

Johann Wolfgang Goethe-Universität

Frankfurt am Main

**Molekularbiologische Charakterisierung von
marinen Bakterien mit hämolytischer Wirkung auf
humane Erythrozyten**

Untersuchungen zur mikrobiellen Produktion von Palytoxin (PTX)

Diplomarbeit

vorgelegt

von

Petra Seemann

Diese Arbeit wurde am Institut für Toxikologie des Zentrums der Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Julius–Maximilians–Universität Würzburg und während eines 2-wöchigen Forschungsaufenthaltes am Ökologischen Institut CARMABI Foundation in Willemstad, Curaçao, durchgeführt.

Hiermit erkläre ich, dass die hier vorliegende Arbeit von mir selbst und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Frankfurt, den 9.12.2001

Petra Seemann

An dieser Stelle ist es mir Bedürfnis und Freude zugleich, mich bei allen zu bedanken, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben. Namentlich hervorheben möchte ich:

Herrn Prof. Dr. D. Mebs, dem ich für das faszinierende Thema, die uneingeschränkte Unterstützung, die stets verfügbare Diskussionsbereitschaft, die vielen wertvollen Verbindungen in die ganze Welt, welche es mir ermöglichten, meine Arbeit stets unter den besten Bedingungen sowohl in Frankfurt, Würzburg als auch Curaçao zu vollbringen, ganz besonders danken möchte.

Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz sei für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit im Fachbereich Biologie sehr herzlich gedankt.

Dem gesamten Team der Rechtsmedizin, im Besonderen Ulrich Kuch, Silke Käuferstein, und Christian Horn, danke ich für die vielen anregenden Diskussionen und die wunderbare Arbeitsatmosphäre. Bei Daniel Schaft bedanke ich mich für die Probensammlung und die zur Verfügung gestellten Bakterien-Isolate.

In Würzburg danke ich Herrn Prof. Dr. J. Hacker für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am Institut für Molekulare Infektionsbiologie in der AG „Schwämme“. Frau Dr. Ute Hentschel bin ich für die exzellente Betreuung meiner mikrobiologischen Arbeiten, ein allzeit offenes Ohr und für den tatsächlichen Beweis, dass Schwämme auch außerhalb des Labors vorkommen (Rovinj war Super!), zu besonderem Dank verpflichtet.

Christian Pabel, Christine Gernert, Lars Fieseler, Sheila Marie Pimentel-Elardo, Anja Friedrich, Markus Wehrl, allen „Legionellen“, „Colis“, „Stapylococcen“ und Hilde Merkert verdanke ich, dass ich mich in Kürze sowohl im Labor als auch im Frankenland „wie daheim“ gefühlt habe: Euch allen vielen, vielen Dank!

Für die herzliche Aufnahme am Ökologischen Institut CARMABI Foundation, Curaçao, danke ich Dr. W. L. Bakhuis und Dr. A. Debrot. Für die besten Tauchplatz-Insider-Tipps und vieles andere mehr sei Anja und Sander Scheffers vielen, vielen Dank. Weiterhin möchte ich mich bei Carlos, Brian, Oskar und den Dolphin Divers für immerwährende Hilfsbereitschaft bedanken. Ganz besonders sei meiner Freundin Kerstin Schmidt Dank, die ihren Jahresurlaub „opferte“, um mich bei den Unterwasser-Arbeiten zu unterstützen, und ohne die es bestimmt nur halb so lustig gewesen wäre...

Meinen Studienkollegen Peter Hofmann und Markus Buchhaupt sei Dank für die vielen anregenden Diskussionen und hilfreichen Tipps.

Thomas Röhner bin ich für die komfortable Computeradministration während meiner gesamten Studienzeit sehr dankbar.

Jede nur erdenkliche Unterstützung und noch viel mehr bekam ich von meiner geliebten und unvergleichlichen *patchwork-family*, der ich mehr als einfach nur dankbar bin!

Und dann wäre da noch Lutz: Ende gut – Alles gut!...

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
2	ZIELSETZUNG	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	MATERIAL	16
3.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterialien	16
3.1.2	Chemikalien, Enzyme und Kits	19
3.1.3	Lösungen und Puffer	21
3.1.4	Kulturmedien und Nährböden	25
3.1.5	Oligonukleotidprimer	29
3.2	METHODEN.....	30
3.2.1	Isolierung und Anzucht der Mikroorganismen.....	30
3.2.1.1	Herkunft des Ausgangsmaterials.....	30
3.2.1.2	Anzucht der Mikroorganismen.....	30
3.2.2	Hämolyseachweise	31
3.2.2.1	Hämolysetest im Reagenzglas	31
3.2.2.2	Hämolysetest auf Agarplatten	32
3.2.3	Charakterisierung der Hämolyse	33
3.2.3.1	Ouabain-Test	33
3.2.3.2	Thermostabilität.....	33
3.2.3.3	Enzymatische Hydrolyse	33
3.2.4	Isolierung von Palytoxin aus Invertebraten.....	34
3.2.5	Isolierung von Palytoxin aus Mikroorganismen.....	34
3.2.5.1	Butanolausschüttlung und Gelfiltration.....	35
3.2.5.2	Dialyse	36
3.2.6	16S rDNA Sequenzierung	37
3.2.6.1	Extraktion chromosomaler DNA.....	37
3.2.6.2	Amplifizierung der 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion.....	38
3.2.6.3	Herstellung kompetenter Zellen	38
3.2.6.4	Klonierung von PCR-Produkten.....	39
3.2.6.5	Plasmid-Minipräparation	40
3.2.6.6	Agarose-Gelelektrophorese	41
3.2.6.7	DNA-Sequenzierung	41
3.2.6.8	Phylogenetische Einordnung mittels BLAST und ARB	42

4	ERGEBNISSE	43
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER ISOLIERTEN MIKROORGANISMEN	43
4.1.1	Morphologie	43
4.1.2	Hämolyseaktivität.....	44
4.1.2.1	allgemeiner Hämolysetyp	44
4.1.2.2	Human- versus Schaf- Erythrozyten	45
4.1.2.3	Enzymatische Hydrolyse	46
4.1.2.4	Thermostabilität.....	48
4.2	NACHWEIS VON PALYTOXIN.....	49
4.2.1	Palytoxingehalt der Invertebraten.....	49
4.2.2	Palytoxingehalt der Mikroorganismen	50
4.3	DIREKT-PTX-ASSAY FÜR MIKROORGANISMEN.....	54
4.3.1	Entwicklung.....	54
4.3.2	Screening	59
4.3.3	Fokus	63
4.4	16S rDNA PHYLOGENIE.....	65
4.4.1	Datenbankvergleich.....	65
4.4.2	Stammbaumanalyse	69
5	DISKUSSION	70
5.1	MIKROBIELLE HERKUNFT VON PALYTOXIN?	70
5.1.1	Mikroorganismen als Naturstoffquelle bioaktiver Substanzen	70
5.1.2	Hämolysecharakteristika und 16S rDNA-Phylogenie.....	72
5.1.3	Probleme des PTX-Nachweises bei Mikroorganismen.....	76
5.2	DIE WIRKUNG VON PALYTOXIN IM NATÜRLICHEN UMFELD	78
5.3	AUSBLICK.....	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	SUMMARY	83
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
9	LITERATURVERZEICHNIS	85
10	ANHANG	93

1 Einleitung

Ozeane bedecken ungefähr 71% der gesamten Erdoberfläche, ca. 361.000.000 km² weisen eine durchschnittliche Tiefe von 5.000 m und ein Gesamtvolumen von ungefähr 1.347.000.000 km³ auf (Encarta, 2001). Es handelt sich um ein riesiges, noch weitgehend unerforschtes Ökosystem. Korallenriffe, die nur etwa 2% der Gesamtfläche ausmachen, sind Stätten hoher Biodiversität. Da sich in einem Riff mehrere Tausend Arten niederer und höherer Tiere finden können (Mebs, 1989), werden sie auch die „Regenwälder der Meere“ genannt. Auf engstem Raum leben hier Organismen unterschiedlichster Klassen und Ordnungen zusammen. Um überleben zu können, müssen sie einem starken innerartlichen und zwischenartlichen Konkurrenzdruck standhalten. Deshalb haben sie Strategien entwickelt, um nicht gefressen, überwachsen oder infiziert zu werden. Während bei Fischen Tarnung, Flucht- oder Aggressionsverhalten stark ausgeprägt sind, findet man bei sessilen Lebensformen, wie Schwämmen und Korallen, ein reiches Arsenal an biologisch aktiven Sekundärmetaboliten (Mebs, 2000), die zur chemischen Verteidigung eingesetzt werden.

Als Sekundärmetabolite werden Stoffwechselprodukte bezeichnet, die keine Funktion im Primärstoffwechsel eines Lebewesens haben, jedoch als Abfall- oder Zufallsprodukte im Laufe der Evolution eine inner- oder zwischenartliche Bedeutung erlangen konnten (Gleibs, 1998). Einige Untersuchungen lassen vermuten, dass es im Korallenriff mehr toxische Spezies als in jedem anderen Ökosystem gibt. Etwa 73% der exponiert lebenden, im Great Barrier Reef häufig vorkommenden Invertebraten aus den Taxa Porifera (Schwämme), Cnidaria (Nesseltiere), Echinodermata (Stachelhäuter) und Ascidiacea (Seescheiden) sind toxisch für Fische (Bakus, 1981). Die Synthese von diesen toxischen Naturstoffen ist mit einem hohen Energieaufwand verbunden. Es wird vermutet, dass symbiontisch lebende Mikroorganismen einen nicht unerheblichen Teil an aktiven Sekundärmetaboliten ihrem Wirt zur Verfügung stellen. Dieses Phänomen ist sehr anschaulich bei Schwämmen zu beobachten, die ein komplexes Naturstoffspektrum aufweisen und die bis zu 40% ihrer Trockenmasse aus Mikroorganismen bestehen (Hentschel et al., 2001). Zu den hochgradig toxischen Arten des Korallenriffs zählen unter anderem der Schwamm *Neofibularia nolitangere* oder „don't touch me sponge“ (siehe Abbildung 1), dessen Name schon Hinweise auf die für den Menschen gefährlichen Inhaltsstoffe gibt, und die Krustenanemonen *Palythoa caribaeorum* (siehe

Abbildung 2) und *Zoanthus pulchellus* (siehe Abbildung 3), welche eines der aktivsten Toxine im marinen Bereich, das Palytoxin (PTX), enthalten.



Abb. 1 Schwamm, *Neofibularia nolitangere*. (Foto: D. Mebs)



Abb. 2 Krustenanemone, *Palythoa caribaeorum*. (Foto: D. Mebs)



Abb. 3 Krustenanemone, *Zoanthus pulchellus*. (Foto: D. Mebs)

Die Isolierung von Palytoxin wurde erstmals 1971 an der Universität von Hawaii aus der Krustenanemone *Palythoa toxica* erfolgreich durchgeführt (Moore & Scheuer, 1971). Aufgrund der Komplexität des Moleküls gelang die Strukturaufklärung erst 10 Jahre später zeitgleich auf Hawaii (Moore & Bartolini, 1981) und in Japan (Uemura et al., 1981), 1994 gelang schließlich die *in vitro*-Synthese von Palytoxin (Suh & Kishi, 1994).

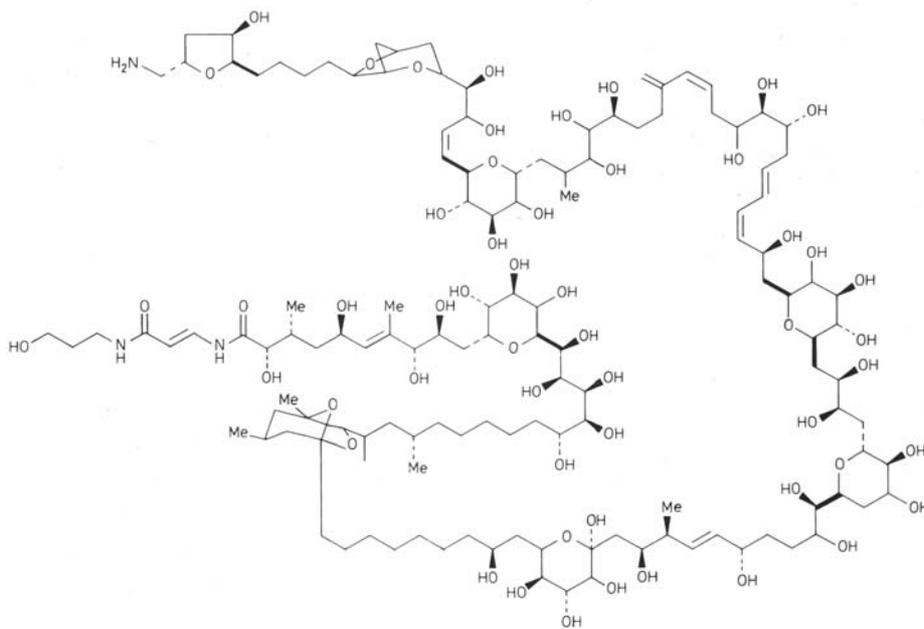


Abb. 4 Strukturformel von Palytoxin, $C_{129}H_{223}N_3O_{54}$ (Mebs, 2000).

