobe "HKI-2293" und Detektion mittels enzymatisch katalysierter Farbbildung

Mit 5'-biotinylierten PCR-Produkten, amplifiziert aus isolierter Boden-DNA, wurden, wie im oberen Abschnitt bereits beschrieben, Hybridisierungsexperimente mit Gold/Silber-Markierung durchgeführt. Die Abb. 38 zeigt das Ergebnis dieser Hybridisierung mit Detektion durch enzymatische Farbbildung. Deutlich positive Signale zeigten die spezies-spezifischen Gensonden für *K. setae* (Nr. 2, 21), *K. cochleata* (Nr. 3, 14), *K. cystarginea* (Nr. 4, 15, 37), "*K. melanogena*" (Nr. 6, 12, 34), "*K. brunnea*" (Nr. 7, 13, 24, 35), "*K. streptosporus*" (Nr. 11, 22, 27, 38), *K. mediocidica* (Nr. 18, 25), *K. paracochleata* (Nr. 19) und *K. kifunensis* (Nr. 5, 17) sowie die Sonde für den Stamm "HKI-2122-22" (Nr. 29). Weiterhin reagierten die gattungsspezifische Sonde Nr. 23, 42, und 45 (*Kitasatospora* universal I-III) sowie die gattungsspezifische Sonde "*Streptomyces/Kitasatospora*" (Nr. 33).

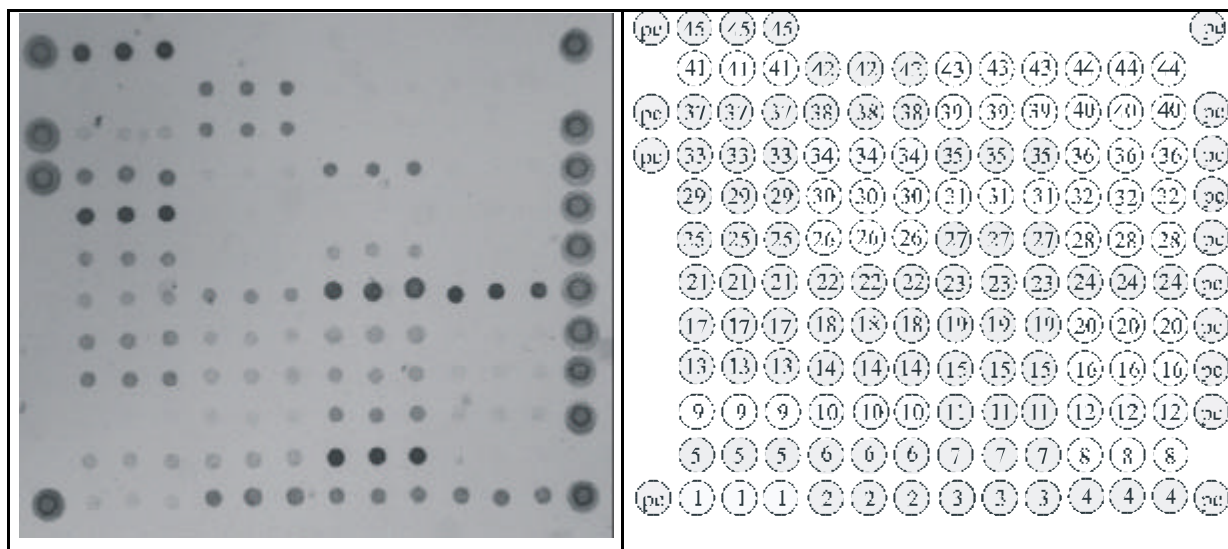


Abb. 38: Microarray "*Kitasatospora* III", "Bodenprobe HKI-2293", 25 µg, 66°C, enzymatische Markierung

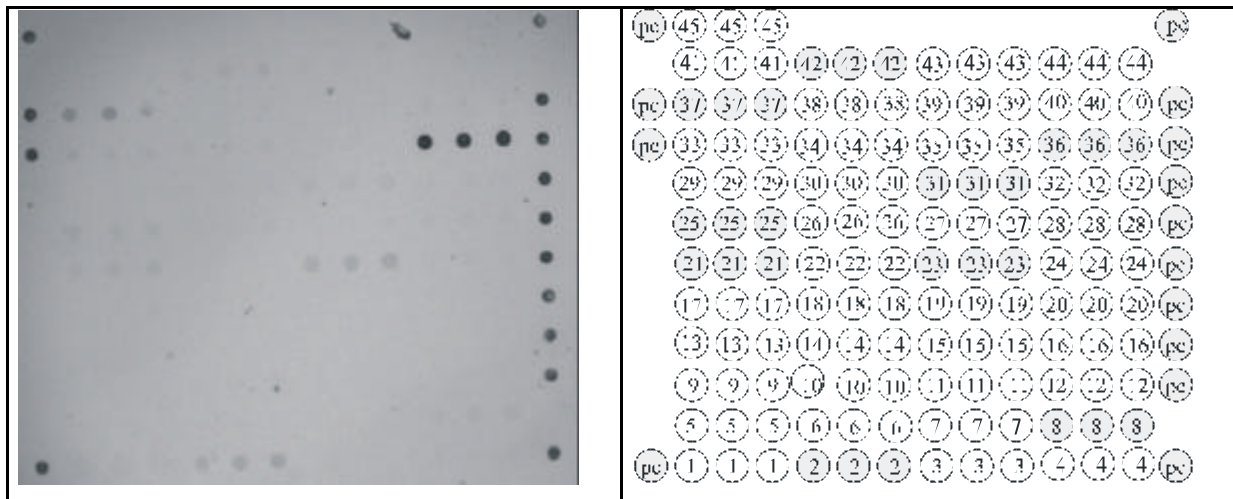
3.10. Test des Hybridisierungsverhaltens der Gensonden mit dem DNA-Microarray "Kitasatospora III" bei Verwendung von "capture-probe"-Oligonukleotiden

Die Durchführung erfolgte wie in Kap. 2.10.2. beschrieben. Die Abb. 39 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung von Gesamt-DNA isoliert aus *K. setae* mit Detektion durch 5'-biotinylierte "capture-probe"-Oligonukleotide.

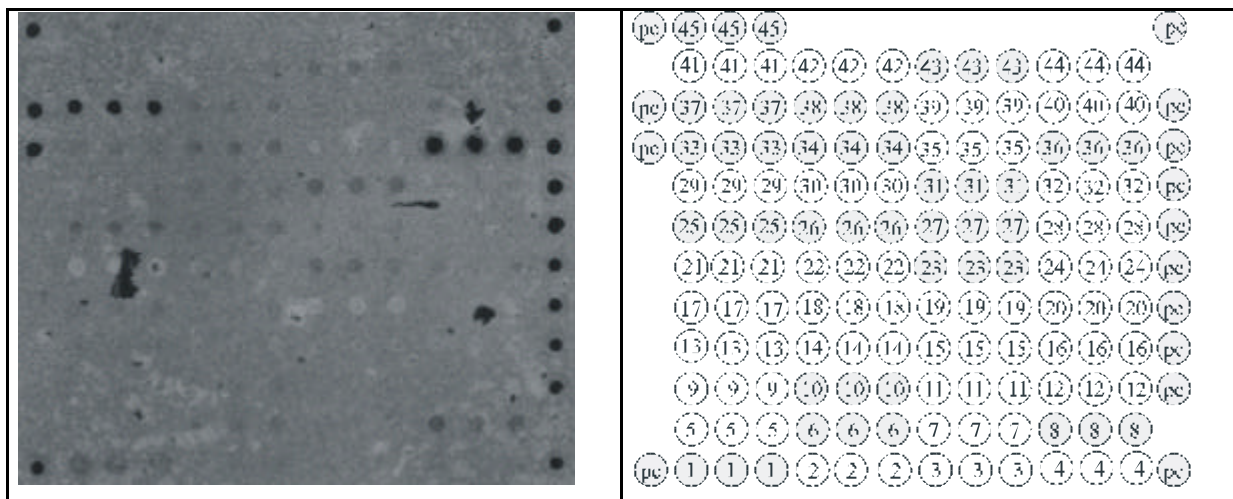
Es sind positive Signale für die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 2 und Nr. 21 zu erkennen. Dies entspricht *K. setae* I/II. Weiterhin sind Signale bei den gattungsspezifischen Gensonden (Nr. 23, 33, 36 und 42) zu erkennen. Allerdings zeigten sich auch einige falsch-positive Signale (Nr. 8, 25, 27 und 37) bei anderen spezies-spezifischen Gensonden.

Diese Signale waren auch durch eine Erhöhung der Temperatur nicht zu beseitigen. Sie treten jedoch auch bei der Hybridisierung von "capture-probe"-Oligonukleotiden ohne Zugabe von Gesamt-DNA auf (s. Abb. 41). Sie sind durch Hybridisierungen von "capture-probe"-Oligonukleotiden an die Gensonden bedingt. Die Signale, die in Abb. 41 zu erkennen sind, dürfen somit bei den Experimenten mit den "capture-probe"-Oligonukleotiden nicht als positiv angesehen werden (s. u.). Die Signale der spezies-spezifischen Gensonden Nr. 2 und Nr. 21 sowie der gattungsspezifischen Sonden Nr. 23, 33 und 42 stellen jedoch spezifische Hybridisierungssignale dar, weil sie bei den Experimenten bei denen ausschließlich "capture-probe"-Oligonukleotide verwendet wurden, nicht erscheinen. Untersuchungen mit DNA von *K. griseola* und *K. mediocidica* ergaben ähnliche Ergebnisse (Daten nicht gezeigt). Die metagenomische Gesamt-DNA der Bodenprobe "HKI-2293" wurde ebenfalls auf ihr Hybridisierungsverhalten bei Verwendung von "capture-probe"-Oligonukleotiden getestet. Die Abb. 40 zeigt das Ergebnis der Hybridisierung von 20 µg der isolierten Boden-DNA. Es sind positive Signale für die spezies-spezifischen Gensonden Nr. 1 (*K. phosalacinea*), Nr. 8, 25 (*K. mediocidica*), Nr. 26 (*K. paracochleata*), Nr. 31 (*S. aureofaciens*), Nr. 6, 34 ("*K. melanogena*"), Nr. 4, 37 (*K. cystarginea*), Nr. 43 (*K. nipponnensis*), Nr. 27, 38 ("*K. streptosporus*"), Nr. 10 (*K. griseola*) und Nr. 2 (*K. setae*) zu erkennen. Weiterhin sind Signale bei den gattungsspezifischen Gensonden Nr. 23, 45 (*Kitasatospora* universal I/III), Nr. 33 (*Streptomyces/Kitasatospora* universal) und Nr. 36, 40 (Actinomycetes I/II) zu erkennen.

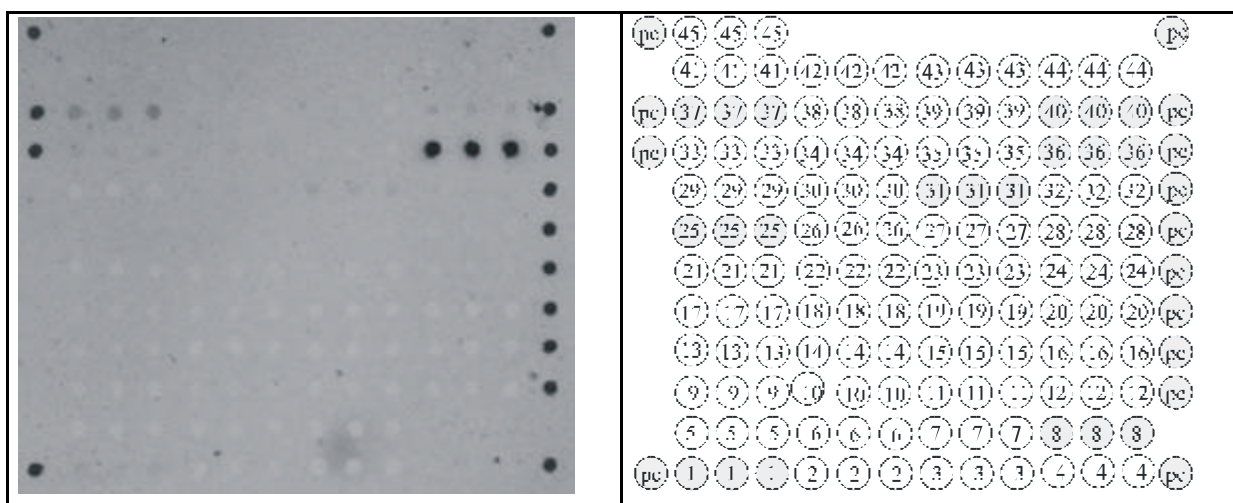
Die Abb. 41 zeigt ein Experiment ohne Einsatz von DNA. Die dort entstehenden Signale sind durch die "capture-probe"-Oligonukleotide bedingt und daher für alle Experimente mit dieser Markierungsmethode falsch-positiv. Es sind die Sonden Nr. 37 (*K. cystarginea*), Nr. 36, 40 (Actinomycetes I/II), Nr. 31 (*S. aureofaciens*), Nr. 1 (*K. phosalacinea*) und Nr. 8, 25 (*K. mediocidica*).



**Abb. 39: Microarray "*Kitasatospora III*", *K. setae* "capture-probe"-Oligonukleotid
Markierung, 20 µg, 65°C**



**Abb. 40: Microarray "*Kitasatospora III*", Bodenprobe "*HKI-2293*", "capture-probe"-
Oligonukleotid Markierung, 20 µg, 65°C**



**Abb. 41: Microarray "*Kitasatospora III*", Negativkontrolle, "capture-probe"-
Oligonukleotid Markierung, 20 µg bidest, 65°C**

3.11. Test des Hybridisierungsverhaltens der gattungsspezifischen Gensonden mit den DNA-Microarrays "*Kitasatospora* I-III"

Die Ergebnisse der gattungsspezifischen Gensonden der drei in dieser Arbeit erstellten Microarraydesigns werden im folgenden Abschnitt kurz zusammengefasst.

3.11.1. Hybridisierungsverhalten der gattungsspezifischen Gensonden "*Kitasatospora* universal I-III"

Auf dem ersten Microarraydesign "*Kitasatospora* I" waren zwei verschiedene Universal-Gensonden für die Gattung *Kitasatospora* vorhanden. Denn bei der Parametereinstellung wurde auch die Eignung von Oligonukleotid-Gensonden verschiedener Hersteller überprüft. Die identischen Gensonden *Kitasatospora* I (JenaBioscience, Jena) und *Kitasatospora* MWG (MWG Biotech, Ebersberg) unterschieden sich jedoch nicht in ihren Hybridisierungseigenschaften. Sie wurden deshalb als "*Kitasatospora* universal I" zusammengefasst. Wie aus den Experimenten der Kap. 3.6. und 3.7. zu erkennen ist, zeigte sich bei allen untersuchten *Kitasatospora* Spezies stets ein positives Hybridisierungssignal für die Universal-Gensonde "*Kitasatospora* universal I". Zur Überprüfung der Spezifität der Gensonde wurden Experimente mit Spezies der Gattung *Streptomyces* durchgeführt. Hier ergab sich bei keinem der Experimente ein positives Hybridisierungssignal.

Dennoch wurde aufgrund neuer Sequenzdaten, die im Verlauf der Arbeiten zugänglich wurden deutlich, daß einige Streptomyceten laut ihrer 16S-23S rDNA-Sequenz eventuell doch an diese Gensonde binden könnten. Daher wurden zwei neue Universal-Gensonden "*Kitasatospora* universal II und III" generiert (s. Tab. 30). Diese beiden Gensonden wurden noch strenger gattungsspezifisch für Spezies der Gattung *Kitasatospora* gewählt. Experimente mit Spezies der Gattung *Streptomyces* ergaben auch hier in keinem der Experimente ein positives Hybridisierungssignal.

3.11.1.2. Hybridisierungsverhalten der gattungsspezifischen Gensonden des Microarrays "*Kitasatospora* I-III"

Die anderen gattungsspezifischen Gensonden des ersten Microarray-Designs dienten vor allem als Positiv/Negativ Kontrollen für das Gesamtsystem. Allerdings zeigte keine der Gensonden ein Hybridisierungssignal. Sie wurden in späteren Microarraydesigns ersetzt. Für das zweite Arraydesign wurden einige neue Universal-Gensonden (Nr. 31, 38, 43, 44, 46, 47, 48; *Micromonospora* universal, *Streptosporangium* universal, *Frankia* universal,

Actinomycetes universal II, *Propionibacterium* universal, *Mycobacterium* universal, *Nocardia* universal) generiert. Weiterhin wurden einige FISH-Sonden auf ihre Eignung als Gensonden überprüft (Nr. 39-42; Actinomycetes universal I, *Archea* universal, Bacteria universal, Eucaria universal). Wie aus den Experimenten in Kap. 3.7. ersichtlich, zeigte sich, daß sowohl die neuen gattungsspezifischen Sonden (Nr. 31, 37, 38, 43, 44, 46, 47, 48), als auch die FISH-Sonden, eine zu geringe Spezifität besaßen.

So reagierte die Gensonde Nr. 47, die als gattungsspezifische *Mycobacterium* Sonde generiert wurde, auch bei Hybridisierungsexperimenten mit *Streptomyces*- und *Kitasatospora* - Spezies. Ähnliche Ergebnisse zeigten die anderen gattungsspezifischen Gensonden und die FISH-Sonden.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag zur Schaffung einer hochdurchsatzfähigen Methode zur zuverlässigen taxonomischen Charakterisierung der Gattung *Kitasatospora* und *Streptomyces*. Es konnte gezeigt werden, daß eine Etablierung der DNA-Microarray-Technologie als molekularbiologische Methode zur Detektion von Actinomyceten möglich ist. Mit dem entwickelten "Taxonomie-Chip" können Spezies der Gattung *Kitasatospora* schnell und eindeutig taxonomisch klassifiziert werden.

In einem ersten Schritt wurde mit DNA aus Reinkulturen die grundsätzliche Machbarkeit des Taxonomie-Microarrays gezeigt. Später folgte die Untersuchung von gemischten Kulturen, mit denen die hohe Spezifität der ausgewählten Gensonden deutlich wurde. Nach Isolierung von metagenomischer DNA aus Bodenproben und PCR-Amplifikation konnten in einem dritten Schritt *Kitasatospora* Spezies direkt ohne Kultivierungsschritt im Boden nachgewiesen werden. Das Problem der ungenügenden Spezifität der Hybridisierungsergebnisse bei gemischten Proben, das bei allen bisherigen Studien auftrat, konnte durch die Wahl einer geeigneten Zielregion deutlich verbessert werden. Weiterhin konnte eine direkte Detektion von DNA auf dem Microarray ohne PCR Amplifikation der Zielsequenzen etabliert werden.

4.1. Auswahl einer geeigneten Zielregion der Gensonden für das DNA-Microarray und Sequenzanalyse der Actinomyceten-Spezies

Im ersten Teil der Arbeit wurde eine geeignete Zielregion für die Gensonden des Microarrays ermittelt. Diese Zielregion muss einerseits konserviert sein und andererseits eine genügend hohe Variabilität aufweisen, um ein spezies-spezifisches Gensondendesign zu ermöglichen. Dazu eignet sich idealerweise die rDNA von Mikroorganismen, da sie aufgrund ihrer Aufgaben im Translationsapparat der Zelle eine hohe funktionelle Konstanz besitzt, aber auch genügend Interspezies-Variabilität aufweist. Zunächst wurde der genaue Bereich innerhalb des 16S-23S-5S rDNA-Operons geklärt, der als Zielregion dienen soll. Dabei ist die Analyse der 16S rDNA eine lang etablierte Methode zur Untersuchung der phylogenetischen Zusammenhänge von Organismen [40, 43]. Sie stellt eine Art Standard auf dem Gebiet der möglichen Zielregion zur phylogenetischen Klassifizierung von Mikroorganismen dar [43, 44, 58]. Auch auf dem Gebiet der Molekularen Taxonomie der Actinomyceten ist die 16S rDNA-Analytik weit verbreitet [18, 37, 47].

Bei den Streptomyceten weist die 16S rDNA drei Abschnitte auf, die ausreichend Variationen in ihrer Sequenz zeigen, um gattungsspezifisch (alpha-Region: Pos. 982-998; beta-Region: Pos. 1102-1122) bzw. spezies-spezifisch (gamma-Region: Pos. 150-200) zu sein [37, 45]. Diese beschriebene Spezifität bezieht sich jedoch auf die reine Sequenzanalyse, also den Vergleich von Sequenzdaten. Somit sind anhand der DNA-Basenabfolge einzelne Gattungen bzw. Spezies unterscheidbar, da sie an bestimmten Stellen der Sequenz unterschiedliche DNA-Basen aufweisen.

Dennoch erwiesen sich die variablen Bereiche der 16S rDNA zur Schaffung von Oligonukleotid-Gensonden als ungeeignet, da die Sequenzdaten von *Streptomyces* / *Kitasatospora* - Spezies zu wenig Varianz auf kurzen Sequenzabschnitten zeigten. Deshalb konnten aus diesen kurzen Sequenzabschnitten keine Oligonukleotid-Gensonden gewonnen werden, die eine ausreichend große Zahl an Basenfehlpaarungen innerhalb einer 20-30 bp Sequenz aufweisen. Prinzipiell ist zwar eine Unterscheidung von nur einem Mismatch auf 20-30 bp mit Hilfe der Microarray-Technologie möglich, jedoch konnte dies bisher nur unter hoch stringenten Bedingungen und relativ G+C-armer DNA gezeigt werden [102]. In dieser Arbeit wurde bei allen ausgewählten Oligonukleotiden darauf geachtet, daß mindestens 4 Basenfehlpaarungen (Mismatches) zu allen anderen bekannten DNA-Sequenzen vorhanden sind. Dies war nötig, um die in Kap. 2.13.4. erläuterten optimalen Gensonden zu generieren [95]. Weiterhin sind die untersuchten Actinomyceten hoch G+C-reich. Durch die stärkere G+C Bindung kann dies leicht zu falsch-positiven Ergebnissen bei einer geringeren Zahl an Fehlpaarungen führen. Fehlpaarungen bei falsch-positiven Ergebnissen werden durch starke G+C Bindungen ausgeglichen. Dies führt trotz der Fehlpaarungen dazu, daß die DNA mit der Gensonde hybridisiert. So war aufgrund der Sequenzdaten der 16S rDNA-Region keine Generierung von Oligonukleotiden zur Unterscheidung auf der Spezies-Ebene möglich.