Palytoxin gehört, mit Ausnahme von Biopolymeren, mit einem Molekulargewicht von 2.681 Dalton zu den komplexesten und größten Naturprodukten (Yasumoto & Murata, 1993). Es handelt sich um eine Polyetherstruktur, die sich durch ein langes Kohlenstoff-Grundgerüst mit vielen Ringsystemen und einer hohen Zahl an funktionellen Sauerstoffgruppen auszeichnet und insgesamt 64 chirale Zentren (Kan et al., 2001) aufweist.

In einer umfassenden Studie von Wissenschaftlern der US-Armee wurde 1974 die toxische Wirkung von PTX auf Mäuse, Ratten, Schweine, Hasen, Hunde und Affen untersucht (Wiles et al., 1974). Die Autoren veröffentlichten LD₅₀-Werte (minimale letale Dosis, bei der 50% der Versuchstiere sterben), die je nach Tierart und Art und Weise der Applikation zwischen 25 und 450 ng/kg Körpergewicht lagen. Spätere Arbeiten beschreiben LD₅₀-Werte zwischen 10 und 100 ng/kg bei verschiedenen Mammalia (Habermann et al., 1989). Diese LD₅₀-Werte zeichnen PTX neben einigen Bakterien-Toxinen (Tetanus- und Botulinum-Toxin) und einem weiteren marinen Toxin, Maitotoxin (LD₅₀: 50 ng/kg Maus, (Yokoyama et al., 1988)), als einen der giftigsten Naturstoffe aus (Moore & Scheuer, 1971).

Lange wurde über den oder die zellulären Angriffspunkte von PTX spekuliert. Die geringe Spezifität gegenüber bestimmten Zell- oder Gewebetypen deutete daraufhin, dass der primäre Angriffspunkt ein in allen Zell- und auch Tierarten vorhandener Membranbestandteil sein könnte. Da Ouabain, ein spezifischer Ligand der Na⁺-K⁺-ATPase, sich als Antagonist von PTX in Erythrozyten erwies, postulierten Habermann und seine Mitarbeiter, dass PTX mit der Na⁺-K⁺-ATPase interagiert und diese Pumpe in einen offenen Kanal umwandelt (Habermann, 1989). Der eindeutige Nachweis erfolgte in Hefezellen, die keine endogene Na⁺-K⁺-ATPase besitzen und somit keine Reaktion auf Palytoxin zeigen. Transformierte Hefezellen hingegen, die sowohl die α - als auch die β -Untereinheit der Säugetier-Na⁺-K⁺-ATPase exprimieren, zeigen sich PTX-sensitiv, was sich durch einen K⁺-Ausstrom bemerkbar macht (Scheiner-Bobis et al., 1994).

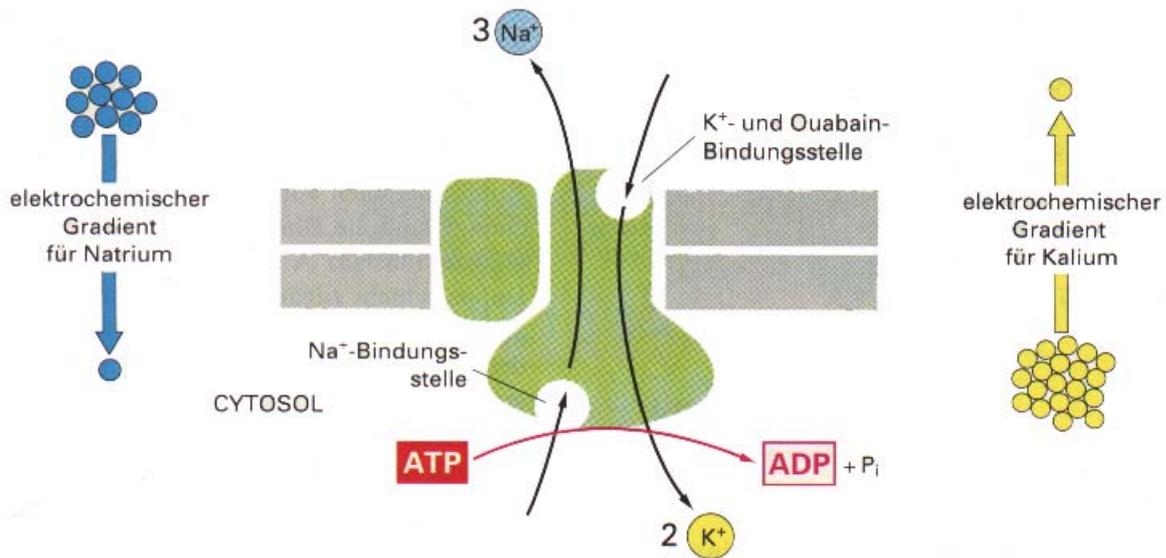


Abb. 5 Schematische Darstellung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ (Alberts et al., 1995).

Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, oder Natrium-Pumpe, ist ein oligomeres Enzym und ist aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt. Verschiedene Isoformen der beiden Untereinheiten sind bekannt. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ ist in allen tierischen Zellmembranen verankert und katalysiert den Transport von Na^+ aus der Zelle und den Transport von K^+ in die Zelle. Der Transportprozess findet gegen den elektrochemischen Gradienten der beiden Ionen statt und benötigt somit Energie, die aus der Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat gewonnen wird. Jeder Pumpzyklus verbraucht ein ATP und tauscht 3 intrazelluläre Na^+ - gegen 2 extrazelluläre K^+ -Ionen. Die hydrolytische Aktivität und somit der Transport werden durch verschiedene Herzglykoside gehemmt. PTX hingegen formt die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in einen Kationen-selektiven Ionenkanal bzw. eine Pore um (Hirsh & Wu, 1997). Na^+ , K^+ , Rb^+ , Cs^+ und weniger stark Li^+ , aber nicht Ca^{2+} , können durch die PTX-induzierte Pore diffundieren (Ishii et al., 1997; Tosteson et al., 1991). Für die Poren-bildende Aktivität ist vor allem der N-Terminus von PTX bei der Interaktion zwischen Toxin und Rezeptor wichtig, da N-Acetylpalytoxin etwa 100-fach weniger aktiv, die Sekundärstruktur dieses Toxinhomologs aber weitgehend mit der von PTX äquivalent ist (Kan et al., 2001). Während Calcium und Borat im Außenmedium und intrazelluläres ATP die toxische Wirkung von Palytoxin potenzieren (Habermann, 1989), haben Ouabain (Habermann, 1989), extrazelluläres Kalium (van Renterghem & Frelin, 1993) und monoklonale Antikörper gegen PTX (Bignami, 1993) einen inhibitorischen Effekt.

Palytoxin ist im Riff weit verbreitet. Neben *Palythoa* spp. (Moore & Scheuer, 1971; Uemura et al., 1981), woraus es erstmals isoliert wurde, konnte man es in vielen weiteren Organismen nachweisen. Eine Auswahl ist in Tabelle 1 zusammengestellt:

Tab. 1 Organismen, in denen PTX nachgewiesen wurde.

Organismus	Literatur
Rotalge, <i>Chondria armata</i>	Maeda et al., 1985
Dinoflagellat, <i>Ostreopsis siamensis</i>	Usami et al., 1995; Onuma et al., 1999
Schwämme	Gleibs & Mebs, 1999
Weichkorallen (Alcyonaria)	Gleibs & Mebs, 1999
Gorgonien	Gleibs & Mebs, 1999
Seeanemone, <i>Radianthus macrodactylus</i>	Mahnir et al., 1992
Krustenanemonen, <i>Zoanthus</i> spp. und <i>Palythoa</i> spp.	Gleibs et al., 1995
Muscheln	Gleibs & Mebs, 1999
Feuerwurm, <i>Hermodice carunculata</i>	Gleibs et al., 1995
Krabben, <i>Lophozozymus pictor</i> , <i>Demania alcalai</i> , <i>Demania reynaudii</i>	Yasumoto et al., 1986; Alcala et al., 1988
Krebs, <i>Platypodiella spectabilis</i>	Gleibs et al., 1995
Seestern, <i>Acanthaster planci</i>	Gleibs & Mebs, 1999
Sardine, <i>Herklotsichthys quadrimaculatus</i> (Analogon von PTX)	Onuma et al., 1999
Schmetterlingsfische, <i>Chaetodon</i> spp.	Mebs, 1998
Barrakuda, <i>Sphyraena barracuda</i>	Tosteson et al., 1994b
Papageifisch, <i>Ypsiscarus ovifrons</i>	Noguchi et al., 1987
Makrele, <i>Decapterus macrosoma</i>	Kodama et al., 1989
Drückerfisch, <i>Melichtys vidua</i>	Fukui et al., 1987
Kugelfische, <i>Sphoeroides spengleri</i> <i>Stegastes</i> sp. und <i>Tetraodon</i> sp.	Mebs, 1998; Taniyama et al., 2001
Feilenfisch, <i>Alutera scripta</i>	Hashimoto et al., 1969

Alle diese Organismen weisen eine hohe Resistenz gegenüber PTX auf, wobei der Schutzmechanismus noch ungeklärt ist. Somit ist es möglich, dass Krabben oder Fische das Toxin in hohen Konzentrationen anreichern und den Mensch über die Nahrungskette schädigen können (Mebs, 2000). Gerade im Zusammenhang mit Ciguatera, einer sporadisch auftretenden Fischvergiftung, wird die Beteiligung von PTX diskutiert. Während Ciguatoxin (CTX) sicherlich Hauptauslöser der Vergiftungserscheinungen bei Ciguatera ist, wird die komplexe

Vergiftungssymptomatik jedoch von mehreren Toxinen verursacht (Kodama & Hokama, 1989). Unter anderem wurde in Fischextrakten von hawaiianischen Riffischen, die im Verdacht standen, ciguatoxisch zu sein, ein hoher Anteil an PTX oder PTX-ähnlichen Substanzen nachgewiesen. Etwa 15% der dokumentierten Ciguatera-Fälle des Department of Health, State of Hawaii, implizieren das Vorhandensein von PTX (Wachi et al., 2000). Aus diesem Grund wurden spezifische Nachweismethoden für diverse „seafood toxins“, wie Ciguatoxin (Kodama & Hokama, 1989), Palytoxin, Tetrodotoxin und andere, etabliert.

Palytoxin-Intoxikationen, verantwortlich für plötzliche Erkrankungen und Todesfälle beim Menschen (Amir et al., 1997), zeigen einige charakteristische Symptome, die in Tabelle 2 zusammengefasst sind:

Tab. 2 Wirkung von Palytoxin auf unterschiedliche Organe.

Organ	Symptom	Literatur
Respiratorischer Trakt	Atemnot	Kodama & Hokama, 1989
Blut	K ⁺ -Ausstrom, Na ⁺ -Einstrom, zeitverzögerte Hämolyse bei Erythrozyten	Habermann et al., 1989
	Verringerung der Lymphozytenzahl	Ito et al., 1997
Haut	Tumorpromotion	Li & Wattenberg, 1999
Thymus	Verkleinerung	Ito et al., 1997
Leber	Vergrößerung	Ito et al., 1997
Herz, Skelettmuskulatur, glatte Muskulatur	K ⁺ -Ausstrom, Vasokonstriktion, (verantwortlich für die eigentliche Todesursache)	Attaway & Ciereszko, 1974; Kodama et al., 1989; Habermann, 1989
Verdauungstrakt	Diarrhoe	Ito et al., 1997
erregbare Zellen, Nervenzellen	Depolarisation	Ito et al., 1979; Ito et al., 1997; Dubois & Cohen, 1977
allgemein	inhibiert die zelluläre Proteinsynthese, indem es als „ribotoxic stressor“ fungiert	Iordanov & Magun, 1998

Obwohl die Entdeckung von Palytoxin etwa 30 Jahre zurück liegt, die Strukturformel und die Wirkungsweise bekannt sind, ist hingegen die Ökologie von Palytoxin, der natürliche Syntheseweg und die Funktion von PTX am Riff, noch nahezu ungeklärt.

Verschiedene Hypothesen über die Herkunft von PTX werden diskutiert:

1. Bakterien (Moore et al., 1982),
2. Dinoflagellaten (Tosteson et al., 1994b),
3. Algen (Yasumoto, 1998) oder
4. *Palythoa* spp. synthetisieren PTX selbst.

Da das gemeinsame Vorkommen von Dinoflagellaten mit der Krustenanemone *Palythoa* spp. als eher unwahrscheinlich gilt und die PTX-Produktion von Algen inzwischen eingehend untersucht, aber nicht bestätigt werden konnte (Gleibs, 1998), bleibt allein die Frage nach der bakteriellen Herkunft von Palytoxin. Für die Hypothese der PTX-Produktion durch Bakterien sprechen die hohe Toxizität, die komplexe Molekülform und die weite Verbreitung des Toxins. Doch eindeutige experimentelle Belege für den mikrobiellen Ursprung von PTX existieren noch nicht.

2 Zielsetzung

In der vorliegenden Diplomarbeit sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob Palytoxin (PTX), eines der aktivsten marinen Toxine, von Mikroorganismen produziert wird. Meine Arbeitshypothese basiert auf der Tatsache, dass ähnliche Toxine, wie beispielsweise Tetrodotoxin (TTX) und Ciguatoxin (CTX), ebenfalls mikrobiellen Ursprungs sind.

Zum Nachweis von Palytoxin wurde sich der spezifischen Hämolyse-Eigenschaft des Toxins bedient, die sich anhand der Hemmung durch Ouabain charakterisiert. Zunächst sollte eine bestehende Stammsammlung, die aus hämolytisch aktiven Bakterien-Isolaten der Weichkorallen *Palythoa caribaeorum* und *Zoanthus pulchellus* sowie dem Schwamm *Neofibularia nolitangere* besteht, näher untersucht werden. Während die Hämolyseeigenschaften dieser Isolate verglichen und charakterisiert werden sollten, lag das Hauptaugenmerk auf dem Nachweis einer PTX-vermittelten Hämolyse. Hierfür wurde ein Screening-Assay entwickelt und angewandt, mit dem es möglich ist, Bakterien direkt auf die Produktion von PTX zu untersuchen.

Darüber hinaus sollte durch den Einsatz von der 16S rDNA-Sequenzanalyse eine phylogenetische Einordnung der hämolytisch aktiven Bakterien-Isolate vorgenommen werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tab. 3 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller	Gerätebezeichnung
Autoklav	Fedegari	FOM/B50
	Fedegari	9191E
	Varioklav	5209 1291,1855
Brutschrank	Heraeus	B5050 E
	Heraeus	Kelvitron t
	Memmert	TV 40b
Dialysemembran	Roth	Spectra/Por 6; MWCO 2000
Eismaschine	Scotsman	AF-20
Faltenfilter	Schleicher & Schuell	595½ 240 mm #10 311 651
Filterpapierplättchen	Becton-Dickinson	Sensi-Disc #4354862
Gel-Dokumentation	Bio-Rad	Gel Doc 2000 mit Software Multi-Analyst 1.1
Gelelektrophoresekammer	Pharmacia	
Gefriertrocknungsanlage	Lyovac	GT 2 E
Heizblock	Laboratory Devices	Digi-Block Jr.
	Liebisch	
Heizplatte	Heidolph	MR 3001
	Heidolph	MR 3061 K
	Gerhardt	RMO
Küvette	HELLMA	QS 1.000
	Brand Plastibrand	1,5 ml Halbmicro

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller	Gerätebezeichnung
Mikropipette	Eppendorf	Research 10 (0,5-10 µl)
	Gilson	pipetman P20 (2-20 µl)
	Gilson	pipetman P200 (20-200 µl)
	Gilson	pipetman P1000 (200-1000 µl)
Mikrowelle	AEG	Micromat
Pasteurpipette	Brand Plastibrand	3 ml
pH-Meter	WTW	pH 525
Photometer	Pharmacia	Ultrospec 2000
	Pharmacia	Ultrospec 3000
	Uvikon	860
Schüttler	Braun	Certomat U
	Edmund Bühler	SM-30
	Eppendorf	Rotationsmischer 3300
	IKA	KS 125 basic
	Infors	HT
	New Brunswick Science	Innova 4230
	New Brunswick Science	Innova 4300
	Renner	Celloshaker Variospeed Variotime
Sephadex – G 50	Pharmacia Biotec	
Sequencer	Li-Cor	DNA Sequencer Model 4000 mit Software BaseImageIR 4.0h
Spannungsversorgung	Bio-Rad	Power Pac 300
SpeedVac	Savant	Univapo 150H
	Uniequip	SpeedVac SC110
Spritze	Becton-Dickinson	3 ml Luer-Lok
	Becton-Dickinson	50 ml Luer-Lok Plastipak
	Braun	10 ml Luer
Sterilbank	NUAIRE	NU-425-600E
	Nunc	Microflow

Gerät / Verbrauchsmaterial	Hersteller	Gerätebezeichnung
Sterilfilter	Millipore	Millex-GS 0,22 µm
	Millipore	Millex-HA 0,45 µm
	Nalgene	MF75 291-3320
Thermocycler	Eppendorf	Mastercycler gradient
Ultraschallbad	Bandelin	Sonorex RK100
Ultraschallstab	Bandelin	Electronic UW70
Vakuum-Rotationsverdampfer	Büchi	Waterbath B-480
Vortexer	Scientific Industries	Vortex-Genie 2
Waagen	Chyo	JL-180
	Chyo	MP-3000
	Kern	470-36
	Ohaus	Navigator
Wasseraufbereitung	GFL	Labordestille
	Millipore	Milli-Q UF Plus
Wasserbad	GFL	1083
Zentrifugen	Eppendorf	Centrifuge 5415C
	Heraeus	Biofuge pico
	Heraeus	Megafuge 1.0 R
	Heraeus	Megafuge 2.0 R

3.1.2 Chemikalien, Enzyme und Kits

Die benötigten Chemikalien, Enzyme, Fertigpuffer und Kits sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Soweit nicht anders vermerkt, wurden Chemikalien für Anwendungen in Analysenqualität verwendet.

Tab. 4 Chemikalien, Enzyme und Kits

Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Hersteller
Agar granulated	Agar	Difco
Agarose ultrapure	Agarose	Gibco
Ammoniumacetat	C₂H₇NO₂	AppliChem
Ammoniumchlorid	NH₄Cl	Merck
Ammoniumsulfat	(NH₄)₂SO₄	Roth
Ampicillin-Natriumsalz	Amp	AppliChem
Blood Agar Base (SHEEP)	Blutagar (Oxoid)	Oxoid
Blutkonserve	Humanblut	Blutspendedienst
Borsäure	B(OH)₃	AppliChem
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid	X-Gal	Sigma
1-Butanol	Butanol	Roth
Bromphenolblau	BPB	Merck
Calciumchlorid	CaCl₂	AppliChem
2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz	dATP	Sigma
2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat-Dinatriumsalz	dCTP	Sigma
2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat-Natriumsalz	dGTP	Sigma
2'-Thymidin-5'-triphosphat-Natriumsalz	dTTP	Sigma
N, N-Dimethylformamid	Dimethylformamid	AppliChem
DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>	Taq-Polymerase	Qiagen
Essigsäure	HOAc	AppliChem
Ethanol, vergällt	EtOH	Roth
Ethidiumbromid-Lösung 1%	EtBr-Lösung 1%	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat	Na₂EDTA x 2 H₂O	AppliChem
Ficoll Type 400	Ficoll	Sigma
GeneRuler 1kb DNA Ladder	1 kb Leiter	Fermentas
α-D(+)-Glucose-Monohydrat	Glucose	Roth
Glycerin, 86%	Glycerol	Roth
10×High salt buffer	10×H	Amersham

Bezeichnung	Kurzbezeichnung	Hersteller
1-Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid	IPTG	Sigma
Kaliumbromid	KBr	Fluka Chemika
Kaliumchlorid	KCl	Roth
Kaliumdihydrogenphosphat	KH₂PO₄	AppliChem
Lysozym-Hydrochlorid aus Eiwei β	Lysozym	Merck
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MgCl₂ x 6 H₂O	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	MgSO₄ x 7 H₂O	Merck
Methanol	MeOH	Riedel-de Haën
Natriumacetat-Trihydrat	NaOAc x 3 H₂O	AppliChem
Natriumchlorid	NaCl	Roth
Natriumdodecylsulfat	SDS	AppliChem
Natriumfluorid	NaF	Fluka Chemika
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO₃	Merck
Natriumhydroxid-Plätzchen	NaOH	AppliChem
Natriummonohydrogenphosphat-Dodecahydrat	Na₂HPO₄ x 12 H₂O	AppliChem
Natriumsulfat	Na₂SO₄	Ferak
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol	Triton X-100	Sigma
10 \times PCR buffer		Qiagen
pGEM-T Easy Vector System I		Promega
2-Propanol	Isopropanol	AppliChem
Proteinase K aus Tritirachium album	Proteinase K	Sigma
QIAquick PCR Purification Kit 250		Qiagen
Restriktionsendonuklease I aus Escherichia coli	Eco RI	Amersham
RNase A aus Rinderpankreas	RNase A	Roche Diagnostics
Salzsäure, 37%	HCl	AppliChem
Saponin		Sigma
Select yeast extract	Hefeextrakt	Gibco
SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kit-LC		Epicentre
Strontiumchlorid-Hexahydrat	SrCl₂ x 6 H₂O	Fluka Chemika
g-Strophanthin	Ouabain	Sigma
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid	Tris-HCl	Sigma
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Pepton	Roth
Xylencyanol		Merck

3.1.3 Lösungen und Puffer

1 kb-Marker für die Agarose-Gelelektrophorese

1 kb Leiter (0,5 mg DNA/ml)	0,2 ml
Stopp-Puffer	0,2 ml
Millipore-H ₂ O	1,1 ml

Ampicillin-Lösung, 10% (w/v)

Ampicillin-Natriumsalz	1 g
Millipore-H ₂ O	ad 10 ml

Artificial Sea Water (ASW)

NaCl	234,7 g
MgCl ₂ x 6 H ₂ O	106,4 g
Na ₂ SO ₄	39,2 g
CaCl ₂	11 g
KCl	6,64 g
NaHCO ₃	1,92 g
KBr	0,96 g
B(OH) ₃	0,26 g
SrCl ₂ x 6 H ₂ O	0,24 g
NaF	0,03 g
Millipore-H ₂ O	ad 10 l

CaCl₂-Lösung, 0,1 M

CaCl ₂	1,11 g
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Desoxynucleotidtriphosphat-Mix (dNTPs) à 10 mM

dATP 100 mM	100 µl
dCTP 100 mM	100 µl
dGTP 100 mM	100 µl
dTTP 100 mM	100 µl
Millipore-H ₂ O	ad 1 ml

Erythrozytensuspension, 0,5% (v/v)

humane Erythrozyten	500 µl
NaCl, 0,9%	ad 100 ml

EtOH, 70% (v/v)

EtOH	700 ml
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

EtBr-Färbebad für Agarosegele

EtBr-Lösung, 1% (w/v)	0,4 ml
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

EDTA, 0,5 M, pH 8,0

Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	136,1 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
mit NaOH auf pH 8,0 einstellen	

IPTG-Lösung, 1 M

IPTG	2,38 g
Millipore-H ₂ O	ad 10 ml

Lysozym-Lösung, 1% (w/v)

Lysozym	10 mg
TNEX (siehe Seite 24)	ad 1 ml

NaCl-Lösung, 0,9% (w/v) (physiologisch)

NaCl	9 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

NaCl-Lösung, 5 M

NaCl	292,2 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

Ouabain-Lösung

Ouabain	5 mg
NaCl	0,9 g
Borsäure	0,62 g
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Proteinase K-Lösung, 2% (w/v)

Proteinase K	20 mg
Millipore-H ₂ O	ad 1 ml

Puffer P1 für Plasmid-Minipräparation

Tris-HCl, 1 M, pH 7,5	5 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	2 ml
RNase A-Lösung, 1%	1 ml
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Puffer P2 für Plasmid-Minipräparation

NaOH	0,8 g
SDS	1 g
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Puffer P3 für Plasmid-Minipräparation

NaOAc x 3 H ₂ O	40,8 g
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml
mit HCl auf pH 4,8 einstellen	

RNase A-Lösung, 1% (w/v)

RNase A	10 mg
Millipore-H ₂ O	ad 1 ml

Saponinlösung, 1% (w/v)

Saponin	10 mg
Millipore-H ₂ O	ad 1 ml

Stopp-Puffer für Agarose-Gelelektrophorese

Bromphenolblau	25 mg
Xylencyanol	25 mg
Ficoll Type 400	2,5 g
Millipore-H ₂ O	ad 10 ml