Weil die gestellten Anforderungen (s. Kap. 2.13.4) an die Gensonden nicht erfüllt werden konnten, wurde der 16S-23S rDNA-intergenetische Spacer (ITS) näher untersucht, da aus verschiedenen Untersuchungen eine hohe Varianz der Sequenzen der ITS-Region bekannt war [20, 46, 47]. Die Ergebnisse der Sequenzierungen der ITS-Region sowie bereits auf Datenbanken hinterlegte ITS-Sequenzen zeigten deutlich eine hohe Variabilität der Sequenzen innerhalb der 16S-23S rDNA-Region bei den Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora*. Bei dem Alignment der Sequenzen konnte gezeigt werden, daß die 16S-23S rDNA-Region der untersuchten Stämme sowohl Bereiche hoher Stabilität, als auch Bereiche hoher Variabilität aufweisen.

Diese Bereiche hoher Variabilität sind in ihrer Sequenz teilweise einmalig für den jeweiligen Organismus und unterscheiden sich signifikant von allen anderen Organismen, so daß diese hohe Varianz schon bei kurzen Probesequenzen ("short DNA oligonucleotides") eine ausreichende hohe Anzahl an Basenfehlpaarungen hervorruft. Damit war es möglich, Oligonukleotid-Gensonden zu generieren, die den gestellten Anforderungen genügen.

Stackebrandt et al. [57] zeigten, daß die Auswahl der Targetsequenzen sehr wichtig für taxonomische Untersuchungen ist. In Abhängigkeit der Nutzung verschiedener DNA-Regionen wurden unterschiedliche Übereinstimmungen und damit Verwandtschaftsgrade erhalten. Daher weichen Stammbäume, die mit Hilfe von 16S-23S rDNA-Sequenzen generiert werden, von Standard-16S rDNA-Stammbäumen ab. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf die gute Nutzbarkeit der Region zur Speziesunterscheidung, da hier nicht die phylogenetische Verwandtschaft, sondern allein der Sequenzunterschied wichtig ist. Bei Nutzung der ITS-Region zur Herstellung von Oligonukleotid-Gensonden muss auf die bei Bakterien vorhandene Intraspezies-Heterogenität geachtet werden [47]. So können sich bei den Actinomyceten einzelne Stämme innerhalb einer Spezies geringfügig in ihrer ITS-Sequenz unterscheiden. Dies wird jedoch durch unterschiedliche Kopien des 16S-23S-5S rDNA-Operons wieder ausgeglichen und stellt eher ein theoretisches Problem dar. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Spezies zeigten Stämme aus europäischen Bodenproben keinerlei Unterschiede im Hybridisierungsverhalten an spezies-spezifischen Gensonden, die aus Sequenzdaten asiatischer Stämme generiert wurden.

Die oben erwähnten unterschiedlichen Übereinstimmungen und damit Verwandtschaftsgrade, die bei Nutzung unterschiedlicher Regionen des 16S-23S-5S rDNA-Operons auftreten, führten durch die Arbeit von Zhang [20] zu einer Neubelebung der Gattung *Kitasatospora*. Die Sequenzanalysen dieser Arbeit konnten die Ergebnisse der Studie bestätigen. Auch bei einer großen Anzahl von *Streptomyces* Spezies sowie bei allen neu sequenzierten Stämmen der Gattung *Kitasatospora* zeigten sich die deutlichen Unterschiede in der Sequenz der 16S-23S rDNA-Region. Die hohe prozentuale Übereinstimmung sowie die Ergebnisse der Neighbor-Joining Tree Analyse bestätigten, daß es sich bei *Kitasatospora* um eine monophyletische Gattung handelt. Kim et al. bestätigten durch Sequenzanalysen der RNA-Polymerase (beta-Untereinheit) von Actinomyceten ebenfalls die Eigenständigkeit der Gattung *Kitasatospora* [103].

4.2. Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays für PCR-Fragmente aus Reinkulturen und gemischten Proben

Die Vorversuche zur Erstellung einer geeigneten methodischen Vorgehensweise für die Hybridisierungsexperimente mit dem ArrayTube®-Reader-System führten relativ schnell zur Auffindung von geeigneten Reaktionsparametern für die Untersuchungen. Dies liegt in der hohen Spezifität der Gensonden begründet. Schon in den Vorversuchen wurde durch den Einsatz gemischter Proben verschiedener *Kitasatospora* Spezies deutlich, daß kaum Kreuz-Hybridisierungen bei Verwendung von Reinkulturen auftreten. Die Gensonden sind also bei geeigneten Parametern wie hoher Hybridisierungstemperatur spezies-spezifisch. Insgesamt konnten 10 valide beschriebene Spezies eindeutig mit Hilfe der verwendeten DNA-Microarrays nachgewiesen werden (*K. phosalacinea*, *K. griseola*, *K. cochleata*, *K. azatica* /*kifunensis*, *K. setae*, *K. mediocidica* und *K. cystarginea*, *K. putterlickiae*, *K. gansuanensis*). Derzeit sind 14 Spezies der Gattung valide beschrieben [104]. Das entwickelte DNA-Microarray deckt also den größten Teil der Spezies der Gattung *Kitasatospora* ab.

Eine der fehlenden Spezies war aus Patentgründen unzugänglich für unsere Arbeiten (*K. cheeriannensis*). Für *K. cineracea* und *K. niigatensis* wurden keine spezies-spezifischen Sonden generiert. Hybridisierungen mit *K. cineracea* ergaben jedoch eine eindeutige Zuordnung zur Gattung *Kitasatospora* und keine falsch positiven Hybridisierungssignale. Nur die Experimente mit der Spezies *K. paracochleata* ergaben keine eindeutigen Ergebnisse. Die Begründung dafür könnte in unzureichendem Gensonden-Design, Verunreinigungen des untersuchten Stammes oder Fehlern in der Sequenzierung des untersuchten Stammes liegen. Die beiden Spezies *K. azatica* und *K. kifunensis* zeigten eine so hohe Übereinstimmung in ihrer 16S-23S rDNA-Sequenz, daß kein Gensondendesign möglich war, welches diese beiden Spezies sicher unterscheidet. Daher wurde eine gemeinsame Gensonde gewählt. Diese hohe Übereinstimmung in der 16S-23S rDNA-Sequenz ist so ungewöhnlich, daß weitere taxonomische Untersuchungen von Interesse wären.

Bei einigen Gensonden war eine Veränderung der Oligonukleotid-Sequenz nötig, da die zuerst gewählte Sequenz keine zufriedenstellenden Ergebnisse lieferte. So mussten die Sonden *K. mediocidica* II (Nr. 18, s. Abb. 33) und *K. cystarginea* II (Nr. 4) verändert werden, da an ihnen keine ausreichende Hybridisierung stattfand. Small et al. [86] zeigten, daß die Zugänglichkeit von Gensonden während der Hybridisierung durch ihre Sekundärstruktur extrem variabel sein kann. Dies könnte das unzureichende Hybridisierungsverhalten der beiden Gensonden erklären.

Die geringfügige Verschiebung der beiden Sonden in 5'-Richtung auf dem DNA-Strang führte zu einer starken Verbesserung des Hybridisierungsverhaltens. Die Optimierung von Gensonden allein anhand ihrer Sequenz reicht also nicht immer aus, da neben Sequenz und Struktur der Gensonden auch die Sekundärstruktur der Target-DNA ein Haupteinflußfaktor auf das Hybridisierungsverhalten der Sonden ist. Bei dem zweiten Microarray-Design „*Kitasatospora* II“ wurde außerdem die Verlängerung der 5'-biotinylierten Probe von 300 bp auf 1000 bp getestet, um einige gattungsspezifische Regionen im Endbereich der 16S rDNA zugänglich zu machen. Dies hatte keinen Einfluss auf die Signalstärke. Insgesamt war die entwickelte Methode sehr gut in der Lage, die valide beschriebenen Spezies der Gattung *Kitasatospora* schnell und eindeutig zu detektieren. Neben den valide beschriebenen Spezies wurden auch sieben nicht valide beschriebene Spezies, Stämme und Bodenisolat getestet („HKI-2122-22“, *K. melanogena*, *K. streptosporus*“, *K. brunnea*“, „HKI-2293-12“, „HKI-2291-42“ „Isolat J07“). Fünf der Stämme lieferten gleichwertige Resultate in Bezug auf Spezifität und Hybridisierungseffizienz wie die valide beschriebenen Spezies. Beim Stamm „HKI-2122-22“ wurde die hohe Spezifität des Arraydesign besonders deutlich. Der Stamm gehört zur Spezies *K. kifunensis*. Er unterscheidet sich jedoch in seiner Spacersequenz deutlich von der Spezies *K. kifunensis*. Es konnte gezeigt werden, daß ein Stamm innerhalb einer Spezies, der sich vom Typstamm der Spezies deutlich in der Sequenz der 16S-23S rDNA-Region unterscheidet, mit der verwendeten Technologie detektierbar ist. Das bedeutet, daß die Genauigkeit der Gensonden bis in die Intraspezies-Ebene reicht. Diese Unterscheidung von Stämmen innerhalb einer Spezies wird auch mit der Detektion der nicht valide beschriebenen Spezies „*K. melanogena*“ und „*K. brunnea*“ erreicht, da sie zur Spezies *K. phosalacinea* gezählt werden. Die Untersuchungen des „Isolat J07“ führten zu seiner eindeutigen Zuordnung zur Spezies *K. mediocidica*. Dies zeigt, daß Bodenisolat, die in ihrer 16S-23S rDNA-Sequenz nicht völlig mit dem sequenzierten Typstamm übereinstimmen, trotzdem ein ausreichend starkes Signal auslösen und damit die Spezifität der Gensonden nicht zu hoch ist. Die spezies-spezifischen Gensonden „HKI-2293-12“, sowie „HKI-2291-42“ zeigten auch nach Optimierung durch Verschiebung auf dem DNA-Strang kein ausreichendes Hybridisierungsverhalten. Die Begründung dafür könnte wiederum in unzureichendem Gensonden-Design, Verunreinigungen der untersuchten Stämme oder Fehlern bei der Sequenzierung der Stämme liegen. Insgesamt zeigte die entwickelte Methode auch in der Subspeziesebene gute Ergebnisse. Der Großteil der in dieser Arbeit eingesetzten spezies-spezifischen Oligonukleotid-Gensonden (ca. 80%) zeigten ein gutes Hybridisierungsverhalten und eine hohe Spezifität.

4.3. Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays für PCR-Fragmente aus Bodenproben

Die Anzahl der Publikationen, die sich mit der Anwendung von DNA-Microarrays zur Detektion und Klassifizierung von Mikroorganismen befassen, steigt in den letzten Jahren ständig [75]. Dennoch sind Probleme, wie die Detektionsempfindlichkeit in komplexen Gemischen oder Verunreinigungen durch organische Inhaltsstoffe (z. B. Huminsäuren), noch nicht vollständig bearbeitet.

Allerdings ist ein direkter Nachweis von Mikroorganismen ohne Kultivierungsschritt vorteilhaft, da so die mikrobielle Diversität einer Bodenprobe besser erfaßt werden kann. Viele Mikroorganismen sind bisher nicht kultivierbar, und die Zusammensetzung einer mikrobiellen Lebensgemeinschaft kann sich durch die Selektionsbedingungen einer Kultivierung stark verändern. Aber auch die Lyse von mikrobiellen Zellen in Umweltproben zur direkten Detektion der DNA ist ein kritischer Schritt bei der PCR-gestützten 16S rDNA-Analytik [52]. Zur Evaluierung der Isolierungsmethode für metagenomische DNA aus Bodenproben mit dem Ultra Clean Soil Kit® wurden Hybridisierungsexperimente mit PCR-Fragmenten durchgeführt, die aus DNA amplifiziert wurden, die direkt aus inokulierten Bodenproben gewonnen worden war.

Diese Vorversuche zur Findung eines geeigneten Lyseverfahrens waren nötig, da die in dieser Arbeit untersuchten Actinomyceten mit den herkömmlichen Lyseprotokollen nicht in ausreichender Menge aus dem Boden extrahierbar waren. Das erarbeitete Lyseprotokoll unter stringenten Bedingungen zeigte gute Ergebnisse im Aufschluss der Mikroorganismen, jedoch ist ein mögliche Bildung von fragmentierter DNA und damit Bildung von PCR-Artefakten und chimärischen PCR-Produkten zu beachten [15]. In der mit Hilfe des Microarrays "*Kitasatospora* II" untersuchten nativen Bodenprobe "Wald/ LG/Jena/"*K. mediocidica*" konnte der Stamm "J07 / "*K. mediocidica*" nachgewiesen werden. Die Signalintensität bei diesen Untersuchungen war sehr schwach. Dies kann zum einen an einem geringen Vorkommen des gesuchten Stammes in der Probe oder zum anderen in einer unzureichenden Lyse der Grampositiven Actinomyceten liegen. Dieser Effekt müsste jedoch durch eine PCR-Amplifikation mit Primern, die eine hohe Spezifität für Actinomyceten aufweisen, wieder ausgleichbar sein. Deshalb ist es wahrscheinlicher, daß die geringe Signalintensität sowie die aufgetretenen Kreuz-Hybridisierungen durch die Problematik der PCR-Amplifikation komplexer Proben hervorgerufen werden (s. u.).

Wie die Auswertung der Agarosegele zeigte, waren die PCR-Ergebnisse bei der Untersuchung der Probe "Wald/ LG/Jena/"*K. mediocidica*" nicht zufriedenstellend. Daher wurde nach geeigneten PCR-Bedingungen gesucht, welche eine zuverlässige Amplifikation der DNA in komplexen Gemischen ermöglichen. Der Einsatz einer *Taq*-Polymerase unter Zugabe von Solution Q (Qiagen) erbrachte schließlich zufriedenstellende Ergebnisse. Da nicht mehr ausreichend Probe "Wald/ LG/Jena/"*K. mediocidica*" zur Verfügung stand, wurde für die weiteren Experimente die native Bodenprobe "HKI-2293" (Herkunft: Brasilien) genutzt. Von dieser Probe war bekannt, daß sie *Kitasatospora* Spezies enthielt. Parallel zu den Hybridisierungsexperimenten auf dem DNA-Microarray wurde diese Bodenprobe mit morphologischen und chemotaxonomischen Methoden untersucht. Diese Vorgehensweise diente der Überprüfung der Übereinstimmung der Resultate bei herkömmlicher Methodik der Bodenprobenanalyse mit der direkten Nachweismethode mittels DNA-Microarray.

Die Hybridisierungsexperimente der nativen Bodenprobe "HKI-2293" zeigten eine Vielzahl deutlich positiver Signale. Es ist somit gelungen, die Signalintensität durch eine geeignete PCR-Methodik deutlich zu steigern. Positive Signale ergaben die spezies-spezifischen Sonden für *K. setae*, *K. cochleata*, *K. cystarginea*, "*K. melanogena*", "*K. brunnea*", "*K. streptosporus*" und *K. mediocidica* sowie die Sonde für den Stamm "HKI-2122-22". Weiterhin reagierten die gattungsspezifischen Sonden *Kitasatospora* universal I-III sowie die gattungsspezifische Sonde "*Streptomyces/Kitasatospora*". Die parallele Kultivierung und chemotaxonomische Untersuchung der Probe ergab die positive Zuordnung eines Isolates mit Hilfe der Fettsäureanalytik zur Spezies *K. setae* ("HKI-2293-175").

Damit stimmen die Daten aus der herkömmlichen Methode zur Klassifizierung von Mikroorganismen mit den Ergebnissen der Microarrayuntersuchungen bei einer der untersuchten Spezies überein. Die deutlich höhere Anzahl an Spezies, die mit Hilfe der Microarray-Technologie detektiert wurden, zeigt einmal den enormen Unterschied zwischen den in Bodenproben tatsächlich vorhandenen und den daraus kultivierbaren Mikroorganismen auf. Allerdings darf mit diesem Ergebnis nicht unkritisch umgegangen werden, denn die PCR-gestützte Analytik von mikrobiellen Lebensgemeinschaften in Umweltproben ist problematisch [52]. So ist eine Vielzahl von Einflussgrößen zu beachten. Wie oben schon erwähnt, hat allein die Lyse der mikrobiellen Zellen einen enormen Einfluss auf die Hybridisierungsergebnisse. Weiterhin ist die PCR-Amplifikation aus Reinkulturen zwar eine Routinemethode, eine Übertragung auf die Untersuchung von Umweltproben ist aber nicht ohne weiteres möglich.

So muss die Inhibition der Amplifikation durch koextrahierte Probenbestandteile wie z.B. Huminsäuren beachtet werden [105]. Der in dieser Arbeit genutzte Waldboden (Probe 'Wald/LG/Jena/'*K. mediocidica*) weist bedingt durch seinen hohen organischen Anteil eine hohe Huminsäurekonzentration auf. Diese Problematik konnte durch die zusätzlichen Waschschritte, die abweichend vom Ursprungsprotokoll durchgeführt wurden, verbessert werden.

Weiterhin ist bei der PCR-Amplifikation aus Umweltproben zu beachten, daß ein komplexes Gemisch an Matrizen-DNA vorliegt. Diese Matrizen weisen wiederum eine unterschiedliche Amplifikationseffizienz auf. Dies liegt zum einen an der unterschiedlichen Zugänglichkeit der Primer an den DNA-Strang, zum anderen ist die Strangverlängerungseffizienz der *Taq*-Polymerase nicht für alle Templates gleich. Nicht zuletzt spielt, bedingt durch die hohe Anzahl an Matrizen und damit an Amplifikationsmöglichkeiten, auch ein Substratmangel der *Taq*-Polymerase und damit eine unvollständige Amplifikation eine Rolle [54]. Andere Einflussfaktoren sind weiterhin die Zahl der Kopien des rDNA-Operons und die Konzentration der Matrizen-DNA. Speziell für die PCR-Anwendung in dieser Arbeit ist das Problem der unterschiedlichen Amplifikationseffizienz von G+C-reichen und G+C-armen Spezies von Interesse. Die höhere Bindungsenergie der G+C-Bindung führt bei G+C-reichen Spezies während des ersten Schrittes der Amplifikation zu einer verzögerten Denaturierung des DNA-Doppelstrangs. Dies führt zu einer verstärkten Amplifikation G+C-armer Spezies [106] Fragmente solcher Spezies können im Gesamtpool der PCR-Fragmente dann überwiegen und dadurch ein Überladung des Arrays mit DNA verursachen.

Insgesamt führen alle diese Einflussfaktoren zu einer hochkomplexen Problematik. Die entstehenden PCR-Produkte bei einer Amplifikation von metagenomischer DNA sind nicht nur ein Gemisch der Produkte verschiedener Matrizen, sondern bestehen zu einem großen Teil aus Artefakten, chimärischen PCR-Produkten und verkürzten PCR-Fragmenten. Dies hat einen großen Einfluss auf die Hybridisierungsergebnisse des DNA-Microarrays. Diese Artefakte können einerseits zu falsch positiven Ergebnissen führen, andererseits ist es möglich, daß vorhandene Spezies aufgrund ungenügender Amplifikation nicht detektiert werden. Weiterhin ist, bedingt durch diese Problematik, eine quantitative Auswertung der Ergebnisse schwierig, da sich die tatsächlichen Verhältnisse in der Probe durch die vielen Einflussfaktoren erheblich verändern.

Dennoch kann bei den Ergebnissen für die Bodenprobe "HKI-2293" von einer großen Zahl an tatsächlich positiven Hybridisierungssignalen und damit Spezies in der Probe ausgegangen werden, da die Hybridisierungsuntersuchungen der Probe "HKI-2293" mit dem PCR-freien

Verfahren der "capture-probe"-Oligonukleotide und dem enzymatischen Markierungsverfahren die gleichen Ergebnisse erzielten (s. u.).

4.4. Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays bei Verwendung von "capture-probe"-Oligonukleotiden

Im Laufe dieser Arbeit wurden alternative Markierungs- und Hybridisierungsmethoden untersucht. So wurde die Möglichkeit des direkten Nachweises einer Hybridisierung von Gesamt-DNA mittels "capture-probe"-Oligonukleotiden getestet. Diese "capture-probe"-Oligonukleotide sind 20mere, die in räumlicher Nähe zu den Zielsequenzen an die bereits spezifisch an die immobilisierten Gensonden hybridisierte Gesamt-DNA binden. Die Ergebnisse der Hybridisierungen von Gesamt-DNA isoliert aus *K. setae*, *K. griseola* und *K. mediocidica* waren vielversprechend. Die Spezies konnten unter Umgehung eines PCR-Schrittes direkt anhand ihrer Gesamt-DNA nachgewiesen werden.

Die Spezifität der Hybridisierungsergebnisse ist allerdings schlechter als die der herkömmlichen Methode unter Einbeziehung eines PCR-Amplifikationsschrittes. Weiterhin ist zur Detektion mit diesem Verfahren eine ausreichende Menge DNA nötig. Da keine Vervielfältigung der DNA stattfindet, können geringe Mengen nicht nachgewiesen werden. Bei den Experimenten waren einige falsch positive Signale zu erkennen. Dies lag an der Verwendung der "capture-probe"-Oligonukleotide die aufgrund ihrer relativ geringen Länge leicht mit den immobilisierten Gensonden hybridisieren können und so falsch positive Signale hervorrufen.