Tris-HCl, 1 M, pH 7,5 bzw. pH 8,0

Tris-HCl	121 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
mit HCl auf pH 7,5 oder pH 8,0 einstellen	

50x Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer (50x TAE-Puffer)

Tris-HCl	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8	100 ml
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

Tris/EDTA-Puffer (TE-Puffer)

Tris-HCl, 1 M, pH 8	1 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8	0,2 ml
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Tris/NaCl/EDTA-Puffer (TNE-Puffer)

Tris, 1 M, pH 8	1 ml
NaCl, 5 M	0,2 ml
EDTA, 0,5 M, pH 8	2 ml
Millipore-H ₂ O	ad 100 ml

Tris/NaCl/EDTA/Triton X-Puffer (TNEX)

Triton X-100	1 ml
TNE-Puffer	ad 100 ml

X-Gal-Lösung, 2% (w/v)

X-Gal	0,2 g
Dimethylformamid	ad 10 ml

3.1.4 Kulturmedien und Nährböden

Luria-Bertani-Medium / Agar (LB-Medium / Agar)

modifiziert nach (Bertani, 1951)

Hefeextrakt	5 g
Pepton	10 g
NaCl	5 g
(Agar	15 g)
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

LB/Amp-Medium

Ampicillin-Lösung, 10%	1 ml
LB-Medium	1 l

LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar

Ampicillin-Lösung, 10%	1 ml
IPTG-Lösung, 1 M	1 ml
X-Gal-Lösung, 2%	2,5 ml
LB-Agar (handwarm)	1 l

LB-Blutagar

LB-Medium	1 l
Agar	15 g
Erythrozyten, human	20 ml

die Erythrozyten werden dem handwarmen Agar beigemischt

LB-Blutagar mit Ouabain

LB-Blutagar	1 l
Ouabainlösung	12 ml

die Erythrozyten werden mit der Ouabainlösung 30 min bei 37 °C inkubiert und dann zu dem handwarmen Agar hinzugegeben

M13-Medium

Hefeextrakt	0,25 g
Pepton	0,25 g
Glucose	0,25 g
ASW	250 ml
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

ON-Blutagar (ohne Nährstoffe)

NaCl	9 g
Agar	15 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
Erythrozyten, human	8 ml

die Erythrozyten werden dem handwarmen Agar beigemischt

ON-Blutagar mit Ouabain

ON-Blutagar	1 l
Ouabain	10 mg

die Erythrozyten werden mit der Ouabainlösung 30 min bei 37 °C inkubiert und dann zu dem handwarmen Agar hinzugegeben

PS1-Blutagar (PTX-sensitiv 1)

Hefeextrakt	1 g
Pepton	4 g
NaCl	9 g
Agar	15 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
Erythrozyten, human	8 ml

die Erythrozyten werden dem handwarmen Agar beigemischt

PS1-Blutagar mit Ouabain

PS1-Blutagar	1 l
Ouabain	10 mg

die Erythrozyten werden mit der Ouabainlösung 30 min bei 37 °C inkubiert und dann zu dem handwarmen Agar hinzugegeben

PS2-Blutagar (PTX-sensitiv 2)

Hefeextrakt	0,5 g
Pepton	2 g
NaCl	9 g
Agar	15 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
Erythrozyten, human	8 ml

die Erythrozyten werden dem handwarmen Agar beigemischt

PS2-Blutagar mit Ouabain

PS2-Blutagar	1 l
Ouabain	10 mg

die Erythrozyten werden mit der Ouabainlösung 30 min bei 37 °C inkubiert und dann zu dem handwarmen Agar hinzugegeben

PS3-Blutagar (PTX-sensitiv 3)

Hefeextrakt	0,2 g
Pepton	0,8 g
NaCl	9 g
Agar	15 g
Millipore-H ₂ O	ad 1 l
Erythrozyten, human	8 ml

die Erythrozyten werden dem handwarmen Agar beigemischt

PS3-Blutagar mit Ouabain

PS3-Blutagar	1 l
Ouabain	10 mg

die Erythrozyten werden mit der Ouabainlösung 30 min bei 37 °C inkubiert und dann zu dem handwarmen Agar hinzugegeben

YPD-Medium / Agar (Hefeextrakt/Pepton/Dextrose-Medium /Agar)

(Martinez et al., 1990)

Hefeextrakt	10 g
Pepton	20 g
Glucose	20 g
(Agar	15 g)
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

ZoBell-Medium /Agar

modifiziert nach (ZoBell, 1941)

Hefeextrakt	1 g
Pepton	5 g
(Agar	15 g)
ASW	750 ml
Millipore-H ₂ O	ad 1 l

3.1.5 Oligonukleotidprimer

Die für die PCR und DNA-Sequenzierung verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech in Ebersberg synthetisiert und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Für die Sequenzierung wurden die Primer zusätzlich mit einem Fluoreszenzmarker (IR) versehen.

Berechnung der Primer-Schmelztemperatur (T_m):

$$T_m = 62,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\%GC) - 500/n$$

n = Anzahl der Basenpaare

%GC = Gehalt der dG und dC in Prozent

Tab. 5 Oligonukleotidprimer

Primer	Sequenz	T_m [°C]	Bemerkungen
27f	5' - GAG TTT GAT CCT GGC TCA - 3'	53,7	<i>forward universal bacterial 16S rDNA</i>
1385r	5' - CGG TGT CT(A/G) CAA GGC CC - 3'	58,8	<i>reverse universal bacterial 16S rDNA</i>
M13 uni	5' - ACG ACG TTG TAA AAC GAC GGC CAG - 3'	64,4	<i>forward pGEM-T Easy, multiple cloning site</i>
M13 rev	5' - TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC - 3'	61,0	<i>reverse pGEM-T Easy, multiple cloning site</i>

3.2 Methoden

3.2.1 Isolierung und Anzucht der Mikroorganismen

3.2.1.1 Herkunft des Ausgangsmaterials

Die Krustenanemonen *Palythoa caribaeorum* und *Zoanthus pulchellus* sowie der Schwamm *Neofibularia nolitangere* wurden im Juli 2000 von Dipl. Biol. D. Schaft bei Tauchgängen in der Karibik vor Curaçao (Tauchplatz: *Water Factory*) aus einer Wassertiefe zwischen 5 und 11 m gesammelt. Je 1 g Probenmaterial wurde kleingemörsert und anschließend in 9 ml sterilfiltriertem Seewasser resuspendiert. Mit Hilfe eines Faltenfilters wurden grobe Partikel entfernt, der Durchfluss auf Blutagar (Oxoid) ausplattiert (100 µl/Platte) und anschließend bei ca. 28 °C inkubiert. Kolonien mit hämolytischer Aktivität (ca. 10% aller Kolonien) wurden auf ZoBell-Agar ausgestrichen, 1–2 Tage bei ca. 28 °C inkubiert bis sichtbare Kolonien gewachsen waren und im Anschluss bei 4 °C gelagert. In der Arbeitsgruppe von Dr. Ute Hentschel am Institut für Molekulare Infektionsbiologie der Universität Würzburg wurden insgesamt 80 Isolate (davon 33 Isolate aus *Palythoa*: P1-33 , 38 Isolate aus *Zoanthus*: Z1-34 und 9 Isolate aus *Neofibularia*: N1-9) auf Reinheit überprüft. Anschließend wurden Duplikate nach morphologischen Kriterien reduziert und nach einem stabilen Hämolysetyp gescreent. 20 Bakterienstämme fanden Eingang in die Stammsammlung, die dieser Arbeit zu Grunde lag.

3.2.1.2 Anzucht der Mikroorganismen

Soweit nicht anders angegeben wurden Mikroorganismen auf ZoBell-Agar ausgestrichen und 1–2 Tage bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Anschließend wurden die Platten bei 4 °C gelagert und nach 1–3 Wochen auf frischen ZoBell-Agar überstrichen.

Zur Erstellung von Über-Nacht-Kulturen wurde 3 ml steriles Medium in einem Kulturröhrchen angeimpft und auf einem Schüttler bei RT über Nacht inkubiert.

Zur Anzucht von 400 ml-Bakterien-Kulturen wurde in einem Erlenmeyer-Kolben steriles Medium mit 1 ml Über-Nacht-Kultur angeimpft und je nach Wachstumsgeschwindigkeit 4 bis 8 Tage bis zum Übergang in die stationäre Phase auf einem Schüttler bei 20 °C bei 100 U/min inkubiert.

3.2.2 Hämolyseachweise

Um hämolytisch aktive Bakterien zu identifizieren, wurden verschiedene Hämolysetests durchgeführt, in denen die Bakterien und deren Extrakte untersucht wurden.

3.2.2.1 Hämolysetest im Reagenzglas

(Gleibs et al., 1995)

5 ml Erythrozytenkonzentrat wurden einer humanen Blutkonserve entnommen und mit physiologischer Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt. Es folgten 3–4 Waschschrirte, in denen die Probe 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut mit 0,9%iger NaCl-Lösung auf 10 ml aufgefüllt wurde. Nach dem letzten Waschschrirte wurde der nun klare Überstand abpipettiert und das Zentrifugat auf eine 0,5%ige Erythrozytensuspension mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Pro Ansatz wurde 1 ml 0,5%ige Erythrozytensuspension mit 500 µl 0,9% NaCl – 0,1 M Borat-Lösung und dem zu untersuchenden Extrakt versetzt. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 10 min bei 3000 U/min abzentrifugiert und die Absorption des Überstandes bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt. Um einen prozentualen Hämolysewert zu erhalten, wurden pro Versuch eine Negativ-Kontrolle (ohne Rohextraktprobe) und eine Totalhämolyseprobe (mit 50 µl einer 1%igen Saponinlösung) angesetzt.

3.2.2.2 Hämolysetest auf Agarplatten

3.2.2.2.1 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von Bakterien

Eine Bakterien-Kolonie wurde von einer ZoBell-Platte gepickt und auf Blutagar ausgestrichen. Anschließend wurde die Platte bei 25 °C inkubiert und über mehrere Tage hinweg beobachtet. Das Wachstum der Bakterien wurde mit der Größe des Lysishofes korreliert.

Hämolyse-Aktivitätsberechnung:

$$\text{Hämolyse in \%} = (L - K) / A \times 100$$

L = Lysishof in mm

K = Koloniebrenite in mm

A = Agarplatten-Durchmesser in mm

3.2.2.2.2 Bestimmung der hämolytischen Aktivität von Extrakten

Mit einem Korkbohrer wurde ein 6 mm–Durchmesser-Loch in Blutagar gestanzt und 20 µl Extrakt mit einer Pipette in das Loch geträufelt. Nachdem die Flüssigkeit in den Agar diffundiert war, wurde die Platte bei 37 °C inkubiert und der Lysishof an den zwei darauffolgenden Tagen dokumentiert.

3.2.3 Charakterisierung der Hämolyse

3.2.3.1 Ouabain-Test

Werden humane Erythrozyten mit Ouabain, einem pflanzlichen Steroidglykosid aus der Gattung *Strophantus*, vorbehandelt, wird die von Palytoxin hervorgerufene Hämolyse gehemmt (Habermann, 1989). Dieses Charakteristikum gilt als spezifischer Nachweis für Palytoxin.

Durchführung für den Hämolysetest im Reagenzglas:

Pro Ansatz wurde 1 ml 0,5%ige Erythrozytensuspension mit 100 µl Ouabain-Lösung für 30 min bei 37 °C vorinkubiert, anschließend wurden 400 µl 0,9% NaCl – 0,1 M Borat –Lösung und der zu untersuchende Extrakt hinzugefügt. Nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 °C wurden die Proben für 10 min bei 3000 U/min abzentrifugiert und die Absorption des Überstandes bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt.

Durchführung für den Hämolysetest auf Agarplatten:

Humane Erythrozyten wurden mit 0,1% (w/v) Ouabain versetzt und 30 min bei 37 °C vorinkubiert, bevor sie dem noch flüssigen Agar zugegeben wurden. Die Durchführung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben.

3.2.3.2 Thermostabilität

Hämolytisch aktive Bakterien-Kulturen (3 ml, ZoBell) wurden für 10 min auf 60 °C bzw. 99 °C erhitzt. Im Anschluss daran wurde mittels des Hämolysetests im Reagenzglas überprüft, ob die Hämolyseaktivität durch die Hitze einwirkung beeinträchtigt wurde.

3.2.3.3 Enzymatische Hydrolyse

250 µl einer Bakterien-Kultur wurde mit 30 µl Proteinase K (20 mg/ml) versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde ein Hämolysetest durchgeführt und die Hämolyseaktivität vor und nach enzymatischer Hydrolyse verglichen.

3.2.4 Isolierung von Palytoxin aus Invertebraten

Faustgroße Stücke von *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* wurden gewogen und mit Methanol versetzt. Nach 24 h wurden 3 ml des Extraktes auf dem Heizblock eingedampft und in 1 ml H₂O rückgelöst. Verschiedene Verdünnungen wurden im Hämolyse- und Ouabain-Test eingesetzt. Die hämolytische Aktivität wurde in Einheiten (Units) berechnet, wobei eine hämolytische Unit als die Probenmenge definiert ist, die nach einer 4-stündigen Inkubation 50% Hämolyse hervorruft.

Im Falle von *Neofibularia nolitangere* wurde zusätzlich der wässrige Extrakt auf hämolytische Aktivität untersucht, indem dieser durch Gefriertrocknung konzentriert und nach Resuspendierung in H₂O im Hämolysetest mit und ohne Ouabain auf Aktivität überprüft wurde.

3.2.5 Isolierung von Palytoxin aus Mikroorganismen

Sekundäre Metabolite werden von Mikroorganismen meist zu Beginn der stationären Phase produziert und dann in das umgebende Medium abgegeben (Brock, 2000). Um Palytoxin, ein Sekundärmetabolit, im Anschluss an die Produktion aus dem Kulturmedium isolieren zu können, wurden bekannte Eigenschaften des Moleküls genutzt:

1. Amphiphotere Eigenschaften von Palytoxin (Habermann, 1989) ermöglichen die Lösung des Toxins sowohl in Wasser als auch in organischen Lösungsmitteln, wie zum Beispiel in n-Butanol. Eine Überführung von Palytoxin aus dem wässrigen Kulturmedium in eine organische Phase ist mittels einer Butanolausschüttlung möglich, die zugleich störende Salze, Proteine und lipophobe Nebenprodukte ausschließt und durch Eindampfen eine Aufkonzentrierung von Palytoxin unkompliziert möglich macht.
2. Das Molekulargewicht von Palytoxin beträgt 2681 Dalton (Moore, 1985), somit ist es möglich, sowohl Gelfiltration als auch Dialyse zur Aufreinigung und Konzentrierung des Toxins anzuwenden

3.2.5.1 Butanolausschüttlung und Gelfiltration

400 ml-Bakterien-Kulturen wurden entsprechend Kapitel 3.2.1.2 angezogen und für 10 min bei 10.000 U/min zentrifugiert. Der sterilfiltrierte Überstand wurde auf Hämolyse und Hemmung derselben durch Ouabain getestet. Anschließend wurde der Überstand mit 120 ml Butanol versetzt und nach kräftigem Schütteln für 24 h bei RT stehengelassen. Darauf folgte 20-minütiges Rühren und anschließend eine Phasentrennung mit Hilfe eines Scheidetrichters. Die organische Phase wurde bei 60 Torr und 80 °C im Rotationsverdampfer eingeengt und daraufhin in 2 ml Millipore-H₂O aufgenommen, worauf sich ein Hämolyse- und Ouabain-Test anschloss. Die wässrige Phase wurde zunächst gefriergetrocknet und anschließend in 20 ml Millipore-H₂O rückgelöst, wovon 4 ml für die Gelfiltration eingesetzt wurden.

Hierzu wurde die Lösung auf eine mit 0,1 M Ammoniumacetatpuffer, pH 6,8 äquilibrierte Sephadex-G 50-Säule (82 x 1,5 cm) gegeben und mit dem gleichen Puffer eluiert. Mit Hilfe einer Durchlaufküvette wurde die Extinktion des Eluats bei 280 nm gemessen und durch einen Linearschreiber registriert. Das Eluat wurde in Reagenzgläsern mittels eines Fraktionssammlers aufgefangen. Die Durchflussgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die Fraktionen (5 ml) wurden jeweils direkt oder durch Gefriertrocknung konzentriert und mit dem Hämolysetest und dem Ouabain-Test auf ihren PTX-Gehalt untersucht.

Das Bakterienpellet wurde in 8 ml 0,9% NaCl-0,1 M Borat-Lösung resuspendiert und 10 min im Eisbad ultrabeschallt. Daraufhin wurden ein Hämolyse- und ein Ouabain-Test durchgeführt. Der Rest wurde lyophilisiert, anschließend in 10 ml Butanol aufgenommen und über Nacht bei 120 U/min geschüttelt. Die Probe wurde 10 min bei 4000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und eingedampft. Der Rückstand wurde in 1 ml Millipore-H₂O aufgenommen und ebenfalls mittels des Hämolysetests und des Ouabain-Tests auf PTX-Gehalt überprüft.

Für die Positivkontrolle wurden 400 ml ZoBell-Medium mit einem Aliquot eines alkoholischen Extraktes aus *P. caribaeorum* versetzt. Als Negativkontrolle diente 400 ml ZoBell-Medium.

3.2.5.2 Dialyse

Eine 400 ml–Bakterien-Kultur wurde entsprechend Kapitel 3.2.1.2. angezogen und anschließend lyophilisiert. Es folgte eine Resuspension der Trockenmasse in 40 ml Millipore-H₂O und eine 10-minütige Behandlung im Ultraschallbad, um die Zellen aufzuschließen. Die Dialyse wurde nach den Angaben des Herstellers in einem 15 cm langen Dialyseschlauch (Spectra/Por® 6 Molecularporous Regenerated Cellulose Dialysis Membrane) mit einer Ausschlussgröße von 2 kDa (MWCO 2000) durchgeführt. Als Dialysepuffer wurde Millipore-H₂O verwendet, welches pro Dialyse 3 x nach 24 h Inkubation bei 4 °C gewechselt wurde. Die Lagerung des Dialysats erfolgte bis zur Weiterbehandlung in einem 50 ml Reaktionsgefäß bei –80 °C.

3.2.6 16S rDNA Sequenzierung

Um die Bakterienisolate phylogenetisch charakterisieren zu können, wurde eine 16S rDNA-Sequenzierung mit anschließender Computeranalyse mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) und ARB (von lateinisch "arbor" = Baum) durchgeführt. Das Gen der 16S rRNA eignet sich für phylogenetische Einordnungen besonders gut, da es in der Evolution hochkonserviert ist, in allen prokaryotischen Organismengruppen vorkommt und bereits eine große Sequenzdatenbank existiert, die über das Internet abgerufen werden kann.

3.2.6.1 Extraktion chromosomaler DNA

(Grimberg et al., 1989)

2 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden 4 min bei 8000 U/min zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml TNE-Puffer gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 4 min bei 8000 U/min, wonach der Überstand verworfen und das Pellet in 270 µl TNEX-Puffer resuspendiert wurde. Nach Zugabe von 15 µl 1%iger-Lysozym-Lösung lysierten die Zellen während einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C. Zum Abbau von Proteinen wurden 30 µl 2%ige Proteinase K-Lösung zugesetzt und für ca. 2 h bei 65 °C inkubiert. Zu der nun klaren Lösung wurden 15 µl 5 M-NaCl-Lösung zugegeben und die DNA mit 500 µl eiskaltem EtOH durch vorsichtiges Invertieren ausgefällt. Anschließend wurde die DNA für 10 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert und mit 70%igem EtOH gewaschen. Nachdem die DNA vollständig getrocknet war, wurde sie in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert. Die erfolgreiche Extraktion der hochmolekularen genomischen DNA wurde mittels Gelelektrophorese in einem 0,8%igen Agarose-Gel überprüft.

3.2.6.2 Amplifizierung der 16S rDNA mittels Polymerasekettenreaktion

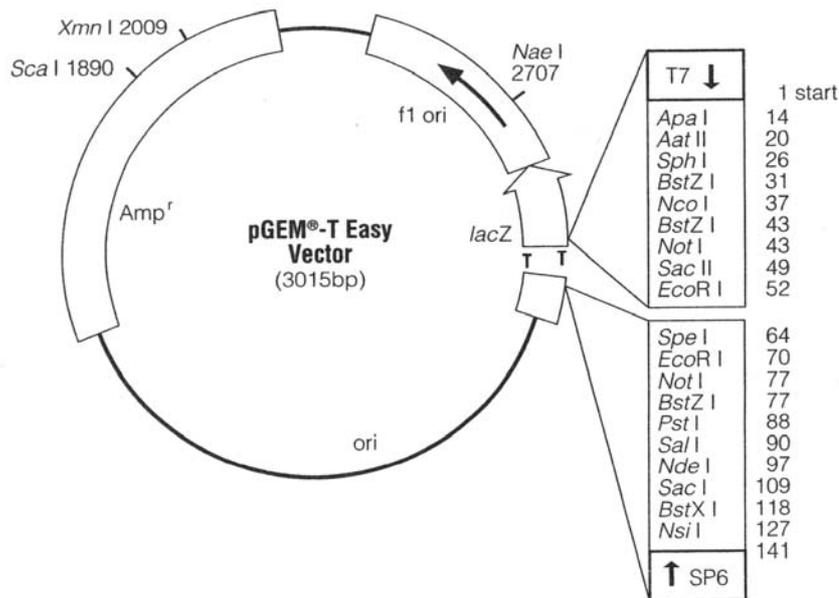
Die 16S rDNA wurde aus chromosomaler DNA mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung der allgemeinen eubakteriellen Primer 27f und 1385r amplifiziert. Pro Ansatz wurden 45,5 μ l 1 \times PCR-Puffer mit 1 μ l dNTPs (\hat{a} 10 mM), 1 μ l Primer 27f (100 pmol/ μ l), 1 μ l Primer 1385r (100 pmol/ μ l) und 1 μ l DNA (10 – 100 μ g/ μ l) auf Eis vermischt und im letzten Schritt 0,5 μ l *Taq*-Polymerase zugegeben. Danach erfolgte die PCR im Thermocycler unter folgenden Bedingungen: Eine 2-minütige Denaturierungsphase bei 95 °C, dann 35 Zyklen mit je 1 min Denaturierung bei 95 °C, 1 min Annealing der Primer bei 56 °C und 1,5 min Elongation bei 72 °C. Die Reaktion wurde durch einen 10-minütigen Extensionsschritt bei 72 °C abgeschlossen. Die PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt mittels des QIAquick PCR Purification Kits 250 gemäß den Anweisungen des Herstellers (Qiagen) gereinigt und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C aufbewahrt.

3.2.6.3 Herstellung kompetenter Zellen

50 ml LB-Medium wurden mit 250 μ l einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* DH5 α angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 10 min bei 5.000 U/min bei 4 °C. Das Pellet wurde nun sukzessiv mit 50 ml, 10 ml und 5 ml kalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in einem Gemisch von 1,5 ml 0,1 M CaCl₂-Lösung und 0,6 ml Glycerol resuspendiert und in Aliquots von jeweils 100 μ l bei -80 °C gelagert.

3.2.6.4 Klonierung von PCR-Produkten

Um einen DNA-Abschnitt zu vervielfältigen, kann er in einen Vektor ligiert werden, der anschließend in *E.coli*-Zellen transformiert wird. Der Vektor zeichnet sich durch den selektierbaren Marker (Ampicillin-Resistenz), einen starken Replikationsursprung (ori) und eine *multiple-cloning-site* aus, in die der entsprechende DNA-Abschnitt ligiert wird. Anschließend müssen die transformierten Zellen selektioniert werden.



pGEM[®]-T Easy Vector circle map and sequence reference points.

pGEM[®]-T Easy Vector Sequence reference points:

T7 RNA Polymerase transcription initiation site	1
SP6 RNA Polymerase transcription initiation site	141
T7 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	2999-3
SP6 RNA Polymerase promoter (-17 to +3)	139-158
multiple cloning region	10-128
<i>lacZ</i> start codon	180
<i>lac</i> operon sequences	2836-2996, 166-395
<i>lac</i> operator	200-216
β -lactamase coding region	1337-2197
phage f1 region	2380-2835
binding site of pUC/M13 Forward Sequencing Primer	2956-2972
binding site of pUC/M13 Reverse Sequencing Primer	176-192

Abb. 6 Schematische Darstellung des *pGEM-T Easy Vektor*.