Diese Problematik müsste aber mit einem optimierten Design der "capture-probe"-Oligonukleotide zu verbessern sein. Außerdem kann man durch ein Kontrollexperiment bei dem ausschließlich "capture-probe"-Oligonukleotide hybridisiert werden relativ einfach die falsch positiven Signale diskriminieren. Damit kann der teure und nicht unproblematische (s. o.) PCR-Amplifikationsschritt vermieden werden. Die Umgehung dieses Schrittes ist für die Untersuchung von Umweltproben interessant, da, wie in Kap. 4.3. beschrieben, die PCR-Amplifikation hier besonders problembehaftet ist. Daher wurde die Probe "HKI-2293" mit dem PCR-freien Verfahren untersucht und die Spezies *K. mediocidica*, *K. paracochleata*, "*K. melanogena*", *K. cystarginea*, *K. nipponensis*, "*K. streptosporus*" *K. griseola* und *K. setae* detektiert. Weiterhin sind Signale bei den gattungsspezifischen Gensonden *Kitasatospora universal I/III*, und *Streptomyces/Kitasatospora universal* zu erkennen.

Damit konnten fünf Stämme sowohl ohne vorhergehende PCR-Amplifikation als auch mit einem PCR-Zwischenschritt nachgewiesen werden (*K. mediocidica*, "*K. melanogena*", *K. cystarginea*, "*K. streptosporus*" und *K. setae*). Es ist also davon auszugehen, daß diese Stämme sich tatsächlich in der Bodenprobe befinden und keine falsch positiven Signale bedingt durch PCR-Fehler vorliegen.

4.5. Hybridisierungsverhalten der gattungsspezifischen Gensonden mit den DNA-Microarrays "*Kitasatospora* I-III"

Parallel zu den spezies-spezifischen Gensonden wurden gattungsspezifische Gensonden mit der 16S-23S rDNA als Zielregion getestet. Die Gensonde '*Kitasatospora* universal I' diente dabei vor allem der verbesserten Diskriminierung der Gattungen *Kitasatospora* und *Streptomyces*. Die Ergebnisse aller Versuche dieser Arbeit ergaben, daß die Gensonde in der Lage war die beiden Gattungen sicher zu unterscheiden, denn nur Spezies der Gattung *Kitasatospora* ergaben ein positives Signal. Streptomyceten reagierten nicht. Dennoch wurde aufgrund neuer Sequenzdaten, die im Verlauf der Arbeiten zugänglich wurden, deutlich, daß einige Streptomyceten laut ihrer 16S-23S rDNA-Sequenz eventuell doch an die Gensonde binden könnten.

Daher wurden zwei neue Universal-Gensonden "*Kitasatospora* universal II und III" generiert. Experimente mit Spezies der Gattung *Streptomyces* ergaben auch hier in keinem der Experimente ein positives Hybridisierungssignal. Mit Hilfe der in dieser Arbeit etablierten Methode ist es also möglich die Gattungen *Kitasatospora* und *Streptomyces* schnell und eindeutig zu unterscheiden. Dies war bisher aufgrund der vielen morphologischen, physiologischen und biochemischen Gemeinsamkeiten schwierig. Die im zweiten Arraydesign getesteten gattungsspezifischen-Gensonden sowie einige FISH-Sonden wurden ebenfalls auf ihre Eignung als Gensonden überprüft. Es zeigte sich, daß die ausgewählten gattungsspezifischen Sonden eine zu geringe Spezifität besaßen. Das heißt, die Sonden reagierten auch bei Spezies anderer Gattungen positiv. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse der gattungsspezifischen Sonden zur Unterscheidung der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* stark von den Ergebnissen der gattungsspezifischen-Gensonden des zweiten Microarray-Designs zur Detektion anderen Actinomyceten. Bei den verwendeten FISH-Sonden (*Actinomycetes* universal, *Archea* universal, *Bacteria* universal, *Eucaria* universal) ist dies mit den verschiedenen Zielregionen des Sondendesigns zu begründen.

Die *Streptomyces* / *Kitasatospora* Sonden entstammen der 16S-23S rDNA-Region, die sich schon als gut geeignet für die Spezies-Unterscheidung gezeigt hatte, die FISH-Sonden hatten als Zielregion den konservierten Endbereich der 16S rDNA, der zu wenig Sequenzvariation zeigt. Die anderen gattungsspezifischen Gensonden (*Streptosporangium* universal, *Micromonospora* universal, *Frankia* universal, *Propionibacterium* universal, *Mycobacterium* universal, *Nocardia* universal) entstammten aber der 16S-23S rDNA-Region. Allerdings sind so die Actinomyceten-Gattungen nicht sicher unterscheidbar. Die Bereiche der ITS-Region, die nicht hochvariabel waren und sich somit für ein gattungsspezifisches Gensondendesign geeignet hätten, waren wiederum so hoch konserviert, daß sie keine Unterscheidung der Actinomyceten-Gattungen erlaubten. Die Unterscheidung der Gattungen *Kitasatospora* und *Streptomyces* mit Gensonden aus der ITS-Region ist durch die Wahl der Sonden aus hochvariablen Bereichen der ITS-Region bedingt, die allerdings nicht zu variabel waren, so daß alles Spezies der Gattung die Sequenz der Sonden aufwies.

Dieser Ansatz war jedoch nicht bei den anderen untersuchten Gattungen erfolgreich. So konnten bedingt durch die Sequenz der konservierten Bereiche der 16S-23S rDNA-Region nur weniger stringente Vorbedingungen bei Auswahl der Sonden eingehalten werden. Es wurden teilweise auch weniger als vier Mismatches zugelassen. Trotz des nicht optimalen Designs, kann der Grund für die nicht zufriedenstellenden Ergebnisse auch die Nichteignung der 16S-23S rDNA als Zielregion für gattungsspezifische Gensonden sein. Die konservierten Bereiche dieser an sich hochvariablen Region sind für zu viele Gattungen gleich. Das Funktionieren der Gattungsdiskriminierung bei *Kitasatospora* und *Streptomyces* liegt wahrscheinlich an der nahen Verwandtschaft der beiden Gattungen, denn die 16S-23S rDNA scheint für sehr spezifische Diskriminierungen sehr gut geeignet zu sein. Die Sonde *Kitasatospora* III, die hochspezifisch für die Gattung ist, entstammt auch einem hochvariablen Bereich. Für die Generierung von gattungsspezifischen Gensonden muss die Suche nach einer Zielregion erweitert werden. Genabschnitte wie die RNA polymerase beta-subunit (rpoB) [103] könnten hierzu geeignet sein.

4.6. Hybridisierungsverhalten der DNA-Microarrays mit enzymatischer Markierung

Zur Überprüfung des neuartigen, von Clondiag entwickelten, enzymatischen Markierungsverfahrens mittels Peroxidase-katalysierter Farbbildung wurden Hybridisierungsexperimente mit *K. cystarginea* sowie der Bodenprobe "HKI-2293" durchgeführt. Die Ergebnisse waren identisch zum herkömmlichen Markierungsverfahren. Diese neue Markierungsmethode bietet jedoch zwei Vorteile.

So ist die Entwicklungszeit der positiven Spots auf den Gensonden mit 5-10 min entscheidend kürzer als bei der herkömmlichen Gold-Silberpräzipitation. Bedingt dadurch treten nahezu keine Hintergrundsignale auf. So ist diese Markierungsmethode in der Lage, auch schwach positive Signale noch deutlich vom Hintergrund zu unterscheiden. Dies war bei der Gold / Silber-Markierung durch die recht starke Hintergrundfärbung oft schwierig. Die Schnelligkeit des Verfahrens sowie seine erhöhte Empfindlichkeit machen es dem herkömmlichen Verfahren deutlich überlegen.

4.7. Zusammenfassung und Ausblick

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die DNA-Microarray-Technologie erfolgreich zur Klassifikation und taxonomischen Einordnung von Actinomyceten genutzt werden kann. Mit dem erstellten "Taxonomie-Chip" konnte die taxonomische Klassifizierung der Gattungen *Streptomyces* und *Kitasatospora* erheblich verbessert werden. Die Etablierung dieses Hochdurchsatzverfahrens bedeutet eine große Beschleunigung des biologischen Screenings nach Gattungen mit bekannt hohem Sekundärstoffwechsel-Potential.

Die untersuchten *Kitasatospora* Stämme aus Reinkulturen und Mischungen konnten eindeutig und schnell mit der vorgestellten Oligonukleotid-Microarray-Methode identifiziert und taxonomisch eingeordnet werden. Die Bearbeitung von unbekanntem Isolat kann mit der erstellten Methode vereinfacht und beschleunigt werden. Damit ist die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Microarray-Technologie eine sinnvolle Ergänzung zu den herkömmlichen zeitaufwendigen morphologischen und chemotaxonomischen Untersuchungen zur Zuordnung von bakteriellen Isolat, da sie den Selektionsprozess bei der Kultivierung von unbekanntem Spezies erleichtert und Mehrfachbestimmungen vermindert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die etablierte Methode in der Lage ist, Actinomyceten ohne Kultivierungsschritt im Boden nachzuweisen, was wiederum eine erhebliche Beschleunigung des Screenings von Bodenproben ermöglicht. Außerdem erschließt sich so auch die große Zahl an bisher nicht kultivierbaren Mikroorganismen dem Screening nach neuen Naturstoffen. Durch Detektion der Mikroorganismen in der Bodenprobe wird es möglich für den jeweiligen Organismus gezielte Isolierungsstrategien zu entwickeln.

Der Ergebnisse dieser Arbeit liefern Ansatzpunkte für mögliche weiterführende Entwicklungen. Der in dieser Arbeit erstellte "Taxonomie-Chip" für die Gattung *Kitasatospora* könnte als Modell für weitere "Actinomyceten-Taxonomie-Chips" dienen.

Dabei wäre als erster Schritt die Einbeziehung der Gattung *Streptomyces* sinnvoll, denn durch diese Arbeit Sequenzdaten der 16S-23S rDNA-Region zahlreicher Streptomyceten vorliegen. Dazu wäre allerdings ein verändertes Chipdesign mit einer größeren Kapazität an Gensonden nötig. In weiteren Schritten könnten dann andere Gattungen der Actinomyceten einbezogen werden. Da allerdings die Kapazität von Microarrays begrenzt ist und die große mikrobielle Diversität die heutigen technischen Grenzen übersteigt, wäre auch die Erstellung eines hierarchischen Systems denkbar. Dafür könnten verschiedene Microarray-Module für einzelne Gattungen generiert und mit Hilfe übergeordneter Microarray-Module auf der Gattungsebene die einzelnen spezifischeren Microarray-Designs zur genaueren Analyse ausgewählt werden. Dazu müsste allerdings das Design der gattungsspezifischen Gensonden noch verbessert werden. Für einen solchen generalisierten Ansatz ist auch eine Kommerzialisierung denkbar. Neben der Suche nach neuen Naturstoffproduzenten ist noch eine Vielzahl anderer Anwendungsgebiete denkbar. So ist eine Übertragung der im Laufe dieser Arbeit etablierten DNA-Microarray-Technologie, basierend auf Gensonden die aus der ITS-Region generiert wurden, auch auf die mikrobielle Wasserüberwachung, die Diagnostik von pathogenen Mikroorganismen sowie die Reinheitskontrolle von Parenteralia und Lebensmitteln möglich.

5. Literatur

1. Anderson, A.S., Wellington, E.M., *The taxonomy of Streptomyces and related genera*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2001. **51**: p. 797-814.
2. Waksman, S.A., Henrici, A.T., *The nomenclature and classification of the actinomycetes*. J. Bacteriol., 1943. **46**: p. 337-41.
3. Shirling, E.B., Gottlieb, D., *Cooperative description of type cultures of Streptomyces. III. Additional species descriptions from first and second studies*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1968. **18**: p. 279-391.
4. Shirling, E.B., Gottlieb, D., *Cooperative description of type cultures of Streptomyces. IV. Species descriptions from second, third, and fourth studies*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1969. **19**: p. 392-512.
5. Williams, S.T., Vickers, J.C., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. and Mortimer, A.M., *Numerical classification and identification of streptomycetes*. Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes(L Ortiz-Ortiz, L F Bojalil and V Yakoleff, eds) Academic Press, Orlando, San Diego., 1984: p. 537-51.
6. Williams, S.T., Goodfellow, M., Alderson, G., *Genus Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339AL*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by S. T. Williams & M. E. Sharpe. Baltimore: Williams & Wilkins., 1989. **4**.
7. Pridham, T.G., Tresner, H.G., *Genus I, Streptomyces Waksman and Henrici 1943,339.*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Edited by S. T. Williams & M. E. Sharpe. Baltimore: Williams & Wilkins., 1974. **8**: p. 748-829.
8. Sneath, P., Sokal, R . *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Co., San Francisco., 1973.
9. Goodfellow, M., Williams, S.T., Alderson, G., *Transfer of Elytrosporangium brasiliense Falcão de Morais et al., Elytrosporangium carpinense Falcão de Morais et al., Elytrosporangium spirale Falcão de Morais, Microellobosporia cinerea Cross et al., Microellobosporia flavea Cross et al., Microellobosporia grisea (Konev et al.) Pridham and Microellobosporia violacea (Tsyganov et al.) Pridham to the genus Streptomyces, with emended descriptions of the species*. Syst. Appl. Microbiol., 1986. **8**: p. 48-54.
10. Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A., *Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1970. **20**: p. 435-43.
11. Wellington, E.M.H., Williams, S.T., *Host ranges of phages isolated to Streptomyces and other genera*. Schaal, K.P., Pulverer, G.,:Actinomycetes. Zentralbl. Bakteriol. Suppl. , Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1981. **11**: p. 93-98.
12. Labeda, D.P., *DNA-DNA hybridization in the systematics of Streptomyces*. Gene, 1992. **115**: p. 249-53.
13. Kirby, R., Rybicki, E.P., *Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) as a means of taxonomic analysis of Streptomyces nad related organisms*. J. Gen. Microbiol., 1986. **132**: p. 1891-94.
14. Beyazova, M., Lechevalier, M.P., *Taxonomic utility of restriction endonuclease fingerprinting of large DNA fragments from Streptomyces strains*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1993. **43**: p. 674-82.
15. Liesack, W., Weyland, H., Stackebrandt, E., *Potential risks of gene amplification by PCR as determined by 16S rDNA analysis of a mixed-culture of strict barophilic bacteria*. Microb. Ecol., 1991. **21**: p. 191-198.
16. Groth, I., Schutze, B., Boettcher, T., Pullen, C.B., Rodriguez, C., Leistner, E., Goodfellow, M., *Kitasatospora putterlickiae sp. nov., isolated from rhizosphere soil*,

-
- transfer of Streptomyces kifunensis to the genus Kitasatospora as Kitasatospora kifunensis comb. nov., and emended description of Streptomyces aureofaciens Duggar 1948. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 2003. 53(6): p. 2033-40.*
17. Omura, S., Takahashi, Y., Iway, Y., Tanaka, H., *Kitasatospora, a new genus of the order Actinomycetales. J. Antibiot., 1982. 35: p. 1013-19.*
 18. Wellington, E.M., Stackebrandt, E., Sanders, D., Wolstrup, J., Jorgensen, N.O., *Taxonomic status of Kitasatospora, and proposed unification with Streptomyces on the basis of phenotypic and 16S rRNA analysis and emendation of Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339AL. Int. J. Syst. Bacteriol., 1992. 42(1): p. 156-60.*
 19. Ochi, K., Hiranuma, H., *A taxonomic review of the genera Kitasatospora and Streptovercillium by analysis of ribosomal protein AT-L30. Int. J. Syst. Bacteriol., 1994. 44: p. 285-92.*
 20. Zhang, Z., Wang, Y., Ruan, J., *A proposal to revive the genus Kitasatospora (Omura, Takahashi, Iwai, and Tanaka 1982). Int. J. Syst. Bacteriol., 1997. 47(4): p. 1048-54.*
 21. Kim, S.B., Lonsdale, J., Seong, C.N., Goodfellow, M., *Streptacidiphilus gen. nov., acidophilic actinomycetes with wall chemotype I and emendation of the family Streptomycetaceae (Waksman and Henrici 1943AL) emend. Rainey et al. 1997. Antonie van Leeuwenhoek, 2003. 83: p. 107-16.*
 22. Korn-Wendisch, F., Kutzner, H.J., *The family Streptomycetaceae. The Prokaryotes, Second edition., Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W, and Schleifer, K.H. SpringerVerlag., 1992. I: p. 1992-95.*
 23. Wildermuth, H., Hopwood, D.A., *Septation during sporulation in Streptomyces coelicolor. J. Gen. Microbiol., 1970. 60.*
 24. Chater, K.F., Merrick, M.J., *Streptomyces. J. H. Parish (ed.), Developmental biology of prokaryotes, Blackwell, Oxford, England., 1979. 1.: p. 93-114.*
 25. Saitou, N., Nei, M., *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 1987. 4(4): p. 406-25.*
 26. Felsenstein, J., *Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. Annual Review of Genetics, 1988. 22: p. 521-65.*
 27. Swofford, D.L., Olsen, G.J., *Phylogeny reconstruction. In Hillis, D. M. and Moritz, C., edit., Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts., 1991.*
 28. Henning, W., *Phylogenetic Systematics. University of Illinois Press, London, 1966.*
 29. Kuhls, R., *Promotionsarbeit: Anwendung und Bewertung DNA-analytischer Methoden zur Lösung taxonomischer Fragestellungen bei filamentösen Pilzen am Beispiel der Gattung Trichoderma. Berlin, 1997.*
 30. Swofford, D.L., *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (PAUP), version 3.0s. Illinois Natural History Survey, Champaign, Illinois, USA, 1991.*
 31. Hillis, D.M., Bull, J.J., *An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analyses. J. Syst. Biol., 1993. 42: p. 182-92.*
 32. Wayne, L.G., Brenner, D.J., Colwell, R.R., *International Committee on Systematic Bacteriology. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. Int. J. Syst. Bacteriol., 1987. 37: p. 463-64.*
 33. Witt, D., Stackebrandt, E., *Unification of the genera Streptovercillium and Streptomyces, and amendation of Streptomyces Waksman and Henrici 1943, 339 AL. Journal Syst. Appl. Microbiol., 1990. 13: p. 361-71.*
 34. Redenbach, M., Flett, F., Piendl, W., Glocker, I., Rauland, U., Wafzig, O., Kliem, R., Leblond, P., Cullum, J., *The Streptomyces lividans 66 chromosome contains a 1 MB deletogenic region flanked by two amplifiable regions. Mol. Gen. Genet., 1993. 241: p. 255-62.*

-
35. Rauland, U., Glocker, I., Redenbach, M., Cullum, J., *DNA amplifications and deletions in Streptomyces lividans 66 and the loss of one end of the linear chromosome*. Mol. Gen. Genet., 1995. **246**: p. 37-44.
 36. Roberts, M.A., Crawford, D.L., *Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA as a Means of Developing Genus- and Strain-Specific Streptomyces DNA Probes*. Appl. Environ. Microbiol., 2000. **66**(6): p. 2555-64.
 37. Mehling, A., Wehmeier, U.F., Piepersberg, W., *Nucleotide sequences of streptomycete 16S ribosomal DNA: towards a specific identification system for streptomycetes using PCR*. microbiology, 1995. **141**: p. 2139-47.
 38. Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmid, T.M., Tiedje, J.M., *The RDP-II (ribosomal database project)*. Nucleic Acids Research, 2001. **29**: p. 173-74.
 39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
 40. Woese, C.R., *Bacterial Evolution*. Microbiol. Rev., 1987. **51**: p. 221-72.
 41. Schleifer, K.H., Ludwig, W., *Phylogenetic relationships of bacteria*. In B. Fernholm, K. Bremer, and H. Jörnvall (ed.), *The hierarchy of life*. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, The Netherlands., 1989: p. 103-17.
 42. Stackebrandt, E., *Phylogenetic relationship vs. phenotypic diversity: how to achieve a phylogenetic classification system of the eubacteria*. Can. J. Microbiol., 1988. **34**: p. 552-56.
 43. Ludwig, W., Schleifer, K.H., *Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis*. FEMS Microbiol. Reviews, 1994. **15**: p. 155-73.
 44. Drancourt, M., Bollet, C., Carlouz, A., Martelin, R., Gayral, J.P., Raoult, D., *16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates*. J. Clin. Microbiol., 2000. **38**(10): p. 3623-3630.
 45. Stackebrandt, E., Witt, D., Kemmerling, C., Kroppenstedt, R., Liesack, W., *Designation of Streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes*. Appl. Environ. Microbiol., 1991. **57**(5): p. 1468-77.
 46. Gurtler, V., Stanisich, V.A., *New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region*. Microbiology, 1999. **145**(1): p. 2-3.
 47. Hain, T., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R.M., Stackebrandt, E., Rainey, F.A., *Discrimination of Streptomyces albidoflavus strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1997. **47**: p. 202-206.
 48. Jensen, M.A., Webster, J.A., Straus, N., *Rapid identification of bacteria on the basis of polymerase chain reaction-amplified ribosomal DNA spacer polymorphisms*. Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**(4): p. 945-52.
 49. Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.H., *In situ probing of gram-positive bacteria with high DNA G+C content by using 23S rRNA-targeted oligonucleotides*. Microbiology, 1994. **140**: p. 2849-58.
 50. Liao, D., Dennis, P.P., *Molecular phylogenies based on ribosomal protein L11, L1, L10, and L12 sequences*. J. Mol. Evol., 1994. **38**: p. 405-19.
 51. Clayton, R.A., Sutton, G., Hinkle, P.S., Bult, C., Fields, C., *Intraspecific variation in small-subunit rRNA sequences in GenBank: why single sequences may not adequately represent prokaryotic taxa*. Int. J. Syst. Bacteriol., 1995. **45**: p. 595-99.
 52. von Wintzingerode, F., Gobel, U.B., Stackebrandt, E., Selent, B., Göbel, U.B., *Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis*. FEMS Microbiol. Rev., 1997. **21**(3): p. 213-29.