Zur Klonierung wurde das PCR-Produkt gemäß den Angaben des Herstellers in den *pGEM-T Easy Vector* ligiert. Das Ligationsergebnis wurde sodann in kompetente *E. coli* DH5 α transformiert. Zu 100 μ l kompetenter Zellen wurde der gesamte Ligationansatz (11 μ l) gegeben und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 90 sec bei 42 $^{\circ}$ C durchgeführt, danach die Zellen für 5 min auf Eis inkubiert, bevor sie

nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 2 h bei 37 °C geschüttelt wurden. 150 µl der Zellsuspension wurden auf LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar ausplattiert und die restlichen Zellen für 5 min bei 6.000 U/min abzentrifugiert, welche in 100 µl LB-Medium resuspendiert und ebenfalls auf LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar ausplattiert wurden. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden mit sterilen Holzstäbchen weiße Klone gepickt, sie enthalten im Gegensatz zu den blauen Kolonien ein Insert, auf LB/Amp/IPTG/X-Gal-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Sind diese nach dem erneuten Ausstreichen immer noch weiß, wurden mit ihnen 3 ml LB/Amp-Medium inokuliert und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Aus diesen Zellen konnte mittels einer Plasmid-Minipräparation die Plasmid-DNA isoliert werden.

3.2.6.5 Plasmid-Minipräparation

2 ml einer Über-Nacht-Kultur transformierter *E. coli* DH5α wurden 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und das Pellet in 150 µl Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl Puffer P2 wurde die Probe zunächst 5 min bei RT, anschließend nach Zugabe von 150 µl Puffer P3 5 min im Eisbad inkubiert. Die Lösung wurde 10 min bei 13.000 U/min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Der Überstand wurde nochmals 5 min bei 13.000 U/min zentrifugiert und abgenommen. Durch Zugabe von 350 µl Isopropanol und vorsichtiges Invertieren wurde die Plasmid-DNA ausgefällt und 15 min bei 13.000 U/min abzentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem EtOH gewaschen, getrocknet und in 50 µl sterilem H₂O aufgenommen. Die Überprüfung, ob das gewünschte 16S rDNA-Amplifikat (ca. 1,4 kb) in den Vektor inseriert ist, fand mittels eines Restriktionsverdaus mit *Eco* RI statt. Hierzu wurden 5 µl der Plasmid-DNA mit 2 µl 10× Puffer H, 1 µl *Eco* RI (20 U/µl) und 14 µl sterilem H₂O vermischt, 2 h bei 37 °C inkubiert und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Nur diejenigen Plasmide wurden für weitere Versuche herangezogen, die ein ca. 1,4 kb großes Insert enthielten. Mitunter wurden statt einer einzelnen Bande bei 1,4 kb zwei nahe beieinander liegende Banden bei ca. 700 bp beobachtet; in diesen Fällen enthielt das Insert etwa in der Mitte noch eine weitere *Eco* RI-Schnittstelle. Die Plasmid-DNA wurde für weitere Versuche bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.6.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung eines 0,8%igen bzw. 1%igen Agarose-Gels wurden 0,8 g bzw. 1,0 g Agarose in 100 ml 1×TAE-Puffer suspendiert und bis zur Bildung einer klaren Lösung in der Mikrowelle erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 60 °C wurde das Gel blasenfrei in einen mittleren Gelschlitten mit Kamm ausgegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es in eine mit 1×TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt und der Kamm vorsichtig entfernt. 4 µl DNA-Probe wurden mit 8 µl H₂O und 3 µl Stopp-Puffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenreferenz dienten 15 µl eines 1 kb-Markers. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für ca. 2 h. Das Gel wurde dann 15 min im EtBr-Färbebad entwickelt und am Geldokumentationsgerät mit Hilfe der Software *Multi-Analyst* ausgewertet.

3.2.6.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der 16S rDNA wurde mit Hilfe des SequiTherm EXCEL II DNA Sequencing Kits-LC nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) durchgeführt. Hierzu wurden zu 500 ng gereinigten PCR-Produkts oder Plasmids, 2 µl des IR-markierten Primers und 1 µl Sequenzierungs-Polymerase zugegeben und mit Sequenzierungs-Puffer auf 17 µl aufgefüllt. Jeweils 4 µl dieses Gemisches wurden auf vier Reaktionsgefäße mit 2 µl des jeweiligen Didesoxynukleotids aufgeteilt und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR waren wie folgt: Denaturierung für 5 min bei 95 °C, gefolgt von 30 Zyklen mit je 30 sec, Denaturierung bei 95 °C, 15 sec Annealing bei 52 °C, Elongation 1 min bei 70 °C. Abgeschlossen wurde die Reaktion durch einen 10-minütigen Extensionsschritt bei 70 °C. Nach Zugabe von 3 µl Sequenzierungs-Stopp-Puffer wurden die Proben am Sequenzierer nach Angaben des Herstellers über ein Polyacrylamid-Gel aufgetrennt, die einzelnen ddNTP-spezifischen Fragmente fluorometrisch detektiert und mittels des Computerprogramms *BaseImagIR* die Nukleotidsequenz ermittelt.

3.2.6.8 Phylogenetische Einordnung mittels BLAST und ARB

Die durch die Sequenzierung erhaltenen *forward*- und *reverse*-Sequenzen wurden mit Hilfe der Software Autoassembler 2.1 von ABI Prism zusammengefügt. Zur systematischen Einordnung der untersuchten Bakterien wurden die ermittelten Sequenzen über das *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) der Online-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) mit 16S rDNA-Sequenzen bekannter Mikroorganismen verglichen. Für eine genaue phylogenetische Einordnung wurden die Sequenzen durch eine *maximum likelihood*-Analyse mit Hilfe des Softwarepaketes ARB (von lateinisch "arbor" = Baum) der Technischen Universität München (URL <http://www.arb-home.de>) in Stammbäume eingerechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der isolierten Mikroorganismen

4.1.1 Morphologie

Die Bakterien wurden auf ZoBell-Agar vereinzelt und nach Farbe, Transparenz, Oberflächenbeschaffenheit und Kolonieforn beurteilt. Bakterien mit übereinstimmenden Merkmalen wurden einem gemeinsamen Phänotyp zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Tab. 6 Einteilung der Isolate in Morphotypen.

Die Bakterienstämme wurden aus *Neofibularia nolitangere* (N), *Palythoa caribaeorum* (P) und *Zoanthus pulchellus* (Z) isoliert. Zutreffende Merkmale sind mit einem X gekennzeichnet, + steht für durchsichtig, +/- für halbdurchsichtig und – für undurchsichtig.

Isolat	Farbe		Transparenz	Oberfläche		Rand		Kolonie schwärmend	Phänotyp
	weiß	gelblich		rau	glatt	rund	unregelmäßig		
N3	X		-	X			X	-	I
Z16	X		-	X			X	-	
N4	X		+		X	X		-	II
N5	X		+		X	X		-	
Z1	X		+		X	X		-	
P11	X		+		X	X		-	
P5	X		+/-		X	X		-	III
P31	X		+/-		X	X		-	
Z4	X		+/-		X	X		-	
N6	X		+/-		X	X		-	
P8	X		+/-		X	X		-	
N8	X		+/-		X	X		-	
P4	X		+/-		X	X		-	
P7	X		+/-		X		X	+	IV
Z10	X		+/-		X		X	+	
Z34A	X		+/-		X		X	+	
Z18	X		+		X		X	+	V
P1		X	+/-		X	X		-	VI
Z34C		X	+/-		X	X		-	
Z17		X	-		X	X		-	VII

Diese makroskopische Analyse lässt eine Einteilung der Stämme in 7 unterschiedliche Phänotypen zu, die sich in Bezug auf die individuelle Kombination oben genannter Kriterien unterscheiden und dadurch sinnvoll einordnen lassen.

4.1.2 Hämolyseaktivität

4.1.2.1 allgemeiner Hämolysetyp

Die Bakterien wurden auf LB-Blutagar ausgestrichen und der Lysehof nach Farbe und Ausprägung beurteilt. Bakterien mit übereinstimmenden Merkmalen wurden einem gemeinsamen Hämolysetyp zugeordnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

Tab. 7 Einteilung der Isolate in Hämolysetypen

Die Bakterien wurden auf LB-Blutplatten ausgestrichen und bei 25 °C über 10 Tage inkubiert. Täglich wurden Ausprägung und Farbe des Lysehofes dokumentiert. **klar**: der Lysehof verfärbte sich während der 10 Tage nicht; **grün**: der Lysehof verfärbte sich im Laufe der Inkubation grünlich; -: Lyse war kaum detektierbar; +: schwache Lyse; ++: starke Lyse

Isolat	Lysehof	Intensität	Hämolysetyp
N6	klar	-	I
N8	klar	+	
P4	klar	+	
P8	klar	+	
P31	klar	+	
Z4	klar	+	
Z10	klar	+	
Z17	klar	+	
N3	klar	++	
P5	klar	++	
Z16	klar	++	
Z34A	klar	++	
Z18	grün	+	II
N4	grün	++	
N5	grün	++	
P1	grün	++	
P7	grün	++	
P11	grün	++	
Z1	grün	++	
Z34C	grün	++	

Der allgemeine Hämolysevergleich führt zu einer Einteilung der Isolate in zwei unterschiedliche Hämolysetypen. 12 Isolate ordneten sich dem Typ I zu, welcher sich durch einen klaren Lysehof auszeichnete. Die verbleibenden 8 Isolate zeigten mit der Zeit eine Grünfärbung des Lysehofes und wurden somit dem Typ II zugeordnet.

4.1.2.2 Human- versus Schaf- Erythrozyten

Hämolsine zeigen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Aktivität gegenüber Erythrozyten verschiedener Spezies. Das Lyseverhalten der einzelnen Isolate wurde gegen Schaf- und Human-Erythrozyten untersucht.

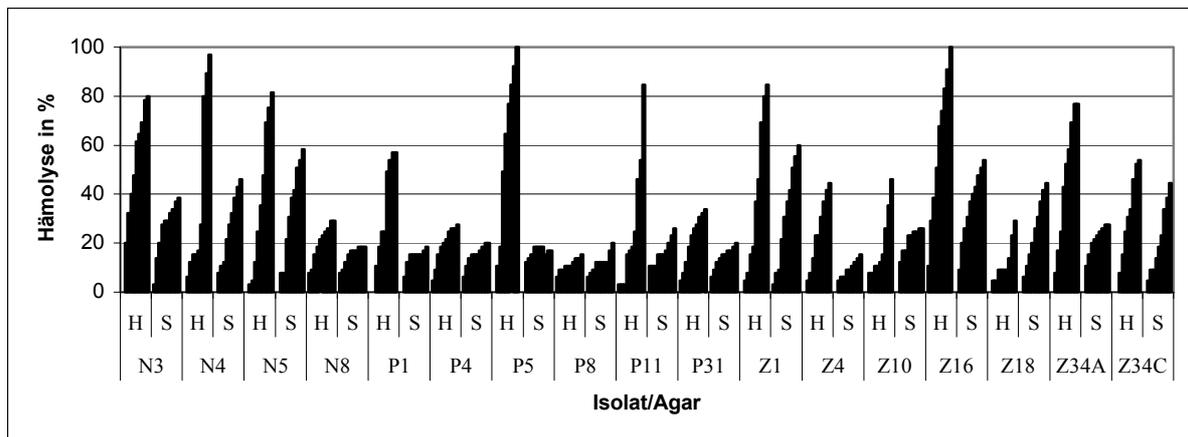


Abb. 7 Vergleich der Hämolyse-Aktivität der Isolate auf humanem LB-Blutagar (H) und Schaf-Blutagar der Firma Oxoid (S)

Bakterien wurden auf dem entsprechenden Blutagar ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivitäten bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 10 Tagen.

Humane Erythrozyten zeigen sich gegenüber den Hämolsinen der Isolate N3, N4, N5, P1, P5, P11, P31, Z1, Z4, Z10, Z16 und Z34A sensitiver als Schaf-Erythrozyten. Kein signifikanter Unterschied ist bei N8, P4, P8 und Z34C zu beobachten. Nur Z18 zeigt auf Schaf-Erythrozyten eine stärkere Wirkung als auf humane Erythrozyten. Von N6, P7 und Z17 konnten keine Daten erhoben werden, da diese auf den gewählten Blutagar kein deutliches Wachstum innerhalb der Beobachtungsfrist zeigten.

4.1.2.3 Enzymatische Hydrolyse

Die hämolytische Aktivität kann sowohl von Proteinen, als auch von Sekundärmetaboliten hervorgerufen werden. Um diese beiden Gruppen unterscheiden zu können, wurden die Kulturen der Isolate mit Proteinase K versetzt und die Veränderung der hämolytischen Aktivität überprüft.

Die Isolate wurden für 1, 2 und 4 Tage in kleinen Kulturvolumina (3 ml ZoBell-Medium) bei 25 °C herangezogen. Die Kulturen wurden anschließend mit Proteinase K versetzt und sowohl vorher als auch nachher auf Hämolyseaktivität überprüft. Die Ergebnisse für die einzelnen Messzeitpunkte sind in den folgenden Abbildungen dargestellt.