-
53. Farrelly, V., Rainey, F.A. Stackebrandt, E., *Effect of genome size and rrn gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species.* Appl. Environ. Microbiol., 1995. **61**(7): p. 2798–2801.
 54. Suzuki, M.T., Giovannoni, S.J., *Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR.* Appl. Environ. Microbiol., 1996. **62**(2): p. 625–30.
 55. Speksnijder, A., Kowalchuk, G., De Jong, S., Kline, E., Stephen, J.R., Laanbroek, H.J., *Microvariation Artifacts Introduced by PCR and Cloning of Closely Related 16S rRNA Gene Sequences.* Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(1): p. 469–72.
 56. Huddleston, A.S., Cresswell, N., Neves, M., Beringer, J.E., Baumberg, S., Thomas, D.I., Wellington, E.M., *Molecular detection of streptomycin-producing streptomycetes in Brazilian soils.* Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**(4): p. 1288-97.
 57. Stackebrandt, E., Liesack, W., Witt, D., *Ribosomal RNA and rDNA sequence analyses.* Gene, 1992. **115**: p. 255-60.
 58. Kataokaa, M., Uedaa, K., Kudob, T., Sekia, T., Yoshida, T., *Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus Streptomyces.* FEMS Microbiology Letters, 1997. **151**(2): p. 249-55.
 59. Nakamura, Y., Ishii, K., Ono, E., Ishihara, M., Kohda, T., Yokogawa, Y., Shibai, H., *A novel naturally occurring Carbapenem antibiotic, AB-110-D produced by Kitasatosporia papulosa novo sp.* J. Antibiot., 1988. **41**: p. 707-11.
 60. Schena, M., Davis, R.W., *Parallel Analysis with Biological Chips.* PCR Methods Manual (eds. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky), Academic Press, San Diego., 1998.
 61. Ramsay, G., *DNA chips - states-of-the-art.* Nature Biotechnology, 1998. **16**(1): p. 40-44.
 62. Marshall, A., Hodgson, J., *DNA chips - an array of possibilities.* Nature Biotechnology, 1998. **16**(1): p. 27-31.
 63. Köhler, J.M., Mejevaia, T., Saluz, H.P., *Microsystem Technology: A Powerful Tool for Biomolecular Studies.* Birkhäuser Verlag Basel, 1999.
 64. Kane, M.D., Jatkoe, T.A., Stumpf, C.R., Lu, J., Thomas, J.D., Madore, S.J., *Assessment of the sensitivity and specificity of oligonucleotide (50mer) microarrays.* Nucleic. Acids Res., 2000. **28**(22): p. 4552-57.
 65. MacBeath, G., Schreiber, S.L., *Printing Proteins as Microarrays for High-Throughput Function Determination.* Science, 2000. **289**(5485): p. 1760-63.
 66. Ziauddin, J., Sabatini, D.M., *Microarrays of cell expressing defined cDNAs.* Nature, 2001. **411**: p. 107-110.
 67. Bowtell, D.D.L., *Options available — from start to finish — for obtaining expression data by microarray.* Nature Genetics, 1999. **21**(supplement): p. 25-32.
 68. Cheung, V.G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R., Childs, G., *Making and reading microarrays.* Nature Genetics, 1999. **21**(supplement): p. 15 - 19.
 69. Lockhart, D.J., Winzeler, E.A., *Genomics, gene expression and DNA arrays.* Nature, 2000. **405**(6788): p. 827-36.
 70. Hacia, J.G., *Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.* Nature genetics, 1999. **21**(supplement): p. 42 - 47.
 71. Wang, D.G., Fan, J.B., Lander, E.S., *Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome.* Science, 1998. **280**(5366): p. 1077-82.
 72. Debouck, C., Goodfellow, P.N., *DNA microarrays in drug discovery and development.* Nature Genetics, 1999. **21**(supplement): p. 48-50.
 73. Chakravarti, A., *Population genetics—making sense out of sequence.* Nature Genetics, 1999. **21**(supplement): p. 56-60.

-
74. Nuwaysir, E.F., Bittner, M., Trent, J., Barrett, J.C., Afshari, C.A., *Microarray and Toxicology: The Advent of Toxicogenomics. Molecular Carcinogenesis*. Molecular Carcinogenesis, 1999. **24**: p. 153-59.
 75. Letowski, J., Brousseau, R., Masson, L., *DNA-Microarray Applications in Environmental Microbiology*. Analytical Letters, 2003. **36**(15): p. 3165-84.
 76. Guschin, D.Y., Mobarry, B.K., Proudnikov, D., Stahl, D.A., Rittmann, B.E., Mirzabekov, A.D., *Oligonucleotide microchips as gene sensors for determinative and environmental studies in microbiology*. Appl. Environ. Microbiol., 1997. **63**: p. 2397-2402.
 77. Liu, W.T., Mirzabekov, A., Stahl, D.A., *Optimization of oligonucleotide microchip in microbial community structure studies by a non-equilibrium dissociation approach*. Environ. Microbiol., 2001. **3**: p. 619-29.
 78. Call, D.R., Brockman, F.J., Chandler, D.P., *Detecting and genotyping Escherichia coli O157 : H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays*. Int. J. Food Microbiol., 2001. **67**(1-2): p. 71-80.
 79. Chizhikov, V., Rasooly, A., Chumakov, K., Levy, D.D., *Microarray Analysis of Microbial Virulence Factors*. Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(7): p. 3258-63.
 80. Wilson, W.J., Strout, C L., DeSantis, T.Z., Stilwell, J.L., Carrano, A.V., Andersen, G.L., *Sequence specific identification of 18 pathogenic microorganisms using microarray technology*. Molecular and Cellular Probes, 2002. **16**: p. 119-27.
 81. Zhou, J., Thompson, D.K., *Microarray Technology and Applications in Environmental Microbiology*. Sparks, D. L. (ed.), Advances in Agronomy, Elsevier Inc., San Diego, CA, 2003. **82**.
 82. Wilson, K.H., Wilson, W.J., Radosevich, J.L., DeSantis, T.Z., Viswanathan, V.S., Kuczumarski, T.A., Andersen, G.L., *High density microarray of small subunit ribosomal DNA probes*. Appl. Env. Micro., 2002. **68**: p. 2535-41.
 83. Loy, A., Lehner, A., Lee, N., Adamczyk, J., Meier, H., Ernst, J., Schleifer, K.H., Wagner, M., *Oligonucleotide microarray for 16S rRNA gene-based detection of all recognized lineages of sulfate-reducing prokaryotes in the environment*. Appl. Environ. Microbiol., 2002. **68**(5064–81).
 84. Peplies, J., Glockner, F.O. Amann, R., *Optimization strategies for DNA microarray-based detection of bacteria with 16S rRNA-targeting oligonucleotide probes*. Appl. Environ. Microbiol., 2003. **69**(3): p. 1397-1407.
 85. Stine, O.C., Carnahan, A., Singh, R., Powell, J., Furuno, J.P., Dorsey, A., Silbergeld, E., Williams, H.N. Morris, J.G., *Characterization of microbial communities from coastal waters using microarrays*. Environ. Monit. Assess., 2003. **81**: p. 327-36.
 86. Small, J., Call, D.R., Brockman, F.J., Straub, T.M., Chandler, D.P., *Direct Detection of 16S rRNA in Soil Extracts by Using Oligonucleotide Microarrays*. Appl. Environ. Microbiol., 2001. **67**(10): p. 4708–16.
 87. Chandler, D.P., Newton, G.J., Small, J.A., Daly, D.S., *Sequence versus Structure for the Direct Detection of 16S rRNA on Planar Oligonucleotide Microarrays*. Appl. Environ. Microbiol., 2003. **69**(5): p. 2950–2958.
 88. Prauser, H., Schütze, B., Martin, K., *IMET (National collection of Microorganisms) Catalogue of Strains*. ZIMET, Jena, 1987.
 89. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press: p. 183-84.
 90. Birnboim, H.C., Doly, J., *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res., 1979. **7**: p. 1513-23.
 91. Hanahan, D., *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J. Mol. Bio., 1983. **166**: p. 557-80.

-
92. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977. **74**: p. 5463-67.
 93. Adelhelm, K., Ericht, R., Ermantraut, E., *ArrayTubes - DNA-technology for every lab*. Laborwelt, 2002. **4**.
 94. Higgins, D.G., Bleasby, A.J., Fuchs, R., *CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment*. Comput. Appl. Biosci., 1992. **8**(2): p. 189-91.
 95. Fugen, L., Stormo, G.D., *Selection of optimal DNA oligos for gene expression arrays*. Bioinformatics, 2001. **17**(11): p. 1067-76.
 96. Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., *Basic local alignment search tool*. J. Mol. Biol., 1990. **215**: p. 403-10.
 97. <http://www.broad.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3> www.cgi.
 98. Chee, M., Yang, R., Hubbell, E., Berno, A., Huang, X.C., Stern, D., Winkler, J., Lockhart, D.J., Morris, M.S., Fodor, S.P., *Accessing genetic information with high-density DNA arrays*. Science, 1996. **274**: p. 610-14.
 99. http://www.genomatix.de/online_help/help/tools_help.html.
 100. www.genedetect.com
 101. Groth, I., *persönliche Mitteilung*. 2004.
 102. Ehricht, R., *persönliche Mitteilung*. 2004.
 103. Kim, B.J., Kim, C.J., Chun, J., Koh, Y.H., Lee, S.H., Hyun, J.W., Cha, C.Y., Kook, Y.H. and I, *Phylogenetic analysis of the genera Streptomyces and Kitasatospora based on partial RNA polymerase beta subunit gene (rpoB) sequences*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(2): p. 593-598.
 104. <http://www.dsmz.de/bactnom/bactname.htm>, *Bacterial Nomenclature Up-to-date*.
 105. Tebbe, C.C., Vahjen, W., *Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast*. Appl. Environ. Microbiol., 1993. **59**: p. 2657-2665.
 106. Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S., Pace, N.R., *Differential amplification of ribosomal RNA genes by PCR*. Appl. Environ. Microbiol., 1992. **58**: p. 3417-3418.

Anhang A

Partielle 16S-23S rDNA Sequenzen der in dieser Arbeit sequenzierten Actinomyceten.

Amycolatopsis orientalis subsp. orientalis

1 TGCCAAGGCA TCCACCGTGC GCCCTTAAAA ACTTGGCCAC AGATGCTCGC GTCCACTGTG
61 CAGTTCTCAA GCAACGACCA GCCACCCACC ACCCCCGGAA AGATCCGGAG TTCACTGGGG
121 CCGGCGTTTG AAGGACAGCC TTACGGCCGT GCCCTCAGAC ACCCAACAGC GTGCCCGACA
181 CATCCAGATG GTCCATCACG TTCCACGCCG AAGCAGTACT AGTGAGGTCC AACCGAGTGT
241 GCCGAGTAGT CAACGTTCCA CCCATGAGCA ACCAGCATCA GACGTTTCGCT GATGTTCTGG
301 CCTCTGACTC GGACAAGTCC GAGTGAGAAG TGCTCCCTAG AAAGGAGG

Kitasatospora kifunensis

1 AAGGAGCACA TAGCCGGTTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACTGGGT GATGGTTTCGT GAGTACTGCT TCGGCGTGGA AAGCGTTTCT
121 TGAGTCTGGT GTGTCGGGCA CGTTGTTGGG TCCTGAGGGA ACGAGTAATC GTTGTCTCAG
181 TGCCGGTCCC ATGCTTGTTG AGGTGGGTGT CTGGTTCGTTG TTTGAGAACT GCACAGTGGA
241 CGCGAGCATC TGT

Kitasatospora azatica

1 AAGGAGCACA TAGCCGGTTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACTGGGT GATGGTTTCGT GAGTACTGCT TCGGCGTGGA AAGCGTTTCT
121 GAGTCTGGTG TGTCGGGCAC GTTGTGGGT CCTGAGGGAA CGGCCGTATG GTCTGAACCT
181 CGAGGATGCC GGTCCCACGG ACAGTACTCG TTTTCGGGTG GTGTAGGTGG GTGTCTGGTC
241 GTTGCTTGAA AACTGCCAG TGGCA

Kitasatospora cineracea

1 AAGGAGCACA CGGCAGCTTC GGGCGAATGT CCCGGAGTGC TAGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT GATGGAGATC GCGAGTACTG CCCTTCCGGG GCGTGAAAAG
121 CCGCGTTCCG GAGGCGGGTG TGTCGGGCAC GTTGTGGGT CCTGAGGGAA CGGCCAGTGG
181 TCGTTGTCTT CAGGTTGCCG GCCTCATGCC GGGCGTCCCT GTCTTGGGGG TGTCGGGTTT
241 GGGTGTCTGG TCGTTGTTTG AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTGT

Kitasatospora cochleata

1 AAGGAGCACA CGGCAGCTTC GGCCGAATGT CCCGGAGTGC TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACTCGGT AGGGATCACT AGTACTGCTT CCGGCGTGGA GACGTGGTCA
121 CCAGCTTGGT GTGTCGGGCA CGTTGTTGGG TCCTGAGGGA CGGAGTGATC GTTGCCCTCAT
181 GGAGTGCCCG TCCCATGCCG GCGTCCCTG TACTGGGGGT GTCGGGGGTG GGTGTCTGGT
241 CGTTGTTTGA GAACTGCACA GTGGACGCGA GCATCTGT

Kitasatospora cystarginea

1 AAGGAGCACA TAGCCGACTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACGGTTCGG GATCGGCCAC TAGTACTGCT TCGGCGTGGA ACGTGGGTTT
121 GTGACTGGGT CGTGTGCGGC ACGTTGTTGG GTCCTGAGGG AGCGGCCGTT TGGCTGGTAC
181 CTCATGGTTG CCGGTCTCAT GTGAAGGAGT CTCGTGTTCC GGGTTCTGGA GTGTGGGTGA
241 CTGGTCGTTG TTTGAGAACT GCACAGTGGA CGCGAGCATC TGT

Kitasatospora gansuanensis

1 AAGGAGCACA TAGCCGGATG TGAGCGAATG TCTCACACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT CTGTTGGCCT CACAAGTACT GCTTCGGCGT GGAAAGTGAG
121 ACCAAGCGAG GTCGGGTGTG TCGGGCACGT TGTTGGGTCC TGAGGGAACG GCCGTATGGT
181 CGTTGCTTCA GTGCCGGTCC TACTTGAGTG GTGCGTCAAA GCGCTGCGAG GGTGGGTGTC
241 TGGTCGTTGT TTGAGAACTG CACAGTGAC GCGAGCATCT

Kitasatospora griseola

1 AAGGAGCACA TAGCCGCTTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACGCGGT GATGACCGTC AGTACTGCC CCTGGGGTGT GGAACGCGGG
121 TTCGGAGTCG GGTGTGTCGG GCACGTTGTT GGGTCCTGAG GGAACGAGTG ATCGTTTCTT
181 CTGGGATGCC GGCCTCATGC GAGGCGCCCG TGAGGGTTGC CGAGTTTGGG TGTCTGGTCC
241 TTGTTTGAGA ACTGCACAGT GGACGCGAGC ATCTGT

Kitasatospora mediocidica

1 AAGGAGCACA TAGCCGCTTG CGAGCAAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT TGAAGTCGTT AGTACTGTCC TTCGGGGCGT GGAACGCGGT
121 GGAGGTCGGG TGTGTGCGGC ACGTTGTTGG GTCCTGAGGG AACGGAAGTT GCCTCAAGGA
181 TGCCGGCCCC ACTGAAGGTA CGTTTCTGCG TACTGGCGGT GGGTGTCTGG TCGTTGTTTG
241 AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTGTG

Kitasatospora niigatensis

1 AAGGAGCACA TAGCCGAATG CGAGCGCATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACAGGAAGC GAACAGGTCG CCAGTACTGC CCCCTCGGGG CGTGGAAGC
121 GGTTCTCTGG GAGTGACTGT GCCGGGCACG TTGTTGGGTC CTGAGGGAAC GAGTGATCGT
181 TTTCTCATGG ATGCCGGCCT CACTTGAGGG TGCGTCATGC TCCTGAGGGT GGGTGTCTGG
241 TCGTTGTTTG AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTG

Kitasatospora paracochleata

1 AAGGAGCACA TGGCAGCTTC GGGCGAATGT CCCGGAGTGC TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACAGGAAGT GAACAGAGAG CTCAGTACTG CTCTTGCGC CGGAAGAGAT
121 TCTGGATGCA GTGTGTCGGG CACGTTGTTG GGTCTGAGG GAACGGGTAA TCGTTGCCTC
181 ATGGAGTGCC GGTCCCATGC CGGGCGTCCC TGTCTTGGGG GTGTTTCGGGT TTGGGTGTCT
241 GGTCGTTGTT TGAGAACTGC ACAGTGGTGC CGAGCATCTG T

Kitasatospora phosalacinea

1 AAGGAGCACA TGGCCGGTTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT TGGGATCTGC CAGTACTGCC TCTCGGGGCG TGAAGACAG
121 GGACCGCTTG GTGTGTCGGG CACGTTGTTG GGTCTGAGG GAACGGCTTG CCGTTGTCTC
181 TTGGATGCCG GCTCCACTGG ACGGGTGTGT TTCGCTGCCC GATGGTGGAT GTCTGGTCTG
241 TGTTTGAGAA CTGCACAGTG GACGCGAGCA TCTGT

Kitasatospora putterlickiae

1 AAGGAGCACA TAGCAGCTTC GGGCGAATGT CCCGGAGTGC TCGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACTGGGT TTGGTCCTGT TAGTACTGCT TCGGCGTGGG ACACAGGGCG
121 TCTCATCCGG TGTGTCGGGC ACGTTGTTGG GTCCTGAGGG AACGGAAACG TACCTCGGTG
181 ATGCCGGCCC CATGCTGTT GAGGTGGGTG TGTGGTGTTC GTTTGAGAAC TGCACAGTGG
241 ACGCGAGCAT CTGT

Kitasatospora setae

1 AAGGAGCACA TAGCCGGATG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACGATGAAC GAGACGAGCG GTAGTACTGC TTCGGCGTGG AAAGCGCTTC
121 GTCTGGTCGT CGGGTCGGGC ACGTTGTTGG GTCCTGAGGG AACGAGTAAT CGTTGTCTTC
181 AGGTTGGCCC CTCATGCCGG GCGTCCCTGT CTTGGGGGTG TCGGGTTTGG GTGTCTGGTC
241 GTTGTGTTGAG AACTGCACAG TGGACGCGAG CATCTGT

Kitasatospora terrestris

1 AAGGAGCATC TAGATTCCGC AAGGAATCCA GAGCCACTAC GTCGACAAAT GTTCGACGGT
61 GGTCAGCTCA TGGGTGGAAC GTTACTATT CAGTACCTGG TGTTTCAGCC GGGACGCGAG
121 TACTGCTCCT CGGAGCGTGG AAAGCGAACT GAATGAATTC CGGGTACTGT GCGCGCTGTT
181 GGGTGTCTGA AGGTATGGTC GTAAGGCTGC CTTGACGCC GGGCCAGTG AACTCGTCCC
241 CAAGGACGGG GTGATGGGTG GCTGGTCGTT GTTTGAGAAC TGCGCAGTGG ACGCGAGCAT
301 CTGT

Saccharopolyspora erythraea

1 TGCCAAGGCA TCCACCATGT GCCCTTTCAA ACTTGGCCAC AAAGATGCTC GCATCCACTA
61 TACAGTTCTC AAACAACAAC CAGACGAGCC CACACACAGT GTGTTCCCTC AGGACCCAAC
121 AACGTGCCAA ACGATCTTCA AGCCTTGAAC AACAAGACCA ACGGTCAGCG TTTCCACTAA
181 TCCTCCGAGC ACCCACAGCG CAAGAACACT CGCCTTGCCC ACCATGGACA CCCCACCAAC
241 AGACAACACTGT C

Saccharothrix mutabilis subsp. capreolus

1 AAGGAGGTGG ATCAATTCTG CCAAGGCATC CACCGTATGC CCTTAATAAC TTGCCACAAA
61 GATGCTCGCA TCCACGTGTG CAGTTCTCAA AGAACAACCA GACACCCCGT CACCACTGCC
121 GACGCCTACC AGCTACCTGG CGAATTCGAG AGGCGGACAA GGCCCTGTGT CGGCTCGCTG
181 AAAGAGACAC TCGCGTGTTT TCTCAGGACC CAACAGCGTA CCGAACAGAA ACCCTGAACC
241 CTCTGGAGAC CTTTCCACGC TCTTGCGAGC AGTACTAACT CTCCCGACAA TCCGAGATCC
301 TGCATTAGCC AGCATCCACT AATATGAGCT CCACCCGACG ATCGTTCGCC GTCGGCGTGG
361 CCTCCGAGCC ACCGAAGCAG CTCGC

Stamm "HKI-2147-7"

1 AAGGAGGTGG ATCCAACCGG ATCCCGGCTT CGGCGTGAA AACAGTTCAA GAGGCGGGGA
61 GTGTCGGGCA CGCTGTTGGG TGTCTGAGGG AGCGGCCACG ATTTGGCTGT TTCTTCGGTT
121 GCCGGCCCCG GTATAGGTCT ACGTGATGTG GGTGTGACG GGTGGTTGGT CGTTGTTTGA
181 GAACTGCACA GTGGACGCGA

Stamm "HKI-6Z T A 26"

1 AAGGAGCACA TAGCCGCTTG CGAGCAAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTTCG CACACACGGT TGAAGTCGTT AGTACTGTCC TTCGGGGCGT GGAACGCGGT
121 GGAGGTCGGG TGTGTCGGGC ACGTTGTTGG GTCCTGAGGG AACGGAAGTT GCCTCAAGGA
181 TGCCGGCCCC ACTGAAGGTA CGTTTCTGCG TACTGGCGGT GGGTGTCTGG TCGTTGTTTG
241 AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTG

Stamm "HKI-2122-22"