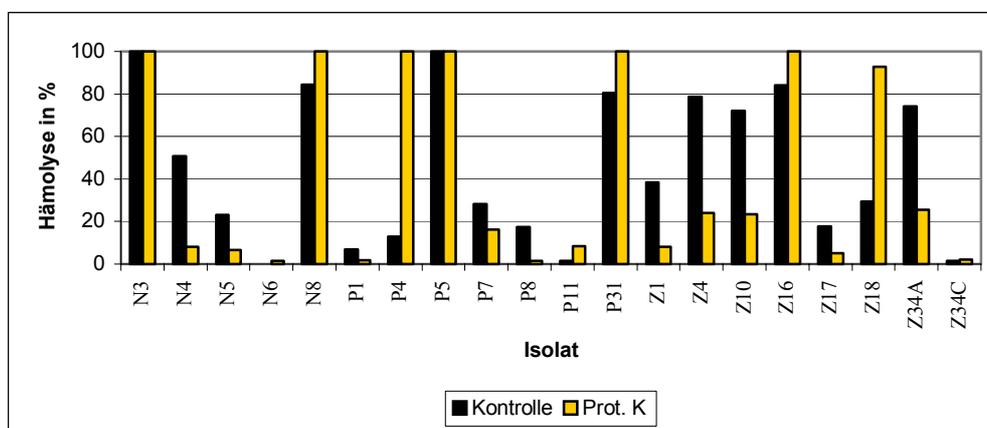


Abb. 8 Hämolytische Aktivität der Kulturen nach einem Tag Wachstum.

Die einzelnen Isolate wurden in 3 ml-Kulturen angezogen. Nach einem Tag wurde ein Aliquot vor (**Kontrolle**) bzw. nach einer Proteinase K-Behandlung (**Prot. K**) im Hämolysetest untersucht.

Schon die Kontrollansätze der Isolate zeigten deutlich unterschiedliche Aktivitäten, die von ausgeprägt (N3, N8, P5 P31, und Z16) bis zu kaum detektierbar (N6, P11 und Z34C) reichten. 50% der Isolate zeigten eine deutliche Abnahme ihrer Hämolyseaktivität nach Proteinase K-Verdauung, während bei N3 und P5 unverändert eine starke Hämolyseaktivität zu beobachten war. Hingegen zeigten die Isolate N8, P31, Z16 und Z18 nach der enzymatischen Digestion eine deutliche Aktivitätszunahme. Weder vor noch nach der Proteinase K-Behandlung waren bei N6, P1, P11, Z17 und Z34C Hämolyse-Aktivitäten nachweisbar.

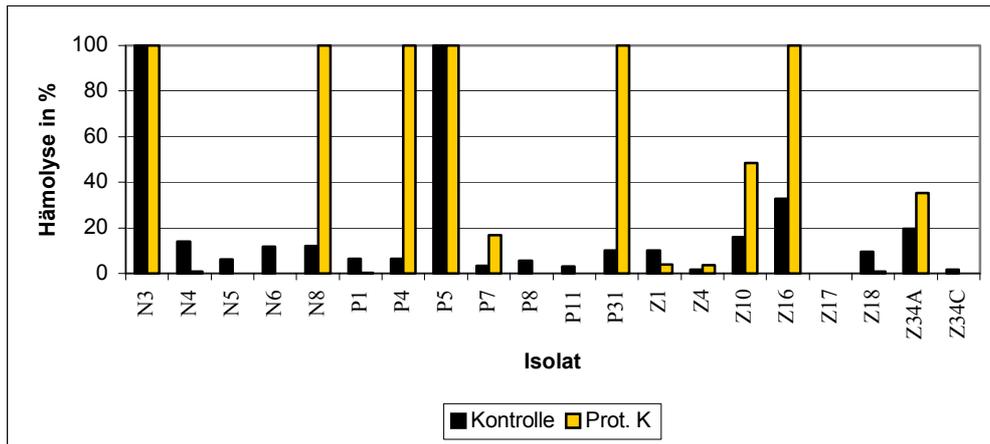


Abb. 9 Hämolytische Aktivität der Kulturen nach 2 Tagen Wachstum.

Die einzelnen Isolate wurden in 3 ml-Kulturen angezogen. Nach 2 Tagen wurde ein Aliquot vor (**Kontrolle**) bzw. nach einer Proteinase K-Behandlung (**Prot. K**) im Hämolysetest untersucht.

Im Vergleich zu Abbildung 8 zeigt Abbildung 9, dass nach einem 24 h längeren Wachstum die hämolytische Aktivität der Kontrollansätze generell geringer ist. Ausnahme bilden die Kulturen N3 und P5, die bereits nach einem Tag Wachstum eine Totalhämolyse bewirkten. Auffallend ist, dass sich bei den Isolaten N8, P4, P31, Z10 und Z16 nach der Proteinase K- Behandlung die hämolytische Aktivität stark erhöhte.

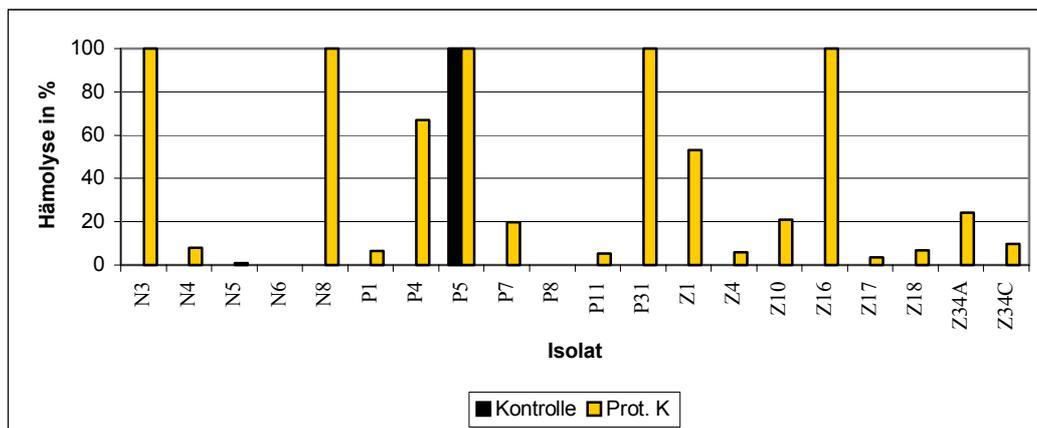


Abb. 10 Hämolytische Aktivität der Kulturen nach 4 Tagen Wachstum.

Die einzelnen Isolate wurden in 3 ml-Kulturen angezogen. Nach 4 Tagen wurde ein Aliquot vor (**Kontrolle**) bzw. nach einer Proteinase K-Behandlung (**Prot. K**) im Hämolysetest untersucht.

Nach 4 Inkubationstagen der Bakterienkulturen zeigte ausschließlich P5 hämolytische Aktivität, und diese unverändert stark, was bei keinem anderen Isolat zu beobachten war. Erst die Proteinase K-Behandlung setzte bei den Isolaten N3, N8, P4, P31, Z16

und Z1 eine deutliche Hämolyseaktivität frei. Retrospektiv zeichnete sich das gleiche Hämolysemuster bereits bei den Untersuchungen nach einem bzw. zwei Inkubationstagen ab. Bei Isolat Z1 war ein beträchtliches hämolytisches Potential erst nach verlängerter Inkubation von 4 Tagen zu beobachten.

4.1.2.4 Thermostabilität

Biologisch aktive Moleküle zeichnen sich durch eine spezifische räumliche Struktur aus, die für ihre Wirkung essentiell ist. Durch Hitzeeinwirkung kann eine thermische Denaturierung erfolgen, was Rückschlüsse auf die Stabilität des biologisch aktiven Moleküls erlaubt. Die Bakterienkulturen (3 ml, ZoBell) wurden hierzu einem Hitzeschock von 10 min bei 99 °C ausgesetzt und anschließend auf Hämolyseaktivität überprüft.

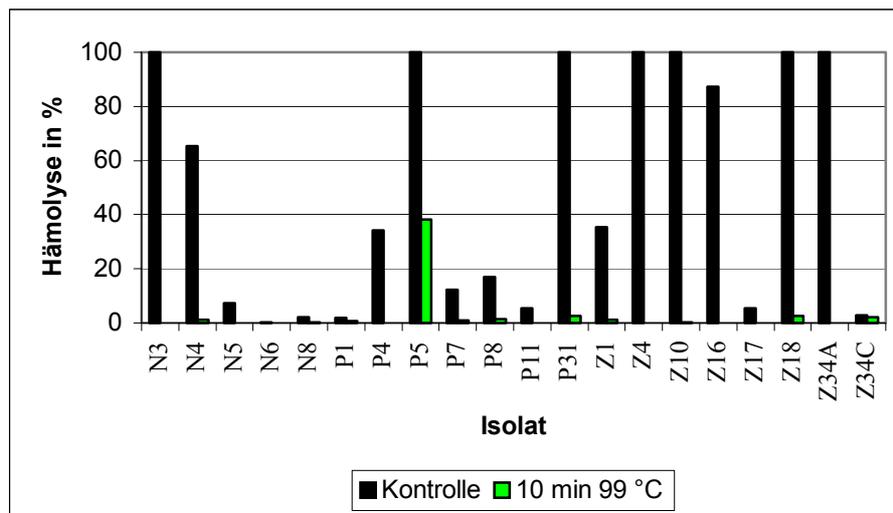


Abb. 11 Hämolytische Aktivität von Bakterienkulturen vor (**Kontrolle**) bzw. nach Erhitzung (**10 min 99 °C**).

Bakterienkulturen mit starker hämolytischer Wirkung wurden vor bzw. nach 10-minütiger Erhitzung auf 99 °C im Hämolysetest analysiert.

Generell zeigten die Kulturen nach der thermischen Einwirkung keine hämolytische Aktivität mehr. Nur das Isolat P5 wies eine ca. 40%ige hämolytische Restaktivität auf.

4.2 Nachweis von Palytoxin

4.2.1 Palytoxingehalt der Invertebraten

Palytoxin, erstmals isoliert aus der Krustenanemone *Palythoa* (Moore & Scheuer, 1971), konnte mehrfach auch in anderen Riffbewohnern, wie z.B. Schwämmen (Porifera) und Würmern (Polychaeten), Krebsen (Crustaceen) und diversen Fischen nachgewiesen werden (Gleibs & Mebs, 1999). Zur Quantifizierung des Palytoxin-Gehaltes der Tiere wurden Proben von *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* aus der Karibik auf Ouabain-hemmbarer Hämolyseaktivität untersucht.

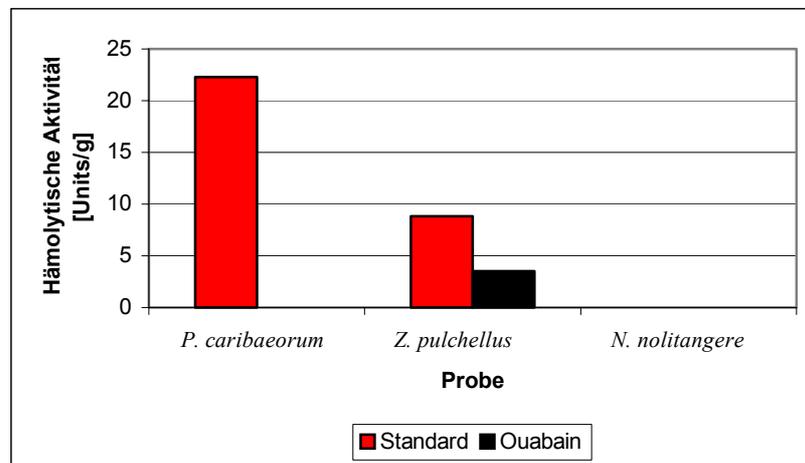


Abb. 12 PTX-Gehalt von *Zoanthus pulchellus*, *Palythoa caribaeorum* und *Neofibularia nolitangere*.

Proben der drei Arten wurden methanolisch extrahiert. Nach Abdampfen des Methanols wurde mit dem Rückstand ein Hämolysetest im Reagenzglas ohne (**Standard**) und in Gegenwart von Ouabain (**Ouabain**) durchgeführt. Hämolytische Aktivitäten sind in Units/g Nassgewicht dargestellt.

Die Analyse zeigt, dass die hämolytische Aktivität von *Palythoa caribaeorum* vollständig, die von *Zoanthus pulchellus* nur zu 2/3 durch Ouabain gehemmt werden kann. Der Schwamm *Neofibularia nolitangere* hingegen zeigt im Methanolextrakt keine hämolytische Aktivität, obwohl wässrige Extrakte eine geringe, Ouabain-hemmbarer Hämolyseaktivität aufwiesen (nicht dargestellt).