1 AAGGAGGTGG ATCCAACCGG ATCCCGAAT CACTAGTGAA TTCGCGGCCG CCTGCAGGTC
61 GACCATATGG GAGAGCTCCC AACGCGTTGG ATGCATAGCT TGAGTATTCT ATAGTGTAC
121 CTAAATAGCT TGGCGTAATC ATGGTCATAG CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC
181 ACAATTCCAC ACAACATACG AGCCGGAAG CATAAAGTGT AAAGCCTGGG GTGCCTAATG
241 AGTGAGCTAA CTCACATTAA TTTGCGTTGC GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAAAC
301 CTGTCGTGCC AGCTGCA

Stamm "HKI-2122-18"

1 AAGGAGCACA TGGCCGGATG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT GAAGACCGCC AGTACTGCC CTCGGGGCGT GGAACGCGGT
121 TCGGAGTCGG GTGTGTCCGG CACGTTGTTG GGTCTGAGG GAACGAGTCT TCGTTGTCTC
181 AGTGGTCGCC GGCCTCATGC GAGGCATTCC GGTTCGGGG TGTTGAGTTT GGGTGTCTGG
241 TCGTTGTTT AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTGTG GCCAAGTTTT TAAGGGCGCA
301 CGGCGGATGC CTTGGTATAA TCACTAGTGA ATTC

Stamm "HKI-2193-175"

1 AAGGAGCACA TGGCCGGATG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACACACGGT GAAGACCGCC AGTACTGCC CTCGGGGCGT GGAACGCGGT
121 TCGGAGTCGG GTGTGTCCGG CACGTTGTTG GGTCTGAGG GAACGAGTCT TCGTTGTCTC
181 AGTGGTCGCC GGCCTCATGC GAGGCATTCC GGTTCGGGG TGTTGAGTTT GGGTGTCTGG
241 TCGTTGTTT AGAACTGCAC AGTGGACGCG AGCATCTGTG GCCAAGTTTT TAAGGGCGCA
301 CGGCGGATGC CTTGGTATAA TCACTAGT

Stamm "HKI-J07"

1 AAGGAGCACA TAGCCAGCAC TCGGACGAAT GTTCCGGGTT GGTNGCTCAT GGGGGGAACG
61 TTAGTATTC TTTTTTCACG GTTGATACCG CTAGTACTGT CCTTCGGGGC GTGGAACGCG
121 GTGGGGTTCG GGTGTGTCCG GCACGTTGTT GGGTCTGAG GGAACGGCCG TCATGGTCTG
181 AACCTCTAGG ATGCCGGTCC CACTGAAGGT GCACGTCTTG TCGCTGGTG GTGGGTGTCT
241 GGTCGTTGTT CGAGAACTGC ACAGCGGACG CGAGCCTCTG

Stamm "HKI-2191-42"

1 AAGGAGCACA TGGCCGGTTG CGAGCGAATG TCTCGCACGG TTGCTCATGG GTGGAACGTT
61 GACTATTCGG CACATCGAGT ATGGGTCTGT CAGTACTGCT CCTCCGGGGG CGTGGAACGC
121 GGGGACCGCT TGGTGGGTCG GGCACGCTGT TGGTCTGTA GGGAACGATT TTTTCGTTCG
181 CCTCTGGGAT GCCGGCCTCA CTTGAGGGTT GTCTTCGGAC GGTTCGCGGG TGGGTGTCTG
241 GTCGTTGTTT GAGAACTGCA CAGTGGACGC GAGCATCTGT GGCCAAGTTTT TTAAGGGCGC
301 ACGGTGGATG CCTTGCAAAA TCACTAGT

Streptomyces achromogenes

1 AAGGAGCAGC ATCACGTCCA TCGACAGTTG TCTGTTGGTG GGGTGTCCAT GGTGGGCAAG
61 GCGAGTGTTT TTGCGCTGTG GGTGCTCGGA GGATTAGTGG AAACGCTGAC CGTTGGTCTT
121 GTTGTTCAAG GCTTGAAGAT CGTTTGGCAC GTTGTGGGT CCTGAGGGAA CACTGTGT
181 GTGGGCTCGT CTGTTGTTG TTTGAGAACT GTATAGTGA TGCGAGCATC TTT

Streptomyces albidoflavus

1 TGCCAAGGCA TCCACGTGCG CCCTTAAAAA CTTGGCCACA GATGCTCGCG TCCACTGTGC
61 AGTTCTCAAA CAACGACCAA CCACCCGTCA CAACCCACAT CACGTGGACC TATACCGGGG
121 CCGGCAACCG AAGAAACAGC CACATCGTGC CGCTCCCTCA GACACCCAAC AGCGTGCCCG
181 ACACTCCCCG CCTCTTGAAC TGTTTTCCAC GCCGAAGCAG TACTCACAGT CCAAGCAGAC
241 CGACAGTGCC GAATAGTCAA CGTTCCACCC ATGAGCAACC AGCATCAGAC ATTCGCTGAT
301 GAACTGGCCT CT

Streptomyces alboniger

1 GCCAAGGCAT CCACCGTGCG CCCTTAAAAA CTTGGCCACA GATGCTCGCG TCCACTGTGC
61 AGTTCTCAAA CAACGACCAA CCACCCATCA CCCCACCAGC AAAACCAGTG AGTGTACTGG
121 GGTCGGCACT GAAGGCAGCC GAAACCGGCC GTACCCTCAG ATACCCAACA GCGTGCCCGA
181 CACCCTTACC GCTTCCCTCA ACGTTCCACG CTCCGAAGAG CAGTACTGGA AGGAAAAAGAC
241 GATCAAGTGT GCCGAGTAGT CAACGTTCCA CCCATGAGCA ACCAGCATCA GACATTCGCT
301 GATGGACTGG CCTCT

Streptomyces antibioticus

1 AAGGAGCACA GTACCGATTG CAGGCAAATG TTCTGCACGG TCAGCTCATG GGTGGAACGT
61 TGATTATTCG GTCCGGTTCA CGGGTCGAAG GCTTGCCAGT ACTACCCCTC GGGGTGTGGA
121 ACGCATGATC TTCGGACGGT ACCGGGTCGG GCACGCTGTT GGGTGTCTGA GGGCACGGCC
181 GCAAGGCTGG TCTTCGGGAT GCCGGCCCCA GTGAACTCCG AGTGTGACTC GGGGGTGATG
241 GGTGGCTGGT CGTTGTTTGA GAACTGCACA GTGGACGCGA GCATCTGTG

Streptomyces aureofaciens

1 AAGGAGCACT TCTAGGCTGC CTCGGCAGTC CAGAGGCCAG CATGCGAGCG AACGTCTCGC
61 ACTGGTTGCT CATGGGTGGA ACGTTGACTA TTCGGCCAGG TTCTGGGCCG GAGGCTGCTA
121 GTACTGCTCG CAAGAGCGTG GAACGCATGA TCTCCGGGCG GGAGTTGGCC GGGCACGCTG
181 TTGGGTGTCT GAGGGTACGG CCGTGTGGTC GCCTTCAGTG CCGGCCCCAG TGCCTCCGG
241 GTTTGTCCG GGGGTGATGG GTGGTTGGTC GTTGTGTTGAG AACTGCACAG TGGACGCGAG
301 CATCTGTG

Streptomyces avermitilis

1 AAGGAGCACT TCTTACCGAT CCCTTCGGGG TGAGGTCAGA GGCCAGTACA TCAGCGACTG
61 TCTGATGCTG GTTGCTCAAG GGTGGAACGT TGATTATTCG GCACACTCGA CCTGCTCAAG
121 TTGGCAAGAA CTGCTTCGGC GTGGAAAGCG AACATGGGAG GGCGAGGGTG TCGGGCACGC
181 TGTTGGGTGT CTGAGGGTAC GGCCGATTGT GGCTGCTTTC AGTGCCGGCC CCGGTAAAGA
241 TCTGCTTCGG CGGGTTGTGA CGGGTGGTTG GTCGTTGTTT GAGAAGTACA CAGTGGACGC
301 GAGCATCTGT G

Streptomyces cacaoi

1 AAGGACCATC TTGTCGCCCC CGGTTGTGGG GTGGCCAGAG GCAGTACATC AGCGCGTGTC
61 TGATGCTGGT TGCTCATGGG TGGAACGTTG ACTATTCGGC ACTTGTGGTT GTTTTTGCTA
121 GTACTGCTTC GGCCTGGAAC GCGAAGAGCG ACTGTGGGTG TTGGGCGCGC TGTTGGGTGT
181 CTGAGGGTGC GGCCGTGTGG TCGTGTCTTC GGTGCCGGTC CCAGTGAACT CGTCCCGTGT
241 GGGGTGGGGT GGTGGGTGGC TGGTTGTTGT CTGAGAACTG CACAGCGGAC GCGAGCATCT
301 GTG

Streptomyces caelestis

1 AAGGAATTTT GCCAAGGCAT CCACCGTGCG CCTTTAAAAA CTTGGCCACA GATGCTCGCG
61 TCCACTGTGC AGTTCTCAAA CAACGACCAG CCACACATCA CCCCACCTTT ACAGGCCAGT
121 TCACTGGGGC CGGCGACTGA GGAAAAATCC ATTCCCTCAG ACACCCAACA GCGTGCCCGA
181 CACAGCCAGC TGACCAGATC AGCGTTCCAC GCTCCGAAGA GCAGTACTAG CGCCTAATCC
241 ATCCTGGACC GTGCCGAGTA GTCAACGTTT CAC

Streptomyces candidus

1 AAGGAGCACT TCTTGGCTGC CAGCTTTCGG GTTGGTGGTC CAGGGGCCAG TTCATCAGCG
61 AACGTCTGGT GCTGGTTGCT CATGGGTGGA ACGTTGACTA TTCGGCACAG TGGATTCCCTG
121 ACTTGGTTTT GCTAGTACTG CCTTCCGCGT TGGAACCACG GGATCATGGA GTCGGACTAG
181 GTCCGGCACG CTGTTTGGTG TCTGAAGGAA CCGCCACGTT GTGGCTGTTT CTTCAGTTGC
241 CGGCCC

Streptomyces cattleya

1 AAGGAGCACA TAGCCAGCTT CGGGCGAACG TCCCGGAGTG GTTGCTCATG GGTGGAACGT
61 TGACTIONTCG GCACTGCTGG TGAGGTTTCGT TAGTACTGCT TCGGCGTGGA ACGCGTAACT
121 GGGCTGGTCG GTGTCGGGCA CGCTGTTGGG TCCTGAGGGA ACGATGAGTC CCCTCGGACA
181 TGGAGACCGG TCTCGCCGAA GCCCGTGAGG TCGTTGGGT

Streptomyces celluloflavus

1 GCTCTCTCGA ATGTCAGTGG CCCGCACTAC GATCGCTCGC TTGATATCCG AGTCGGCCGG
61 TCGGTCCGAG GGGTGCCGCG TCGAGGGACG ACACGGCCGT CCGCACGGGC GGGCCGTTTC
121 ACGGGCGAGG GGAGGGGTGA CATGTGGGAC GAGCCCTCAG GGCCGGGGCC ACGGCCGGGA
181 TCGAGGCCAG GACCGGGGTC GGGACCGGGG CCAGGACCGG GGTCCGGACC GGGGTGAGGG
241 CCGGGTTCGT GCTCCGGGCC GGATCCACTA GTTCTAGAGC GGCCGCCACC GCGGTGAGCT
301 CCAGCTTTTG TTCCCTTTAG TGAGGGTTAA TTGCGCGCTT GCGGTAAA

Streptomyces clavuligerus

1 TGCCAAGGCA TCCACCGTGC GCCCTTAAAA ACTTGGCCAC AGATAGCTCG CGTCCAACTA
61 TGTAGTTCTC AAACAACGAC CAGCCACCCA TCACACCCTG CCGAAGCAGA GCTTTACTGG
121 GGCCGGAGTC AGAAGGACGA CCAACCGGCC GTACCCTCAG ACACCCAACA ACGTGCCAAG
181 CGCGGTCTTC TCGGTTTCATC CCGTGTTCCTA CGCCGAAGCA GTACTAACAG GAGACTCTGA
241 AGAATCGCGC CAACTAATCA ACGTTCCACC CATGAGCTGA CCGTGCAGAA CGTTTGCCTG
301 CAATCGGTAC TGTGCT

Streptomyces cyanogenus

1 GATTAAGGAA TTCTGCCAAG GCATCCACCG TGCGCCCTTA AAAACTTGGC CACAGATAGC
61 TCGCGTCCAC TGTGCAGTTC TCAACCAACG ACCAACCCACC CATCACCCCG CAACCTACAT
121 CCCGAGTGCA CTGGGGCCGG CAACTGAAGG CGACCTCACG GCCGTACCCT CAGAACCAC
181 AGCGTGCCCG ACGGCCTTGC CTTCCCTTAC TCGTGTTCCTA CGCCGAAGCA GTACTGACGA
241 GAAGATCAGG ATCAAGTGTG CCGAGTAGTC AACGTTCCAC CCATGAGCAA CCGTGCAGGA
301 CATTTGCCTG CAGTCGGCT

Streptomyces fradiae

1 AAGGCATCCA CCGTGCGCCC TTATAAACTT GGCCACAGAT GCTCGCGTCC ACTGTGCAGT
61 TCTCAAGCAA CGACCAGCCA CCCATCACCC CACCACCGTA AGTAGCGAGT TCACTGGGGC
121 CGGCATCGCG AAGGGCGAGC AACGCTCGAC CCTCAGACAC CCAACAGCGT GCCCGGACAG
181 CCGCCGTTCC GTATCCCTCG TTCCACGCTC CGAAGAGCAG TACTAGAGAA GACCGAACTG
241 GTCGAACCTG CCGAGTAGTC AACGTTCCAC CCATGAGCAA CCAGCATCAG ACGTTCGCT

Streptomyces lincolnensis

1 TGCCAAGGCA TCCACCGTGC GCCCTTAAAA ACTTGGCCAC AGGTGCTCGC GTCCACTATG
61 CAGTTCTCAA GCAACGACCC ATCCCCACA CCCAACACCT CACGGCGCCT TCGGCGAGAC
121 CGGTCTCCAT GTCCGAGGGG ACTCATCGTT CCTTCAGGAC CCAACAGCGT GCCCGACACC
181 ACCAGCTCAG TTACGCGTTC CACGCTGAAG CAGTACTAAC GAACCTTACC AGCAGTGCTG
241 AATAGTCAAC GTTCCACTTA TGAGCAACCA TTCCGGGACG TTCGCTCGAA GTTGGTTATG
301 TGCT

Streptomyces mobaraensis

1 GATTAAGGAA TTCTGCCAAG GCATCCACCG TGCGCCCTTA AAAACTTGGC CACAGATTCT
61 CGCGTCCACT GTGCAGTTCT CATAACAACGA CCAGCCACCC GTCACAACCC ACCAACAGGC
121 GGACCTTTAC CGGGGCCGGC AGAAGGAACA GACCATAAGT CCGTACCCTC AGACACCCAA
181 CAGCGTGCCC GACCCGACCA GCTCACAATT CACGTTCCAC GCCGAAGCAG TACTAGCGAT
241 CCCTCACCGA TCGTGCCGAA TAGTCAACGT TCCATCCATG AGCAACCGTG CAGAACGTTT
301 GTCTGCAGTC GGTATGTGAT

Streptomyces nodosus

1 AAGGAGCACT TCTAGGCCGC CATGGCGGTC CAGAGGCCAG TACATCGGCG AACGTCCGGT
61 GCTGGTTGCT CATGGGTGGA ACGTTGACTA CTCGGTCAGG ACCTCGGGTC GAAGGCTGCT
121 AGTACTGCTC GTGAGAGCGT GGAACGCATG ATCTTCGGAC GGGACTTGGC CGGGCACGCT
181 GTTGGGTGTC TGAGGGCACG GCCGTTTGGT CGGAAGCCTT CGGTGCCGGC CCCAGTAAAC
241 TCGCTGGTTT TTCAGCGGGG TGATGG~TGG TTGGTCGTTG TTTGAGAACT GCACAGTGAA

Streptomyces noursei

1 TGCCAAGGCA TCCACCGTGC GCCCTTAAAA ACTTGGCCAC AGATGCTCGC GTCCACTGTG
61 CAGTTCTCAA ACAACGACCA ACCACCCATC ACCCCGAACC AGCGGCTCGA GTGCACTGGG
121 GCCGGCACTG AAGGCGACCT TGCGGCCGTA CCTTCAGACA CCCAACAGCG TGCCCCGACAC
181 ACTCCCCGCT TCCCTCGACG TTCCACGCTC CGAAGAGCAG TACTAGAAGG AGAAGACGAT
241 CAAGTGTGCC GAGTAGTCAA CGTTCCACTC ATGAGCAACC AGCATCAGAC GTTCGCTGAT

Streptomyces parvulus

1 AAGGCATCCA CAAGGAGGTG GATCCACTAG TTCTAGAGCG GCCGCCACCG CGGTGGAGCT
61 CCAGCTTTTG TTCCCTTTAG TGAGGGTTAA TTGCGCGGTT GCGGTAATCA TGGTCATAGC
121 TGTTTCGTGT GTGAAATTGT TATCCGCTCA CAATTCCACA CAACATACGA GCCGGAAGCA
181 TAAAGTGTAAGCCTGGGGT GCATAATGAG TGAGCCAACT CACATTAATT GCGTTGCGCT
241 CACTGCCCGC TTTCCAGTCG GGAAACCTGT CGTGCCAGCT GCATTAATGA ATCGGCCAAC
301 GCGCGGGGAG AGGCGGTTTTG CGTATTGGGC GCTCTT

Streptomyces violaceorectus

1 AAGGAGCACT TCTTACCGAT CCTTTCGGGG TGAGGTCAGA GGCCAGTACA TCAGCGAATG
61 TCTGATGCTG GTTGCTCATG GGTGGAACGT TGACTACTCG GCACACTTGA TCGTCTTCTC
121 CTTCTAGTAC TGCTCTTCGG AGCGTGGAAC GTTGAGGGGA GCGGGGAGTG TGTCGGGCAC
181 GCTGTTGGGT GTCTGAGGGA ATGGATTTTT CCTCAGTCGC CGGCCCCAGT GAACTCGCCT
241 GTAAAGGTGG GGTGATGGGT GGCTGGTCGT TGTTTGAGAA CTGCACAGTG GACGCGAGCA
301 TCTGTG

Streptomyces violaceoruber

1 TGCCAAGGCA TCCACCGTGC GCCCTTAAAA ACTTGGCCAC AGGTGCTCGC GTCCACTATG
61 CAGTTCTCAA GCAACGACCC ATCCCCACA CCCAACACCT CACGGCGCCT TCGGCGAGAC
121 CGGTCTCCAT GTCCGAGGGG ACTCATCGTT CCTTCAGGAC CCAACAGCGT GCCCGACACC
181 ACCAGCTCAG TTACGCGTTC CACGCTGAAG CAGTACTAAC GAACCTTACC AGCAGTGCTG
241 AATAGTCAAC GTTCCACTTA TGAGCAACCA TTCCGGGACG TTCGCTCGAA GTTGGTTATG
301 TGCT

Streptomyces violens

1 AAGGAGCAGC ATCACGTCCA TCGACAGTTG TCTGTTGGTG GGGTGTCCAT GGTGGGCAAG
61 GCGAGTGTTT TTGCGCTGCG GGTGCTCGGA GGATTAGTGG AAACGCTGAC CGTTGGTCTT
121 GTTGTTCAAG GCTTGAAGAT CGTTTGGCAC GTTGTGGGGT CCTGAGGGAA CAGACTGTGT
181 GTGGGCTTGT CTGGTTGTTG TTTGAGAACT GTATAGTGAA TGCGAGCATC TTTGTG

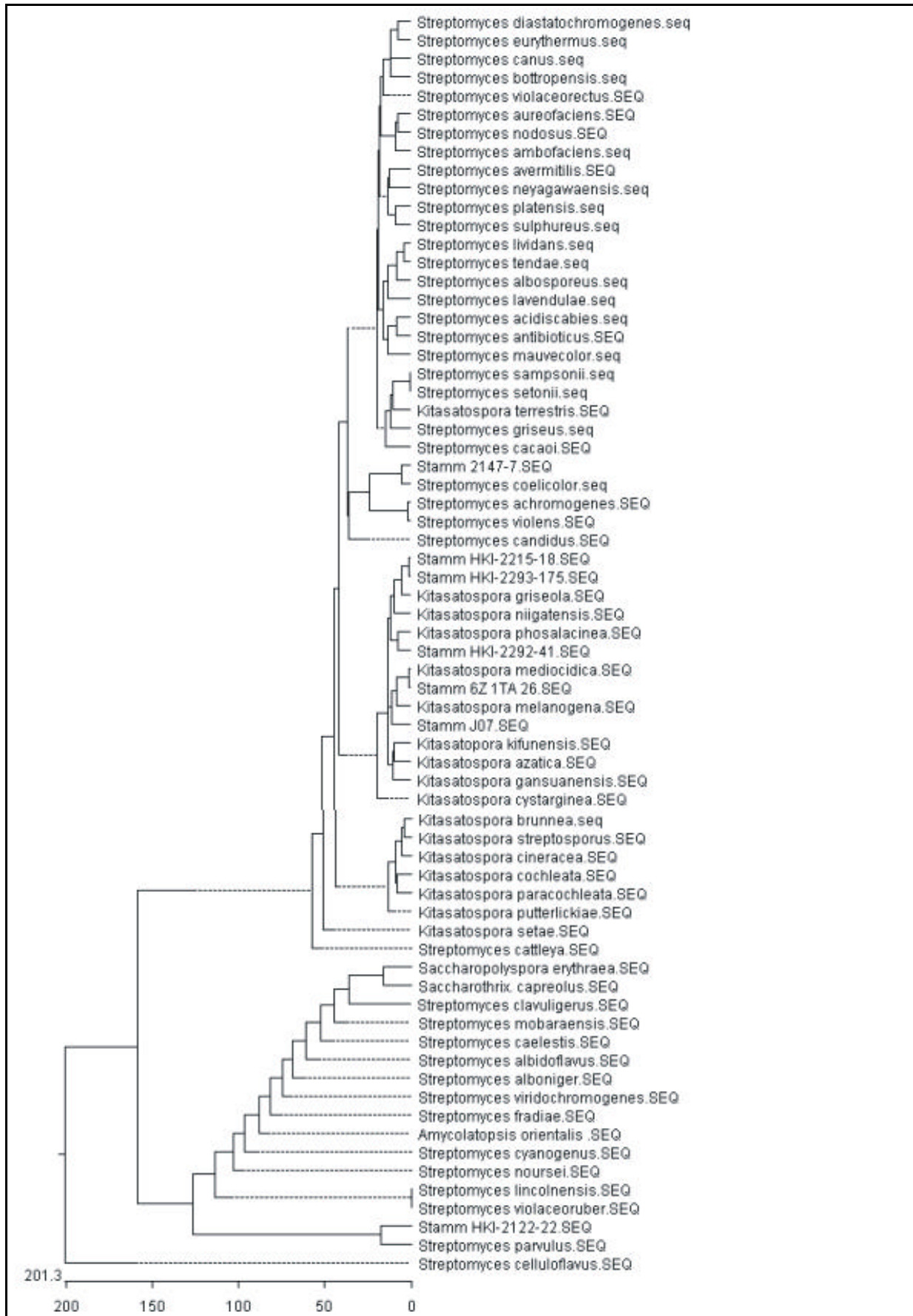
Streptomyces viridochromogenes

1 AAGGCATCCA CCGTGCGCC TTA AAAACTT GGCCACAGAT GCTCGCGTCC ACTGTGCAGT
61 TCTCAAACAA CGACCAACCA CCCATCACCC CGAGCCTGAC GCTCGAGTGC ACTGGGGCCG
121 GCAACTGAAG GAAGTTCATT CCCTCAGACA CCCAACAGCG TGCCCGACCG GACTCTGTCC
181 GGAGGTCGTG CGTTCCACGC TCTTACGAGC AGTACTTGAA GCATCCGACC CAGACTCAGG
241 CCGAGTAGTC AACGTTCCAC CCATGAGCAA CCA

NCBI-GenBank Nummern der beim Alignment der 16S-23S rDNA-Region verwendeten Stämme

Streptomyces acidiscabies AF 363487
Streptomyces eurythermus AF 363488
Streptomyces tendea AF 363490
Streptomyces coelicolor AF 363491
Streptomyces griseus subsp. griseus AF 363492
Streptomyces bottropensis AF 363493
Streptomyces sampsonii AF 363494
Streptomyces setonii AF 363495
Streptomyces lividans AF 363496
Streptomyces diastatochromogenes AF 363497
Streptomyces neyagawaensis AF 363498
Streptomyces ambofaciens AY027686
Streptomyces albosporeus subsp. albosporeus U93343
Streptomyces canus U93344
Streptomyces lavendulae subsp. lavendulae U93347
Streptomyces mauvecolor U93348
Streptomyces platensis U93349
Streptomyces sulphureus U93350
"Kitasatospora brunnea" U93315
"Kitasatospora streptosporus" U93335
"Kitasatosporia melanogena" U93327

Anhang B



Anhang B

Anhang B: Alignment der 16S-23S rDNA Region der untersuchten Actinomyceten (erstellt mit MegAlign®)

Anhang D

Physiko-chemische Eigenschaften der verwendeten Oligonukleotid-Gensonden

Tab. A: Oligonukleotide des Microarrays "Kitasatospora I"

Sequenz nummer	Nomenklatur	Schmelz punkt [°C]	Gehalt [%] A	C	G	T	G+C
1	<i>K. phosalacinea</i>	60.71	15.38	19.23	46.15	19.23	65.38
2	<i>K. setae</i>	61.08	11.54	23.08	38.46	26.92	61.54
3	<i>K. cochleata</i>	59.57	11.54	26.92	38.46	23.08	65.38
4	<i>K. cystarginea</i>	60.88	3.85	11.54	50.04	34.62	61.54
5	<i>K. kifunensis</i>	59.53	15.38	11.54	34.62	38.46	46.15
6	" <i>K. melanogena</i> "	61.71	11.54	15.38	46.15	26.92	61.54
7	" <i>K. brunnea</i> "	59.51	19.23	23.08	42.31	15.38	65.38
8	<i>K. mediocidica</i>	60.89	15.38	15.38	46.14	23.08	61.54
9	<i>K. paracochleat.</i>	59.71	23.08	11.54	38.46	26.92	50.01
10	<i>K. griseola</i>	59.51	11.54	15.38	50.05	23.08	65.38
11	" <i>K. streptosporus</i> "	67.01	11.54	26.92	42.31	19.23	69.23
12	" <i>K. melanogena</i> "	66.04	11.54	30.77	34.62	23.08	65.38
13	<i>K. "brunnea"</i>	59.05	23.08	30.77	30.77	15.38	61.54
14	<i>K. cochleata</i>	60.54	25.03	25.02	28.57	21.43	53.57
15	<i>K. cystarginea</i>	66.08	14.81	29.63	33.33	22.22	62.69
16	<i>K. griseola</i>	64.02	19.23	30.77	30.77	19.23	61.54
17	<i>K. kifunensis</i>	59.95	14.81	18.52	37.04	50.03	55.56
18	<i>K. mediocidica</i>	60.32	23.08	23.08	26.92	26.92	50.08
19	<i>K. paracochleat.</i>	60.12	35.71	17.86	32.14	14.29	50.04
20	<i>K. phosalacinea</i>	61.02	19.23	26.92	30.77	23.08	57.69
21	<i>K. setae</i>	60.57	28.57	21.43	35.71	14.29	57.86
22	" <i>K. streptosporus</i> "	61.33	23.08	30.77	26.92	19.23	57.69
23	<i>Kitasatospora univ</i>	59.41	18.52	18.52	33.33	29.63	51.85
24	Archea	58.02	10.01	50.01	15.03	25.03	65.03
25	<i>Kitasatospora univ</i> II MWG	59.41	18.52	18.52	33.33	29.63	51.85
26	Archea II MWG	58.02	10.01	50.01	15.03	25.03	65.03
27	Bacteria	57.03	5.88	41.18	35.29	17.65	76.47
28	Plant	57.81	36.02	12.06	20.08	32.03	32.01
29	Yeast	57.31	45.83	20.83	8.33	25.08	29.17

Tab. B: Oligonukleotide des Microarrays "Kitasatospora II"

Sequenz nummer	Nomenklatur	Schmelz punkt [°C]	Gehalt				
			[%] A	C	G	T	G+C
31	<i>Micromonospora</i> sp. universal	61,1	19,05	28,57	28,57	23,81	57,14
32	Stamm "HKI-2050-15"	63,3	15,38	30,77	26,92	26,92	57,69
33	Stamm "HKI-2122-22"	67,1	34,48	37,93	20,69	6,90	58,62
34	Stamm "HKI-2291-12"	69,1	14,29	28,57	39,29	17,86	67,86
35	<i>S. aureofaciens</i>	67,4	7,14	28,57	35,71	28,57	64,29
36	<i>K. puckerlickia</i>	61,3	10,71	17,86	28,57	42,86	46,43
37	<i>Streptomyces</i> sp. universal I	62,2	23,08	15,38	34,62	26,92	50,00
38	<i>Streptosporangium</i> sp. universal	59,3	23,08	23,08	26,92	26,92	50,00
39	Actinomycetes universal I	67,7	18,52	44,44	18,52	18,52	62,96
40	Archea universal	58,4	13,33	46,67	26,67	13,33	73,33
41	Bacteria universal	58,8	15,00	30,00	30,00	25,00	60,00
42	Eucaria universal	48,5	40,00	6,67	46,67	6,67	53,33
43	<i>Frankia</i> sp. universal	71,9	6,90	24,14	44,83	24,14	68,97
44	Actinomycetes universal II	58,8	17,65	58,82	11,76	11,76	70,59
45	Stamm "HKI-2291-42"	61,1	21,43	21,43	28,57	28,57	50,00
46	<i>Propionibacterium</i> sp. universal	55,9	33,33	11,11	25,93	26,63	37,04
47	<i>Mycobacterium</i> sp. universal	63,2	4,17	0,00	54,17	41,67	54,17
48	<i>Corynebakterium, Nocardardia</i> sp. uni	71,8	16,67	23,33	46,67	13,33	70,00

Tab. C: Oligonukleotide des Microarrays "Kitasatospora III"

Sequenz nummer	Nomenklatur	Schmelz punkt [°C]	Gehalt				
			[%] A	C	G	T	G+C
24	" <i>K. brunnea</i> " B	68,2	19,23	23,08	42,31	15,38	65,38
25	<i>K. mediocidica</i> B	71,4	7,69	19,23	50,00	23,08	69,23
26	<i>K. paracochleata</i> B	63,1	23,08	19,23	38,46	19,23	57,69
27	" <i>K. streptosporus</i> " B	70,4	11,54	26,92	42,31	19,23	69,23
34	" <i>K. melanogena</i> " B	71,2	11,54	34,62	38,46	15,38	73,08
35	" <i>K. brunnea</i> " B	66,7	24,14	31,03	27,59	17,24	58,62
37	<i>K. cystarginea</i> B	67,8	15,38	26,92	38,46	19,23	65,38
38	" <i>K. streptosporus</i> " C	64,1	11,54	42,31	19,23	26,92	61,54
39	Stamm "HKI-2291-12" B	69,1	14,29	28,57	39,29	17,86	67,86
41	Stamm "HKI-2291-42" B	59,9	11,54	26,92	26,92	34,62	53,85
42	<i>Kitasatospora</i> universal II	59,5	19,23	19,23	30,77	30,77	50,00
43	" <i>K. nipponensis</i> I"	59,2	19,23	7,69	38,46	34,62	46,15
44	" <i>K. nipponensis</i> II"	67,2	15,38	23,08	42,31	19,23	65,38
45	" <i>Kitasatospora</i> universal III"	63,4	16,67	16,67	41,67	25,00	58,33

	10	20	30	40	50		
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora kifunensis.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora azatica.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Kitasatospora brunnea.seq	
1	A A G - G A G C A C A C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Kitasatospora cineracea.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora cystarginea.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora gansuanensis.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora griseola.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora mediocidica.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora melanogena.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora niigatensis.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Kitasatospora paracochleata.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Kitasatospora phosalacinea.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora putterlickiae.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Kitasatospora setae.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A C	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Kitasatospora streptosporus.SEQ	
1	A A G - G A G C A T C T	- - - - -	A G A - - - -	T T C - C G C A A G G A - -	A T C C A G A G - C	Kitasatospora terrestris.SEQ	
1	A A G - G A G - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	Stamm 2147-7.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Stamm 62 1TA 26.SEQ	
1	A A G G A G G T G G A T C C A A C C G G A T C C C G G A A T C A C - -	T A G T G A A T T C G C G G C				Stamm HKI-2122-22.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Stamm HKI-2215-18.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Stamm HKI-2292-41.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	G G C Stamm HKI-2293-175.SEQ	
1	A A G - G A G C A C A T	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C Stamm J07.SEQ	
1	- - - - -	- - - - -	T G C C A A G G C A T C C A C C G T G C G C C C T T A A A A A C			Amycolatopsis orientalis .SEQ	
1	- - - - -	- - - - -	T G C C A A G G C A T C C A C C A T G T G C C C T T T C A A A C			Saccharopolyspora erythraea.SEQ	
1	A A G G A G G T G G A T C A A T T C T G C C A A G G C A T C C A C C G T A T G C C C T T A A T A A C					Saccharothrix. capreolus.SEQ	
1	A A G - G A G C A - - - - -	- - - - -	G C A - - - -	T C A C G - - - -	- - - - -	- - - - -	Streptomyces achromogenes.SEQ
1	A A G - G A G C A C - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G T A C C	Streptomyces acidiscabies.seq
1	- - - - -	- - - - -	T G C C A A G G C A T C C A C - G T G C G C C C T T A A A A A C			Streptomyces albidoflavus.SEQ	
1	- - - - -	- - - - -	G C C A A G G C A T C C A C C G T G C G C C C T T A A A A A C			Streptomyces alboniger.SEQ	
1	A A G - G A G C A C - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A T A G C C	Streptomyces albosporeus.seq
1	A A G - G A G C A C T T C T A A G C C A G G - - - - C T T - - G C C T - - G - - G T T C A G A G G C					Streptomyces ambofaciens.seq	
1	A A G - G A G C A C - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G T A C C	Streptomyces antibioticus.SEQ
1	A A G - G A G C A C T T C T A G G C T - G C - - - - C T C - - G G C - - - A - - G T C C A G A G G C					Streptomyces aureofaciens.SEQ	
1	A A G - G A G C A C T T C T T A C C G A T C - - - - C T T C G G G G T G A - - G G T C A G A G G C					Streptomyces avermitilis.SEQ	
1	A A G - G A G C A C T T C T - A C C G A T C - - - - C C T A C G G G G T G A - - G G T C A G A G G C					Streptomyces bottropensis.seq	
1	A A G - G A C C A T C T T G T C G C C C C C - - - - G G T - T G T G G G G T - - G G C C A G A G - G					Streptomyces cacaoi.SEQ	
1	- - - - A A G G - - - - A A T T T T G C C A A G G C A T C C A C C G T G C G C C T T T A A A A A C					Streptomyces caelestis.SEQ	
1	A A G - G A G C A C T T C T T G G C T G C C A - - G C T T T C G G T G T G T G T C A G G G G C					Streptomyces candidus.SEQ	
1	A A G - G A G C A C T - C T T A C C G A C T - - - - T C - - - - G G T - - - - A G T A C G A G G C					Streptomyces canus.seq	
1	A A G - G A G C A C A T - - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	- - - - -	A G C	Streptomyces cattleya.SEQ
1	- - - - G C T C T C T C G A A T G T C A G T G - - G C C C G C A C T A C G A T C G C T C - - - G C T					Streptomyces celluloflavus.SEQ	

	10	20	30	40	50	
33	T T G G C C A C A G A	- T - - A - G - C T C G C G T C C A A C T A T G T A G T T C T C A A A C A A C	Streptomyces	clavuligerus.SEQ		
38	C A G T T C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	coelicolor.seq		
46	T T G G C C A C A G A	- T - - A - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A C C A A C	Streptomyces	cyanogenus.SEQ		
35	C A C A A C G T C G G	- C G A A C G T C C G A C G G T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	diastatochromogenes.seq		
35	C A C T A C G T C G G	- C G A A T G A T C G A C G G T G G T T A G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	eurythermus.seq		
29	T T G G C C A C A G A	- T - - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A G C A A C	Streptomyces	fradiae.SEQ		
40	C A G T A C A C C G G	- C G A A T G T T C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	griseus.seq		
16	G A C T G C G - - A T	- C G A A T G A A T C G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	lavendulae.seq		
33	T T G G C C A C A G G	- T - - - - G - C T C G C G T C C A - C T A T G C A G T T C T C A A G C A A C	Streptomyces	lincolnensis.SEQ		
16	G A C T G C A - - G G	- C A A A T G T C C T G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	lividans.seq		
16	G T C T G C A - - G G	- C A G A T G T C C T G C A C - G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	mauvecolor.seq		
46	T T G G C C A C A G A	- T - - - - T - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A T A C A A C	Streptomyces	mobaraensis.SEQ		
41	C A G A A C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T A - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	neyagawaensis.seq		
38	C A G T A C A T C G G	- C G A A C G T C C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	nodosus.SEQ		
33	T T G G C C A C A G A	- T - - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A A C A A C	Streptomyces	noursei.SEQ		
43	C - G C C - - - - -	- - - - A C C G C - - G G T G G A G C T C C - A - - G C T T T T G T T C C - - -	Streptomyces	parvulus.SEQ		
38	C A G T A C A T C A G	- C G A G T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	platensis.seq		
35	C A C T A C G T C G G	- C A A A T G T T C G A C G G T G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	sampsonii.seq		
35	C A C T A C G T C G G	- C A A A T G T T C G A C G G T G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	setonii.seq		
39	C A G T A C A T C G G	- C G A A T G T C C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	sulphureus.seq		
16	G A C T G C A - - A G	- C A A A T G T C T T G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	tendae.seq		
44	C A G T A C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T	Streptomyces	violaceorectus.SEQ		
33	T T G G C C A C A G G	- T - - - - G - C T C G C G T C C A - C T A T G C A G T T C T C A A G C A A C	Streptomyces	violaceoruber.SEQ		
17	- - - T C C A T C G A	- C A G T T G T C T G T T G G T G G G T G T C C A T G G T G G G C A A G G C	Streptomyces	violens.SEQ		
29	T T G G C C A C A G A	- T - - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A A C A A C	Streptomyces	viridochromogenes.SEQ		

	60	70	80	90	100	
33	T T G G C C A C A G A	- T - - A - G - C T C G C G T C C A A C T A T G T A G T T C T C A A A C A A C				Streptomyces clavuligerus.SEQ
38	C A G T T C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces coelicolor.seq
46	T T G G C C A C A G A	- T - - A - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A C C A A C				Streptomyces cyanogenus.SEQ
35	C A C A A C G T C G G	- C G A A C G T C C G A C G G T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces diastatochromogenes.seq
35	C A C T A C G T C G G	- C G A A T G A T C G A C G G T G G T T A G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces eurythermus.seq
29	T T G G C C A C A G A	- T - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A G C A A C				Streptomyces fradiae.SEQ
40	C A G T A C A C C G G	- C G A A T G T T C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces griseus.seq
16	G A C T G C G - - A T	- C G A A T G A A T C G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces lavendulae.seq
33	T T G G C C A C A G G	- T - - - G - C T C G C G T C C A - C T A T G C A G T T C T C A A G C A A C				Streptomyces lincolnensis.SEQ
16	G A C T G C A - - G G	- C A A A T G T C C T G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces lividans.seq
16	G T C T G C A - - G G	- C A G A T G T C C T G C A C - G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces mauvecolor.seq
46	T T G G C C A C A G A	- T - - - T - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A T A C A A C				Streptomyces nobaraensis.SEQ
41	C A G A A C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T A - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces neyagawaensis.seq
38	C A G T A C A T C G G	- C G A A C G T C C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces nodosus.SEQ
33	T T G G C C A C A G A	- T - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A A C A A C				Streptomyces noursei.SEQ
43	C - G C C - - - - -	- - A C C G C - - G G T G G A G C T C C - A - - G C T T T T G T T C C - - -				Streptomyces parvulus.SEQ
38	C A G T A C A T C A G	- C G A G T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces platensis.seq
35	C A C T A C G T C G G	- C A A A T G T T C G A C G G T G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces sampsonii.seq
35	C A C T A C G T C G G	- C A A A T G T T C G A C G G T G G T C A G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces setonii.seq
39	C A G T A C A T C G G	- C G A A T G T C C G G T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces sulphureus.seq
16	G A C T G C A - - A G	- C A A A T G T C T T G C A C - G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces tendae.seq
44	C A G T A C A T C A G	- C G A A T G T C T G A T G C T G G T T - G C T C A T G G G T G G A A C G T T				Streptomyces violaceorectus.SEQ
33	T T G G C C A C A G G	- T - - - G - C T C G C G T C C A - C T A T G C A G T T C T C A A G C A A C				Streptomyces violaceoruber.SEQ
17	- - - T C C A T C G A	- C A G T T G T C T G T T G G T G G G G T G T C C A T G G T G G G C A A G G C				Streptomyces violens.SEQ
29	T T G G C C A C A G A	- T - - - G - C T C G C G T C C A - C T G T G C A G T T C T C A A A C A A C				Streptomyces viridochromogenes.SEQ

	110	120	130	140	150	
61	G A C T A T T C G - G C A C A C T G G G T - - - G A T G - G T - - T C G T G A G T A C T G C T T -					Kitasatospora kifunensis.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C T G G G T - - - G A T G - G T - - T C G T G A G T A C T G C T T -					Kitasatospora azatica.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T G A C - G G A - - - C T G C C A G T A C T G C C C T C - -					Kitasatospora brunnea.seq
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T G A T - G G A G - A T C G C G A G T A C T G C C C T - - -					Kitasatospora cineracea.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C T C G G T A G G - - - G A - T C A C T - A G T A C T G C T T C - - -					Kitasatospora cochleata.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C G G T T C G G - - - G A T C - G G C - - C A C T A G T A C T G C T T -					Kitasatospora cystarginea.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T C T - - G T T G - G C C - T C A C A A G T A C T G C T T -					Kitasatospora gansuanensis.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C G C G G T G A - - T - - G - A C C G T C A G T A C T G C C C C T -					Kitasatospora griseola.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T T G - - A - - A - G T C G T T A G T A C T G T C C T T C -					Kitasatospora mediocidica.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C G C T C G G T T G - - A - T G - G C C G C C A G T A C T G C A C T T C -					Kitasatospora melanogena.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A G G A A G C G A - - A C A G - G T C G C C A G T A C T G C C C C T -					Kitasatospora niigatensis.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A G G A A G T G A A - C A G A - G A G C T C A G T A C T G C T C T - - -					Kitasatospora paracochleata.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T T G - - G - G A - T C T G C C A G T A C T G C C T C T C -					Kitasatospora phosalacinea.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C T G G G T - - T - T G G T - C C T G T T A G T A C T G C T T C - - -					Kitasatospora putterlickiae.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C G A T G A A C G A - - G A C G - A G C G G T A G T A C T G C T T C - - -					Kitasatospora setae.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C A T G G T A G - - G A C - - - C T G C C A G T A C T G C C C T C T T					Kitasatospora streptosporus.SEQ
84	G A C T A T T C A - G T A C C - T G G T G G T T C A G C C - G G G A C - G C G A G T A C T G C - - T					Kitasatospora terrestris.SEQ
12	- - - - T C C A - A C - - - - - - - - - - - - - - - - C G G A T C C C G - - - - - G C T T C					Stamm 2147-7.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T T G - - A - - A - G T C G T T A G T A C T G T C C T T C -					Stamm 6Z 1TA 26.SEQ
98	G C T T G A G T A T T C - T A T A G T G T C A C C T A A A T A G C - T T G G C G T A A T C A T G G T					Stamm HKI-2122-22.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T G A - - A - - G - A C C G C T A G T A C T G C C C C T C -					Stamm HKI-2215-18.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G A G T A T - - G - G G - T C T G C C A G T A C T G C T C C T C -					Stamm HKI-2292-41.SEQ
61	G A C T A T T C G - G C A C A C A C G G T G A - - A - - G - A C C G C C A G T A C T G C C C C T C -					Stamm HKI-2293-175.SEQ
63	G A C T A T T N T - T T T T T N A C G G T - - T - G A T A - - C C G C T A G T A C T G T C C T T C -					Stamm J07.SEQ
76	G A C C A G C C A C C C - - A C C A C C - C C - - C G G A A A G A T C C G - G A G T T C A C T G G G					Amycolatopsis orientalis .SEQ
78	A A C C A G A C - - - - - - - - - - - - - - - G A - G C C C A C - - - - A C - - - - - - -					Saccharopolyspora erythraea.SEQ
96	A A C C A G A C A C C C - C G T C A C C A C T G C C G A C G C C T A C C A G C T A C C T G G C G A A					Saccharothrix. capreolus.SEQ
63	G A G T G T T C T T G C G C T G T G G T G C T C G G A G G A T T A G T G G A A A C G C T G A C C G					Streptomyces achromogenes.SEQ
62	G A T T A T T C G - G C C T G G T T C - T G G G T C G G A - G G C A T T G C G A G T A C T G C T C C					Streptomyces acidiscabies.seq
75	G A C C A A C C A C C C - - G T C A C A - - - A C C C A C A T C A C G T G G A C C T A T A C C G G G					Streptomyces albidoflavus.SEQ
75	G A C C A A C C A C C C - - A T C A C C - C C A C C A G C A A A A C C A G T G A G T G T A C T G G G					Streptomyces alboniger.SEQ
61	G A C T A C T C G - G C A C G G T T - - T - - T C T T A T - G G A - T C A C T A G T A C T G C T T C					Streptomyces albosporeus.seq
88	G A C T A C T C G - G - C A C - - G A - - T C A G G A T G - A G A A C T G T T A G T A C T G C - - T					Streptomyces ambofaciens.seq
62	G A T T A T T C G - G T C C G G T T C A C G G T C G A A - G G C - T T G C C A G T A C T A C C C C					Streptomyces antibioticus.SEQ
86	G A C T A T T C G - G C C A G - - G T T C T - G G G C C G - G A G G C T G C T A G T A C T G C - - T					Streptomyces aureofaciens.SEQ
92	G A T T A T T C G - G C A C A - - C T C G A C C T G C T C - A A G T T G G C A A G A A C T G C - - T					Streptomyces avermitilis.SEQ
92	G A T T A T T C G - G C A T C - T - - T G A G T C A T C T - C A G G C T G T G A G T A C T G T C C T					Streptomyces bottropensis.seq
90	G A C T A T T C G - G C A C - - T T G T G G T T G T T T - - T - - T - G C T A G T A C T G C - - T					Streptomyces cacaoi.SEQ
85	G A C C A G C C A C A C - - A T C A C C - C C A C C - T T T A C A G G C C A G - - T T C A C T G G G					Streptomyces caelestis.SEQ
96	G A C T A T T C G - G C A C A G T G A A T T C C T G A C C T T G C T T T G C T A G T A C T G C C T T					Streptomyces candidus.SEQ
84	G A C T A T T C G - G C A C A T - C - - T C A G T C A T C T - C G G G C T G C A A G T A C - G T C T C					Streptomyces canus.seq
62	G A C T A T T C G - G C A C - - T G C T G G T - G A G G - T T C G T T A G T A C T G C T T C - - -					Streptomyces cattleya.SEQ
83	G A G - - - - - G G A C G A C - - A C G G C C G T C C G - - C A C G G G C G G - G C C G T T T C					Streptomyces celluloflavus.SEQ

	110	120	130	140	150	
78	G A C C A G C C A C C C - - A T C A C A - C C - C T G C C - - G A A G C A G A G C T T T A C T G G G					<i>Streptomyces clavuligerus</i> .SEQ
86	G A C T A T T C G - G C A C T G T - - C G G T C T G C T - T G G A C T G T G A G T A C T G C T T C					<i>Streptomyces coelicolor</i> .seq
90	G A C C A A C C A C C C - - A T C A C C - C C G C A A C C T A C A T C C C G A G - T G C A C T G G G					<i>Streptomyces cyanogenus</i> .SEQ
83	G A T T A T T C G - G C A C T - T - - T C A G T C A T C T - C G G G C T G C C A G T A C T G C T C T					<i>Streptomyces diastatochromogenes</i> .seq
84	G A C T A C T C G - G C A C A - C - - T T G A C C T T C T - G G T C T T C C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces eurythermus</i> .seq
72	G A C C A G C C A C C C - - A T C A C C - C C A C C A C C G T A A G T A G C G A G T T C A C T G G G					<i>Streptomyces fradiae</i> .SEQ
88	G A C T A T T C G - G C A C - - - G A C A G G T T G A T C - A C - - T - G C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces griseus</i> .seq
61	G A T T A T T T G - G C A C G G T T - - T - - C C A G A A - C A T C C T G T A A G T A C T G C T T C					<i>Streptomyces lavendulae</i> .seq
76	G A C C C A T C C C C - - A - C A C C - C A A C A C C T C A C G - - - G C G C C T T C G G C G A G					<i>Streptomyces lincolnensis</i> .SEQ
61	G A C T A C T C G - G C A C A C T T G A T - - C C T G A T - C T T C T C G T C A G T A C T G C T T C					<i>Streptomyces lividans</i> .seq
62	G A C T A T T C G - G C A C A G T T A A G - - T T C G G T - G G G T T T G C T A G T A C T G C T T C					<i>Streptomyces mauvecolor</i> .seq
89	G A C C A G C C A C C C - - G T C A C A - A C C C A - C C A A C A G G C G G A C C T T T A C C G G G					<i>Streptomyces mobaraensis</i> .SEQ
89	G A T T A T T C G - G C A C G - - G T C G G T A T G G G T - G A G A G C G C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces neyagawaensis</i> .seq
86	G A C T A C T C G - G T C A G - - G A C C T C G G G T C G - A A G G C T G C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces nodosus</i> .SEQ
76	G A C C A A C C A C C C - - A T C A C C - C C G - - A A C C A G C G G C T C G A G T G C A C T G G G					<i>Streptomyces nursei</i> .SEQ
75	- C T T T A G T G - - - - - A G G G T T A A T T G C G C G G - - T T G G C G T A A T C A T G G T					<i>Streptomyces parvulus</i> .SEQ
86	G A C T A C T C G - G C A C G - - G T C G G T T C G T G - - - A A C C G C T A G T A C T G C - - C					<i>Streptomyces platensis</i> .seq
84	G A C T A T T C G - G C A C - - - G A C A G G T T G A T T - A C - - T - G C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces sampsonii</i> .seq
84	G A C T A T T C G - G C A C - - - G A C A G G T T G A T T - A C - - T - G C T A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces setonii</i> .seq
87	G A C T A T T C G - G C A C A - - T C G G G T T G G T T - - - G - T T T C C A G T A C T G C - - T					<i>Streptomyces sulphureus</i> .seq
61	G A C T A C T C G - G C A C A C T T G A T - - C C T G A T - C T T C T C G G T A G T A C T G C T T C					<i>Streptomyces tendae</i> .seq
92	G A C T A C T C G - G C A C A - C - - T T G A T C G T C T - T C T C T T C T A G T A C T G C T C T					<i>Streptomyces violaceorectus</i> .SEQ
76	G A C C C A T C C C C - - A - C A C C - C A A C A C C T C A C G - - - G C G C C T T C G G C G A G					<i>Streptomyces violaceoruber</i> .SEQ
63	G A G T G T T C T T G C G C T G C G G G T G C T C G G A G G A T T A G T G G A A A C G C T G A C C G					<i>Streptomyces violens</i> .SEQ
72	G A C C A A C C A C C C - - A T C A C C - C C G - - A G C C T G A C G C T C G A G T G C A C T G G G					<i>Streptomyces viridochromogenes</i> .SEQ

	160	170	180	190	200	
102	- - C G G G - - - C G T G G A A A G C G T T T C T - - - T G A G - T C T G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora kifunensis.SEQ
102	- - C G G G - - - C G T G G A A A G C G T T - C T - - - T G A G - T C T G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora azatica.SEQ
104	- - - - G G G G C G T G G A A C G C A G - G T C C - - - T G A A G - C G G G - T G T G C C G G G C A C					Kitasatospora brunnea.seq
105	- T C C G G G G C G T G G A A A G C G G C G T T C - - - C G G A G G C G G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora cineracea.SEQ
102	- - - - - G G C G T G G A A G A C G T G G T C A - - - C C A G C T T G G - - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora cochleata.SEQ
102	- - C G G G - - - C G T G G A A C G T G G G T T T - - G T G A C - T G G G T - C G T G T C G G G C A C					Kitasatospora cystarginea.SEQ
105	- - C G G G - - - C G T G G A A A G T G A G A C C A A A G C G A G G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora gansuanensis.SEQ
104	- - - - - G G G G T G T G G A A C G C G G G T T C - - - - G A A G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora griseola.SEQ
104	- - - - - G G G C G T G G A A C G C G G - - T G - - - - G A G G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora mediocidica.SEQ
105	- - - - - G G T C G G T G G A A G A C G G T T C A - - - - T G G G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora melanogena.SEQ
106	- - C G G G G - C G T G G A A A G C G G T T C T C - - - T G G G A G T G A C - T G T G C C G G G C A C					Kitasatospora niigatensis.SEQ
105	- - - - - T G - G C G C C G G A A G A G A T T C - - - T G G A T G C A G - - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora paracochleata.SEQ
105	- - - - - G G G G C G T G G A A G A C A G G - - G - - - - A C C G C T T G G - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora phosalacinea.SEQ
103	- - - - - - G G C G T G G A A C A C A G G C G T - - - C T C A T C C G G - - T G T G T C G G G C A C					Kitasatospora putterlickiae.SEQ
104	- - - - - - G G C G T G G A A A G C G C T T C - - - G T C T G G T C - G T - C G G G T C G G G C A C					Kitasatospora setae.SEQ
105	C T C G G G G G C G T G G A A C G C - G - G T A C - - - C G C - - - T G G G - T G T G C C G G G C A C					Kitasatospora streptosporus.SEQ
128	C C T C G G A G C G T G G A A A G C G - A A C T G A A - T G A A T T C C G - G G T A C T G T G C G C					Kitasatospora terrestris.SEQ
32	- - - - - - G G C G T G G A A A A C - - A G T T C A A - G A G G C G G G G - A G T G T C G G G C A C					Stamm 2147-7.SEQ
104	- - - - - G G G G C G T G G A A C G C G G - - T G - - - - G A G G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Stamm 62 1TA 26.SEQ
146	C A T A G C T G T T T C C T G T G T G A A A T T G T - - - T A T C C G C T C A C A A T T C C A C A C					Stamm HKI-2122-22.SEQ
104	- - - - - - G G G C G T G G A A C G C G G - T T C - - - - G G A G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Stamm HKI-2215-18.SEQ
105	- - C G G G G G C G T G G A A C G C G G G - - G - - - - A C C G C T T G G - T G G G T C G G G C A C					Stamm HKI-2292-41.SEQ
104	- - - - - G G G G C G T G G A A C G C G G - T T C - - - - G G A G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Stamm HKI-2293-175.SEQ
106	- - - - - G G G G C G T G G A A C G C G G T G - - - - - G G G G T C G G G - T G T G T C G G G C A C					Stamm J07.SEQ
120	G C C G G C G T - - T G A A G G A C - A G C C T T A - C G - G C C G T G C C C - - T C A G A C A C					Amycolatopsis orientalis .SEQ
96	- - - - - - - - - - - A C A -					Saccharopolyspora erythraea.SEQ
145	T T C G A A G G - - - C G G A C A A G G C C C T G T G T C G G C T C G C T G A A - - A G A G A C A C					Saccharothrix. capreolus.SEQ
113	T T - - - G G T C T T G T T G T T C A A G G C T - - - T G A A G A T - - - - - C G T T T G G C A C					Streptomyces achromogenes.SEQ
109	T C - - - G G A G C G T G G A A A G C A T G A T C T C C - G G G C G G G A T - C G G G T C G G G C A C					Streptomyces acidiscabies.seq
120	G C C G G C A A C - - C G A A G A A A C A G C C A C A T C G T G C C G C T C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces albidoflavus.SEQ
122	G T C G G C A - C - - T G A A G G C A - G C C G A A A C C G - G C C G T A C C C - - T C A G A T A C					Streptomyces alboniger. SEQ
104	- - - - - - G C G T G G A A C G T G A T T G C T G A - G A G G G G A T T - C G T G T C G G G C A C					Streptomyces albosporeus.seq
129	T - C G - - - G C G T G G A A C A C A G G A T C T T - - - G G C T G G A C - G T G - T C G G G C A C					Streptomyces ambofaciens.seq
109	T C - - - G G G T G T G G A A C G C A T G A T C T T C - G G A C G G T A C - C G G G T C G G G C A C					Streptomyces antibioticus.SEQ
129	C G C A A G A G C G T G G A A C G C A T G A T C T T C C - G G G C G G G A G - T T G G C C G G G C A C					Streptomyces aureofaciens.SEQ
136	T C - - - - G G C G T G G A A A G C G - A A C A T G G - G A G G G C G A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces avermitilis.SEQ
137	T T C G G G G G C G T G G A A A G C - T G A T C T - G - A G T G T G A G - G G T G C C G G G C A C					Streptomyces bottropensis.seq
129	T C - - - - G G C G T G G A A C G C G - A - - A G A G - C G A - C T G T G - G G T G T T G G G C G C					Streptomyces cacaoi.SEQ
129	G C C G G C G - - - - - A C T G A G G A A A A T C - - - - C A T T C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces caelestis.SEQ
145	C C - - - - G C G T T G G A A C C A C G G G A T C A T G G A G T C G G T A C T A G G T C C G G C A C					Streptomyces candidus.SEQ
128	T T C G G - A G C G T G G A A A G C - T G A T C A - C - A G T G G C G G G - G G T G C C G G G C A C					Streptomyces canus.seq
103	- - - - - G G C G T G G A A C G C G T A A C T G G G C T - G G T C G G - - - T G T C G G G C A C					Streptomyces cattleya.SEQ
121	A C G G G C G A G G G G A G G G G T G A C A T G T G G G A C G A G C C T C A G G G C C G G G C C					Streptomyces celluloflavus.SEQ

	160	170	180	190	200	
122	G C C G G A G T C - - A G A A G G A C G A C C - - A A C C G - G C C G T A C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces clavuligerus.SEQ
131	- - - - - G G C G T G G A A A A C - - A G T T C A A - G A G G T T G A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces coelicolor.seq
136	G C C G G C A A C - - T G A A G G C G A C C T C A C G G C - - - C G T A C C C - - T C A G A - A C					Streptomyces cyanogenus.SEQ
128	T C - - G G A G C G T G G A A A C G C - C G A T C A C G - A G T G G C G A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces diastatochromogenes.seq
127	T C - - G G - - C G T G G A A A C G G - A A C G G C T G - G G T G G C G A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces eurythermus.seq
119	G C C G G C A - T - - C G C G A A G G - G C G A G C A A C G - C T C G - A C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces fradiae.SEQ
128	T C - - - - G G C G T G G A A A C G T G - G - - T G A G - G G A - T C G G T - C G T G T C G G G C A C					Streptomyces griseus.seq
105	- - - - - G G C G T G G A A A A C C A G T G A T A G - T C G A G G G G A - T - C G T G G G C A C					Streptomyces lavendulae.seq
119	A C C G G T C T C - - C A T G T C C G A G - - - G G G A C T C A T C G T T C C T - - T C A G G - A C					Streptomyces lincolnensis.SEQ
107	- - - - - G G C G T G G A A A C A C G A G T A A - G G - G A A G G C A A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces lividans.seq
108	- - - - - G G C G T G G A A A C G T G A A C A C - - A - T C A A C T G G C - T G G G C C G G G C A C					Streptomyces mauvecolor.seq
135	G C C G G C A G A - - A G G A A C A G A C C A T A A G T C - - - C G T A C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces mobaraensis.SEQ
133	T C - - - - G G C G T G G A A A C G C G - A A G C T C A - T C A A C T G A C - C G G G T C G G G C A C					Streptomyces neyagawaensis.seq
130	C G T G A G A G C G T G G A A A C G C A T G A T C T T C - G G A C G G G A C - T T G G C C G G G C A C					Streptomyces nodosus.SEQ
121	G C C G G C A - C - - T G A A G G C G - A C C T T G - - C G - G C C G T A C C T - - T C A G A C A C					Streptomyces nursei.SEQ
115	C A T A G C T G T T T C G T G T G T G A A A T T G T - - - T A T C C G C T C A C A A T T C C A C A C					Streptomyces parvulus.SEQ
127	T T C G - G G G C T T G G A A C G T G - G G G A T C G - G C T G A T G - - - - T G T C G G G C A C					Streptomyces platensis.seq
124	T C - - - - G G C G T G G A A A C G T G - G - - T G A G - A G A - T C G G T - T G T G T C G G G C A C					Streptomyces sampsonii.seq
124	T C - - - - G G C G T G G A A A C G T G - G - - T G A G - A G A - T C G G T - T G T G T C G G G C A C					Streptomyces setonii.seq
127	T C - - - - G G C G T G G A A A C G G G - A T G A C G G - A T G C G T G - - - - T G T C G G G C A C					Streptomyces sulphureus.seq
107	- - - - - G G C G T G G A A A C A C G A G T G A - G G - G A A G G C A A G - G G T G T C G G G C A C					Streptomyces tendae.seq
137	T C - - G G A G C G T G G A A A C G T - T G A G G G - G - A G C G G G G A G - T G T G T C G G G C A C					Streptomyces violaceorectus.SEQ
119	A C C G G T C T C - - C A T G T C C G A G - - - G G G A C T C A T C G T T C C T - - T C A G G - A C					Streptomyces violaceoruber.SEQ
113	T T - - - G G T C T T G T T G T T C A A G G C T - - - T G A A G A T - - - - C G T T T G G C A C					Streptomyces violens.SEQ
117	G C C G G C A A C - - T G A A G G A A - G T T - - - - - - - C A T T C C C - - T C A G A C A C					Streptomyces viridochromogenes.SEQ

	210	220	230	240	250	
142	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A G	- T A - - A T C G T T	- - - G T C T C A G - -	- T	Kitasatopora kifunensis.SEQ
141	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C	- C G T - A T G G T C T G A A C C T C G A G G A T			Kitasatopora azatica.SEQ
145	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C	- T - - - T T G C C G T T G T C T C G T G G A -			Kitasatopora brunnea.seq
151	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C	- C A - - G T G G T C G T T G T C T T C A G G T -			Kitasatopora cineracea.SEQ
142	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A C G G A - - - - - G T G A T C G T T G C C T C A T G G A G				Kitasatopora cochleata.SEQ
143	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A G C G G C - C G T - T T G G C T G G T A C C T C A T G G T T				Kitasatopora cystarginea.SEQ
149	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C - C G T - A T G G T C G T T G C T T C A G - - - T				Kitasatopora gansuanensis.SEQ
145	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A - - - - - G T G A T C G T T T C T T C T G G G A T				Kitasatopora griseola.SEQ
143	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G - - - - - A - - - - A G T T G C C T C A A G G A T				Kitasatopora medicidica.SEQ
146	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C - C G T C A T G G T C G T T G C T T C A G A G A T				Kitasatopora melanogena.SEQ
150	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A - - - - - G T G A T C G T T T T C T C A T G G A T				Kitasatopora niigatensis.SEQ
144	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G - - - - - G T A A T C G T T G C C T C A T G G A G				Kitasatopora paracochleata.SEQ
144	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C - T - T G C - C G T - - T - G T C T C T G G A T				Kitasatopora phosalacinea.SEQ
143	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G - - - - - - A A A C G T - A C C T C G - G T G A				Kitasatopora putterlickiae.SEQ
143	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A - - - - - G T A A T C G T T G T C T T C A G G T T				Kitasatopora setae.SEQ
147	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G T - T - - - - T T T C C G T T G T C T C A T G G A -				Kitasatopora streptosporus.SEQ
175	G C T G T T G G G T	G T C T G A A G G T A T G G T - C G T - A - - A - - - G G C T G C C T T C G A				Kitasatopora terrestris.SEQ
72	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G A G C G G C - C A C - G A T T T G C T G T T C T T C G G T				Stamm 2147-7.SEQ
143	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G - - - - - A - - - - A G T T G C C T C A A G G A T				Stamm 6Z 1TA 26.SEQ
193	A A C A T - A C G A G C C G G A A A G C A T A A A G T G T A A A G C C T G G G G T G C C T A A T G A					Stamm HKI-2122-22.SEQ
144	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A - - - - - G T C T T C G T T G T C T C A G T G G T				Stamm HKI-2215-18.SEQ
146	G C T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A T - T - T T T C G T - - T C G C C T C T G G G A T				Stamm HKI-2292-41.SEQ
144	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A - - - - - G T C T T C G T T G T C T C A G T G G T				Stamm HKI-2293-175.SEQ
145	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G G C - C G T C A T G T C T G A A C C T C A T A G G A T				Stamm J07.SEQ
163	C C A A C A G C G T G C C C G A C A C A - - T C C A G A T G G T - - C C A T C A C G T T C C A C G C					Amycolatopsis orientalis .SEQ
99	- - G T G T G T T C C C T C A G G A C C C A A C A A C G T G C C A A A C G - - - A T C T T C A A G C					Saccharopolyspora erythraea.SEQ
191	T C G C G T G T T C T C T C A G G A C C C A A C A G C G T A C C G A A C A G A A A C C C T G A A C C					Saccharothrix. capreolus.SEQ
151	G T T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C A - - - C A C T G T G - - - - - - - - - - - - - - - - - -				Streptomyces achromogenes.SEQ
155	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G A A T G A A - C C C - - - - - - - - - - - C C T G T G A				Streptomyces acidiscabies.seq
166	C C A A C A G C G T G C C C G A C A - - - - - C T C C C G C C T C T T G A A C T G T T T T C C A C					Streptomyces albidoflavus.SEQ
165	C C A A C A G C G T G C C C G A C - - - A C C C T T A C C G C T T C C C T C A A C G T T C C A C G C					Streptomyces alboniger.SEQ
146	G C T G T T G G G T	A T C T G A G G G A A T G A - - - - - - - G T T T C - - - - C T T C A - G T				Streptomyces albosporeus.seq
170	G C T G T T G G G T	A T C T G A G G G T A C G G C - C G T - - T G G C C - T G - - - C T T T - C A G				Streptomyces ambofaciens.seq
155	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G C A C G G C - C G C - A A G G C - - - C T G G T C T T C G G G A				Streptomyces antibioticus.SEQ
177	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G T A C G G C - C G T - G T G G T C - G - - - - C C T T - C A G				Streptomyces aureofaciens.SEQ
179	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G T A C G G C - C G A - T - - - T G - T G G C T G C T T T C A G				Streptomyces avermitilis.SEQ
183	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G - A - - - - - A T - G A A T T T - - - - - T C C T T C A G T				Streptomyces bottropensis.seq
169	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G T G C G G C - C G T - G T G G - - - - T C G T G T C T T C G G				Streptomyces cacaoi.SEQ
165	C C A A C A G C G T G C C C G A C A G - - - C A A G C T G A C A G A T C A G C G T T C C A C G C					Streptomyces caelestis.SEQ
190	G C T G T T T G G T	G T C T G A A G G A A C C G C - C A C - G T T G T G C G T T T C T T C A G T				Streptomyces candidus.SEQ
173	G C T G T T G G G T	G T C T G A G G G T G - - - - - A C - G C G T T G - C T C G T C C T T C G G A				Streptomyces canus.seq
142	G C T G T T G G G T	- C C T G A G G G A A C G A T - G A - - - - - - - - - - - - - - - - -				Streptomyces cattleya.SEQ
171	A C G G C C G G - A T C - G A G G C C A G G A C - C G G G G T C G G G A C C G G G G C C A G G A C					Streptomyces celluloflavus.SEQ

	210	220	230	240	250		
165	C C A A C A A C	G T G C C A A G	C G C G G G T -	C T T C T C G G	T T C A T C C C	G T G T T C C A C G C	Streptomyces clavuligerus.SEQ
171	G C T G T T G G	G T G T C T G A	G G G A G C G G	C - C A C - G A	T G T G G C T G	T T C T T C G G T	Streptomyces coelicolor.seq
177	C C A - C A G C	G T G C C C G A	C G G C C - - T	T G C C T T C C	C C T T A C T C	G T G T T C C A C G C	Streptomyces cyanogenus.SEQ
173	G C T G T T G G	G T G T C T G A	G G G - A - - -	- - - A T - G A	A A C T - - - -	- - - T C C T T C A G T	Streptomyces diastatochromogenes.seq
170	G C T G T T G G	G T G T C T G A	G G G - A - - -	- - - A T - G A	A A C T - - - -	- - - T T C C T C A G T	Streptomyces eurythermus.seq
161	C C A A C A G C	G T G C C C G G	C A G A C C G C	C G T T C C G T	A T C C C T - -	C G T T C C A C G C	Streptomyces fradiae.SEQ
168	G T T G T T G G	G T G T C T G A	G G G T A C G G	C - C G - - A T	G A - - - G G	C T G C C T T C T G	Streptomyces griseus.seq
146	G C T G T T G G	G T A T C T G A	G G G T A C G G	C - C G T - A A	G G T - - C T	T A T C T T C G C G A	Streptomyces lavendulae.seq
161	C C A A C A G C	G T G C C C G A	C A C - - C A	C C A G C T C A	G T T A C - - -	G C G T T C C A C G C	Streptomyces lincolnensis.SEQ
148	G C T G T T G G	G T A T C T G A	G G G T A C G G	C - C G T - G A	G G T C G C - -	- - - C T T C A - G T	Streptomyces lividans.seq
148	G C T G T T G G	G T G T C T G A	A G G C A C G G	G - C T T - A T	G C C T G C T G	G T C T T C G - G T	Streptomyces mauvecolor.seq
177	C C A A C A G C	G T G C C C G A	C C C G A - - C	A G C T C A C -	- A A T T C A	C G T T C C A C G C	Streptomyces mobaraensis.SEQ
176	G C T G T T G G	G T A T C T G A	G G G T G C G A	G - C G T - T -	- - - G C - T C	G C T C T T C A C G A	Streptomyces neyagawaensis.seq
178	G C T G T T G G	G T G T C T G A	G G G C A C G G	C - C G T - T T	G G T C - G G	A A G C C T T - C G G	Streptomyces nodosus.SEQ
162	C C A A C A G C	G T G C C C G A	C - - - A C	A C T C C C G C	T T C C C T C G	A C G T T C C A C G C	Streptomyces noursei.SEQ
162	A A C A T - A C	G A G C C G G A	A - G C A T	A A A G T G T A	A A G C C T G G	G G T G C A T A A T G A	Streptomyces parvulus.SEQ
169	G C T G T T G G	G T A T C T G T	G G G T G - A C	G - C G T - T G	- - - C - T C	G T C C T T C G C G A	Streptomyces platensis.seq
164	G T T G T T G G	G T G T C T G A	G G G T A C G G	C - C G - - A -	G A - - - G G	C T G C C T T C T G	Streptomyces sampsonii.seq
164	G T T G T T G G	G T G T C T G A	G G G T A C G G	C - C G - - A -	G A - - - G G	C T G C C T T C T G	Streptomyces setonii.seq
166	G C T G T T G G	G T A T C T G A	G G G T A C G G	A - C T T - C A	A G T C - T G	G A C C T T C G T G A	Streptomyces sulphureus.seq
148	G C T G T T G G	G T A T C T G A	A G G T A C G G	C - C G T - G A	G G T C G C - -	- - - C T T C A - G T	Streptomyces tendae.seq
181	G C T G T T G G	G T G T C T G A	G G G - A - - -	- - - A T - G G	A T T T - - - -	- - - T T C C T C A G T	Streptomyces violaceorectus.SEQ
161	C C A A C A G C	G T G C C C G A	C A C - - C A	C C A G C T C A	G T T A C - - -	G C G T T C C A C G C	Streptomyces violaceoruber.SEQ
151	G T T G T T G G	G T - C C T	G A G G G A A C	A - - - G A	C T G T G - - -	- - - - - - - - - -	Streptomyces violens.SEQ
152	C C A A C A G C	G T G C C C G A	C C G G A C T C	T G T C C G	G A G G T C G T	G - C G T T C C A C G C	Streptomyces viridochromogenes.SEQ

	260	270	280	290	300		
214	C - - - G A A G C A G T A C T A A C A G G A G A C - - T C T G A - - A G A A T C G C G C C A A C T					Streptomyces	clavuligerus.SEQ
219	T G C C G G C C C C G G T - - A T A G G T C T - - - G C T T C G - G C G G G T T G T G A C G G G T					Streptomyces	coelicolor.seq
224	C - - - G A A G C A G T A C T G A C G A G A A G - A T C A G G A - - T C A A G T G T G C C G A G T					Streptomyces	cyanogenus.SEQ
209	- G C C G G C C C C A G T - - G C A C - T C G A A C C - G C T G G T T C - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	diastatochromogenes.seq
206	T G C C G G C C C C A G T - - G C A C - T C G G A C C T G T T G G T T C - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	eurythermus.seq
209	T C C G A A G A G C A G T A C T A G A G A A G A C C G A A C T G G - - T C G A A C C T G C C G A G T					Streptomyces	fradiae.SEQ
211	A T C C G G C C C C A G T - - G A A C - T C A T C C G G T T T C G G G T - - G G G G T G G T G G G T					Streptomyces	griseus.seq
192	T G C C G G C C C C A G T - - A A A A A C T C T C G - - - T T C G G C A G G G T G T G A T G G G T					Streptomyces	lavendulae.seq
206	T - - - G A A G C A G T A C T A A C G A - - - - - A C C T T A - - C C A G C A G T G C T G A A T					Streptomyces	lincolnensis.SEQ
191	T A C C G G C C C C A G T - - G C A - - C T C G G G A T G T A G G T T C C G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	lividans.seq
195	C G C C G G C C C C A G T - - G C A C - T C A C C A G G T T C T G G T - - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	mauvecolor.seq
223	C - - - G A A G C A G T A C T A G C G A T - - - - - C C C T C A - - C C G A T C G T G C C G A A T					Streptomyces	mobaraensis.SEQ
220	T G C C G G C C C C G G T - - G T A G - C A - - C C G C T T A G G T G G - - T G T G T G A C G G G T					Streptomyces	neyagawaensis.seq
224	T G C C G G C C C C A G T - - A A A C - T C G C T G G T T T T T C A G C - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	nodosus.SEQ
209	T C C G A A G A G C A G T A C T A G A A G G A G A A G A - - C G A - - T C A A G T G T G C C G A G T					Streptomyces	noursei.SEQ
210	- G T G A G C C - - - - - - - A A C T C A C A T T A A T T - G C G T T - - - G C G C T C A C T					Streptomyces	parvulus.SEQ
212	T G C C G G C C C C A G T - - G A A C - T C - - A G C C T T C G G G T T - - G G G G T G G T G G G T					Streptomyces	platensis.seq
206	A T C C G G T C C C A G T - - G A A C - T C G C C T G - - T T T G G G C - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	sampsonii.seq
206	A T C C G G T C C C A G T - - G A A C - T C G C C T G - - T T T G G G C - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	setonii.seq
213	T G C C G G C C C C A G T - - G A A C - T C - - A G C C T T C G G G T T - - G G G G T G G T G G G T					Streptomyces	sulphureus.seq
191	T G C C G G C C C C G G T - - A A A G A T C T G C G A A A G T G G G T T - - - - G T G A C G G G T					Streptomyces	tendae.seq
218	C G C C G G C C C C A G T - - G A A C - T C G - - C C T G T A A A G G T - - G G G G T G A T G G G T					Streptomyces	violaceorectus.SEQ
206	T - - - G A A G C A G T A C T A A C G A - - - - - A C C T T A - - C C A G C A G T G C T G A A T					Streptomyces	violaceoruber.SEQ
180	T G T G G G C T T -					Streptomyces	violens.SEQ
201	T C T T A C G A G C A G T A C T T G A A G C A T C C G A - - C C C - - A G A C T C A G G C C G A G T					Streptomyces	viridochromogenes.SEQ

	310	320	330	340	350	
209	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora kifunensis.SEQ
223	G T A - G G T - G G G T G T C T G G T C G T T G C - T - T G A - A A A C - T G C C C A G T G G C A					Kitasatospora azatica.SEQ
236	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora brunnea.seq
245	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora cineracea.SEQ
234	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora cochleata.SEQ
239	G A C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora cystarginea.SEQ
238	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T					Kitasatospora gansuanensis.SEQ
232	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora griseola.SEQ
225	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G					Kitasatospora medicidica.SEQ
238	G A C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora melanogena.SEQ
235	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Kitasatospora niigatensis.SEQ
237	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G T C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora paracochleata.SEQ
231	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora phosalacinea.SEQ
210	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora putterlickiae.SEQ
233	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora setae.SEQ
238	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora streptosporus.SEQ
260	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - G - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Kitasatospora terrestris.SEQ
164	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Stamm 2147-7.SEQ
225	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Stamm 6Z ITA 26.SEQ
278	G C C C G C T - T T C C A G T C G G G A A - A A C C T G T C G T G C C A G C T - G C A					Stamm HKI-2122-22.SEQ
235	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G G					Stamm HKI-2215-18.SEQ
236	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G G					Stamm HKI-2292-41.SEQ
235	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G G					Stamm HKI-2293-175.SEQ
237	G T C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G N G G A C G C G A G C N T C T G					Stamm J07.SEQ
248	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C A G C A T C A G A C G T T C G C - T - G A T G T					Amycolatopsis orientalis .SEQ
179	A A T C C - - - - T C - C G - - - - - A G C A C C C A C - A G C G C A A G A A C - - A C T C					Saccharopolyspora erythraea.SEQ
289	A A T C C G A G A T C C - T G C A T T A G C C A G C A T C C A C T A A T A T G A G C T C - C A C C C					Saccharothrix. capreolus.SEQ
189	G T C T G G T - T G T T G T T T G A G A A C T G T - A - T A G T G G A T G C G A G C A T C T T T					Streptomyces achromogenes.SEQ
234	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces acidiscabies.seq
255	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C A G C A T C A G A C A T T C G C - T - G A T G A					Streptomyces albidoflavus.SEQ
258	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C A G C A T C A G A C A T T C G C - T - G A T G G					Streptomyces alboniger.SEQ
226	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces albosporeus.seq
256	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces ambofaciens.seq
244	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces antibioticus.SEQ
263	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces aureofaciens.SEQ
266	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces avermitilis.SEQ
262	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces bottropensis.seq
258	G G C T G G T - T G T T G T C T G A G A A C T G C - A - C A G C G G A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces cacaoi.SEQ
239	- - - - - C C A T C C - T G G - - - A C C - G T G C C G A - - - - - - - - - - - G -					Streptomyces caelestis.SEQ
246						Streptomyces candidus.SEQ
258	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces canus.seq
185	G A C C G G T - C - T C G C C G A A G - - - - - - - - - - - - - - - C C C G T G -					Streptomyces cattleya.SEQ
266	C A C T A G T - T C T A G A G C G G C C G C C A C C G - C G G T G A G C T C C A G C T T T G T T C					Streptomyces celluloflavus.SEQ

	310	320	330	340	350	
256	A A T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C T G A C C G T G C A G A A C G T T T G C - C - T G C A -					Streptomyces clavuligerus.SEQ
262	G G T T G G T - C G T T G T T T - A G A A C T G C - A - C A G - G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces coelicolor.seq
267	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C - G T G C A G G A C A T T T G C - C - - T G -					Streptomyces cyanogenus.SEQ
252	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G A A C G C G A G C G T C T G T					Streptomyces diastatochromogenes.seq
251	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces eurythermus.seq
257	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C A G C A T C A G A C G T T C G C - T					Streptomyces fradiae.SEQ
256	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces griseus.seq
236	G G C T G G T - C G T T G C T T G A G A A C C A C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces lavendulae.seq
244	A G T C A A C G T T C C A C T T A T G A G C A A C C A T T C C G G G A C G T T C G C - T - - - -					Streptomyces lincolnsensis.SEQ
236	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Streptomyces lividans.seq
239	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces mauvecolor.seq
262	A G T C A A C G T T C C A T C C A T G A G C A A C C - G T G C A G A A C G T T T G T - C - - T G -					Streptomyces mobaraensis.SEQ
263	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Streptomyces neyagawaensis.seq
269	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G A A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces nodosus.SEQ
255	A G T C A A C G T T C C A C T C A T G A G C A A C C A G C A T C A G A C G T T C G C - T - G A T G T					Streptomyces noursei.SEQ
245	G C C C G C T - T T C C A G T C G G G A A - A - C C T G T C G T G C C A G C T - G C A T T A A T G A					Streptomyces parvulus.SEQ
255	G G C T G G T - C G T T G C T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces platensis.seq
249	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Streptomyces sampsonii.seq
249	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Streptomyces setonii.seq
256	G G C T G G T - C G T T G C T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T					Streptomyces sulphureus.seq
234	G G T T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G					Streptomyces tendae.seq
261	G G C T G G T - C G T T G T T T G A G A A C T G C - A - C A G T G G A C G C G A G C A T C T G T G					Streptomyces violaceorectus.SEQ
244	A G T C A A C G T T C C A C T T A T G A G C A A C C A T T C C G G G A C G T T C G C - T - - - -					Streptomyces violaceoruber.SEQ
189	G T C T G G T - T G T T G T T T G A G A A C T G T - A - T A G T G A A T G C G A G C A T C T T T G -					Streptomyces violens.SEQ
247	A G T C A A C G T T C C A C C C A T G A G C A A C C A					Streptomyces viridochromogenes.SEQ

	360	370	380	390	400	
303	A T C G G T	- - - - -	A C T	- - - - -	- - - - -	Streptomyces clavuligerus.SEQ
304					G T G C T	Streptomyces coelicolor.seq
311	- - C A G T C	- - -	G G C T			Streptomyces cyanogenus.SEQ
296						Streptomyces diastatochromogenes.seq
295						Streptomyces eurythermus.seq
299						Streptomyces fradiae.SEQ
300						Streptomyces griseus.seq
280						Streptomyces lavendulae.seq
287	- - - - -	- - - - -	C G A A G T T G G T T	- - -	A T G T G C T	Streptomyces lincolnensis.SEQ
279						Streptomyces lividans.seq
283						Streptomyces mauvecolor.seq
306	- - C A G T C	- - -	G G S T	- - - - -	A T G T G A T	Streptomyces mobaraensis.SEQ
306						Streptomyces neyagawaensis.seq
314						Streptomyces nodosus.SEQ
303	A C T G G C C T C T					Streptomyces nursei.SEQ
291	A T C G G C C A A C G	- -	C G C G G G G A G A G G C G G T T T G C G T A T	- - - - -	T G G G C G C	Streptomyces parvulus.SEQ
299						Streptomyces platensis.seq
292						Streptomyces sampsonii.seq
292						Streptomyces setonii.seq
300						Streptomyces sulphureus.seq
277						Streptomyces tendae.seq
306						Streptomyces violaceorectus.SEQ
287	- - - - -	- - - - -	C G A A G T T G G T T	- - -	A T G T G C T	Streptomyces violaceoruber.SEQ
235	- - - - -	- - - - -	T G			Streptomyces violens.SEQ
273						Streptomyces viridochromogenes.SEQ

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, die eingereichte Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen Hilfsmittel und Quellen als die angegebenen benutzt zu haben.

Alle Zitate sind gekennzeichnet, und alle Abbildungen enthalten nur die originalen Daten und sind in keinem Fall inhaltsverändernder Bildbearbeitung unterzogen wordeiterhin versichere ich, daß ich diese Dissertation noch an keiner anderen Universität eingereicht habe, um ein Promotionsverfahren eröffnen zu lassen.

Jena, den 01.07.2004

Sebastian Günther

Lebenslauf

Persönliche Angaben: Geburtsort: Leinefelde

Geburtsdatum: 31.07.1976

Familienstand: ledig

Wohnort: Lutherstrasse 2, 07743, Jena

Schulbildung:

Sept. 1983 - Aug. 1991 POLYTECHNISCHE OBERSCHULE „Erich Weinert“ in
Deuna

Sept. 1991 - Juni 1995 Staatliches GYMNASIUM in Leinefelde, Allgemeine
Hochschulreife

Zivildienst:

Aug. 1995 - Aug. 1996 Gemeinde Vollenborn

Ausbildung:

Okt. 1996 - Okt. 2000 Studium der Pharmazie,
FRIEDRICH-SCHILLER-UNIVERSITÄT Jena

April 1999 1. Staatsexamen

Dez. 2000 2. Staatsexamen

Nov.- 2000 - Juni 2001 Pharmaziepraktikant in der Abteilung F&E der Jenapharm
GmbH & Co. KG

Juni 2001 - Dez. 2001 Pharmaziepraktikant in der "Apotheke im Kaufland", Jena

Dez. 2001 3. Staatsexamen

Jan. 2002 Approbation als Apotheker

Jan. 2002 - Juli 2004 Doktorand am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung
Jena, Thema: DNA Microarray-Technik zur Klassifizierung
von Actinomyceten am Beispiel der Gattung *Kitasatospora*

Jena, den 25. Juni 2004

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Januar 2002 bis Juli 2004 am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V. Jena in der Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung durchgeführt.

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Susanne Grabley für die Möglichkeit, in ihrer Abteilung die vorliegende Dissertation anzufertigen, bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Thomas Munder, der mir stets als kompetenter Betreuer zur Seite stand und in seiner lockeren Art ein optimistisches und ergebnisorientiertes Arbeitsklima schuf.

Die Zusammenarbeit mit der Firma Clondiac Chip Technologies war eine wichtige Grundlage für die Bearbeitung des vorgestellten Themas. Vor allem danke ich hier Herrn Dr. Ralf Ehrlich für seine Unterstützung in allen technischen Fragen.

Ebenso unverzichtbar war die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Taxonomie der Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung des HKI. Die Anzucht und Bereitstellung der Stämme ermöglichten diese Arbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ingrid Groth für ihre stetige Unterstützung dieser Arbeit.

Alle Mitarbeiter und Nachwuchswissenschaftler der Abteilung Molekulare Naturstoff-Forschung haben mich in allen Phasen der Arbeit unterstützt, besonders durch die angenehme Arbeitsatmosphäre. Dafür danke ich besonders Alexander Raßmann, Janka Teutschbein, Frau Dr. Katleen Gura, Katharina Mihatsch, Katrin Jühnemann, Marc Carlsohn, Dörthe Peter und Andreas Busch. Durch die kritische Revision des Manuskripts trug Marc Carlsohn in besonderem Maße zum Gelingen dieser Arbeit bei. Hierfür vielen Dank.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, deren finanzielle und ideelle Unterstützung mir ein Studium sowie die Promotion erst ermöglichten. Weiterhin danke ich meiner Freundin Carmen, sowie allen meinen Freunden für das richtige Maß an Ablenkung von der Arbeit und für die gute Zeit in Jena.