4.2.2 Palytoxingehalt der Mikroorganismen

Da die angeführten Riffbewohner von Mikroorganismen besiedelt werden, die möglicherweise Palytoxin synthetisieren, wurden hämolytisch aktive Bakterienisolate kultiviert und näher charakterisiert. Eine Zentrifugation trennte die zur stationären Phase gewachsenen Kulturen in Überstand und Pellet, so konnten sezernierte von endogenen Hämolysinen getrennt in ihrer Aktivität und Hemmbarkeit durch Ouabain untersucht werden. Es folgten verschiedene PTX-Isolierungs- und –Anreicherungsverfahren mit darauffolgenden Hämolyse- und Ouabain-Tests, was Aufschluss über eine vorhandene PTX-Aktivität geben sollte. Abbildung 13 veranschaulicht die zeitliche und methodische Vorgehensweise und verweist auf die dazugehörige Ergebnis-Darstellung der durchgeführten Hämolyse- und Ouabain-Tests der einzelnen Bakterien-Isolate.

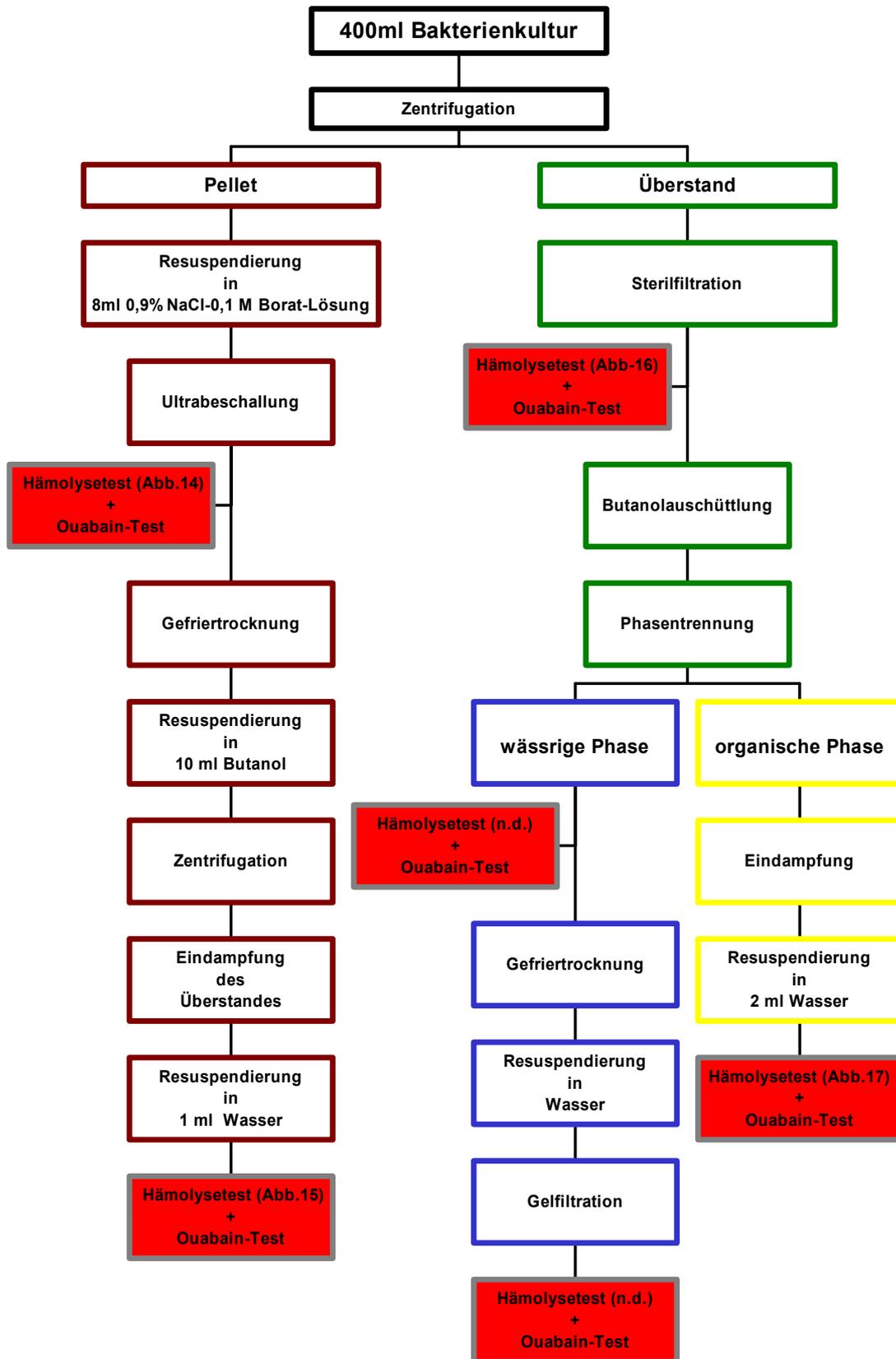


Abb. 13 Übersichtsschema zur PTX-Isolierung aus komplexen Nährmedien und durchgeführten Hämolyse- und Ouabain-Tests, deren Ergebnisse in den folgenden Seiten dargestellt sind.

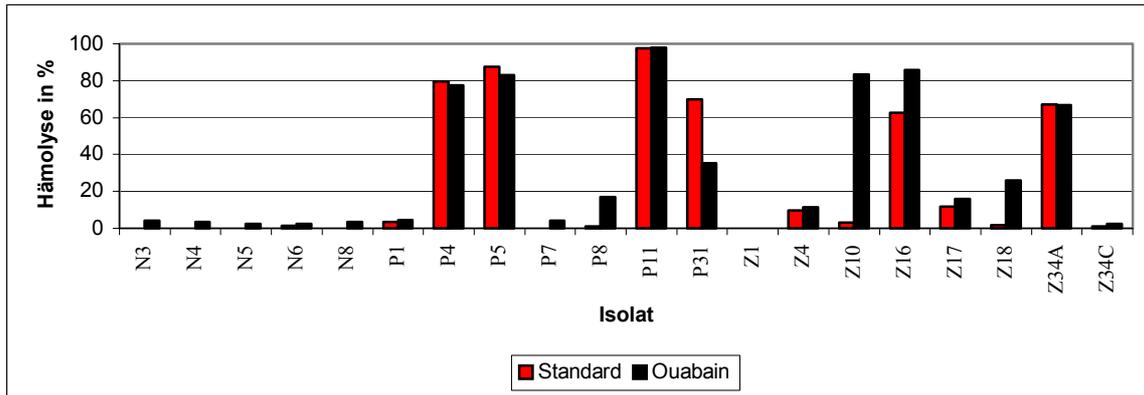


Abb. 14 Hämolytische Aktivität der wässrigen Bakterien-Pellets.

Bakterien wurden aus *Neofibularia nolitangere* (N), *Palythoa caribaeorum* (P) und *Zoanthus pulchellus* (Z) isoliert, in 400 ml ZoBell bis zum Erreichen der stationären Phase kultiviert und über Zentrifugation konzentriert. Nach einer Ultraschall-vermittelten-Bakteriolyse wurden je 20 µl der Lysate auf ihre Hämolyseaktivität ohne (**Standard**) oder mit Ouabain (**Ouabain**) untersucht.

Die Analyse zeigt, dass nicht alle untersuchten Isolate messbare hämolytische Aktivität aufweisen. Bakterien, isoliert aus *Neofibularia nolitangere* zeigten keine hämolytische Aktivität, während die hämolytische Aktivität der Isolate aus *Palythoa caribaeorum* und *Zoanthus pulchellus* nicht durch Ouabain hemmbar waren.

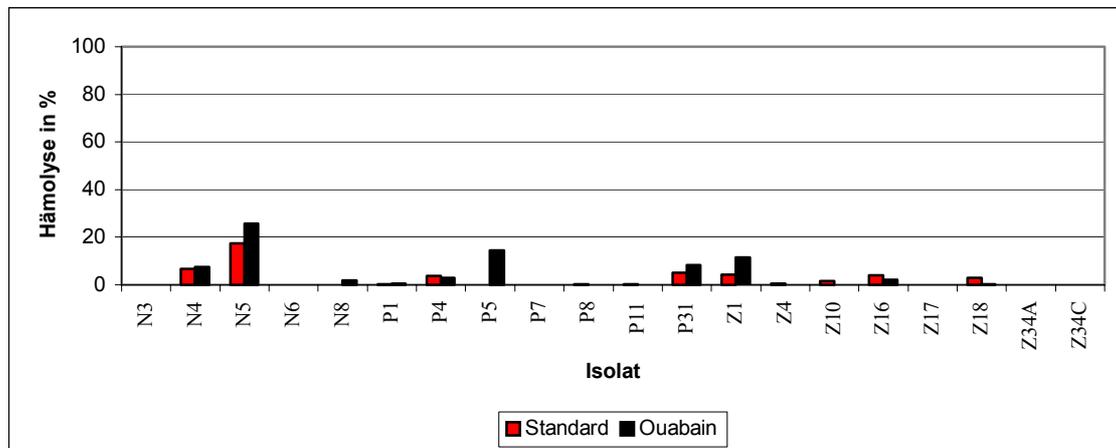


Abb. 15 Hämolytische Aktivität der Butanol-Extrakte der Bakterien-Pellets.

Die Isolate wurden bis zur stationären Phase in 400 ml ZoBell-Medium über 4 Tage herangezogen, pelletiert und durch Sonifikation aufgeschlossen. Das Lysat wurde lyophilisiert, in Butanol aufgenommen, der Überstand eingedampft und in 1 ml H₂O rückgelöst, wovon 20 µl für die Hämolyseaktivitätsbestimmung ohne (**Standard**) und mit Ouabain (**Ouabain**) eingesetzt wurden.

In den Butanolextrakten konnte keine Hämolyseaktivität mehr nachgewiesen werden. Einzige Ausnahme stellte das Isolat N5 mit einer aber eher geringfügigen Hämolyseaktivität dar, die sich zudem nicht durch Ouabain hemmen ließ.

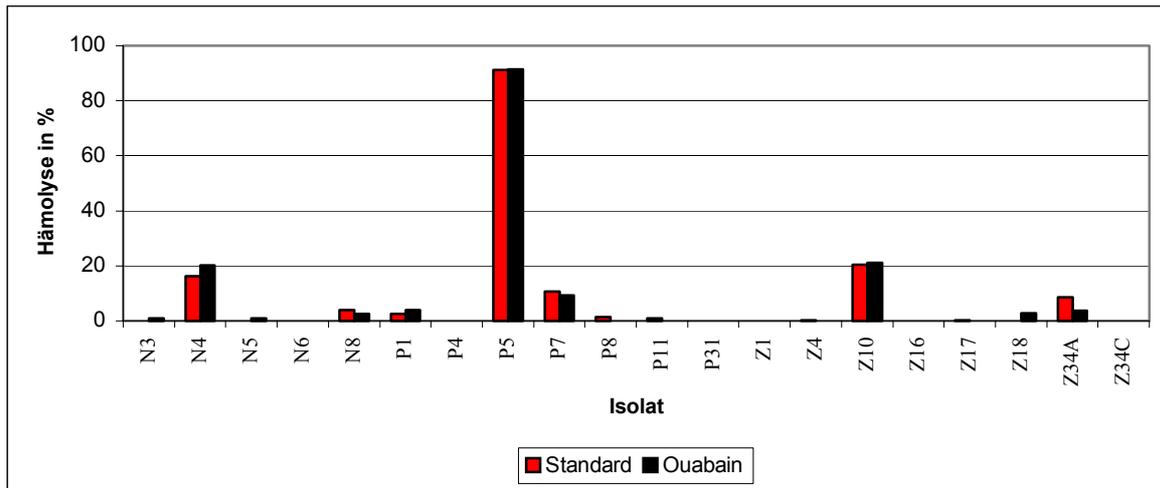


Abb. 16 Hämolytische Aktivität der wässrigen Bakterien-Überstände.

400 ml-Bakterien-Kulturen in ZoBell wurden über 4 Tage in die stationäre Phase herangezogen, zentrifugiert und sterilfiltriert. 50 µl des Überstandes wurde auf Hämolyseaktivität ohne (**Standard**) und mit Ouabain (**Ouabain**) getestet.

In den Bakterienüberständen ließ sich mit einer Ausnahme (P5), nur geringfügige (N4 und Z10) oder keine deutlich meßbare hämolytische Aktivität feststellen. Eine Ouabain-Hemmmbarkeit zeigte sich jedoch in keinem Fall.

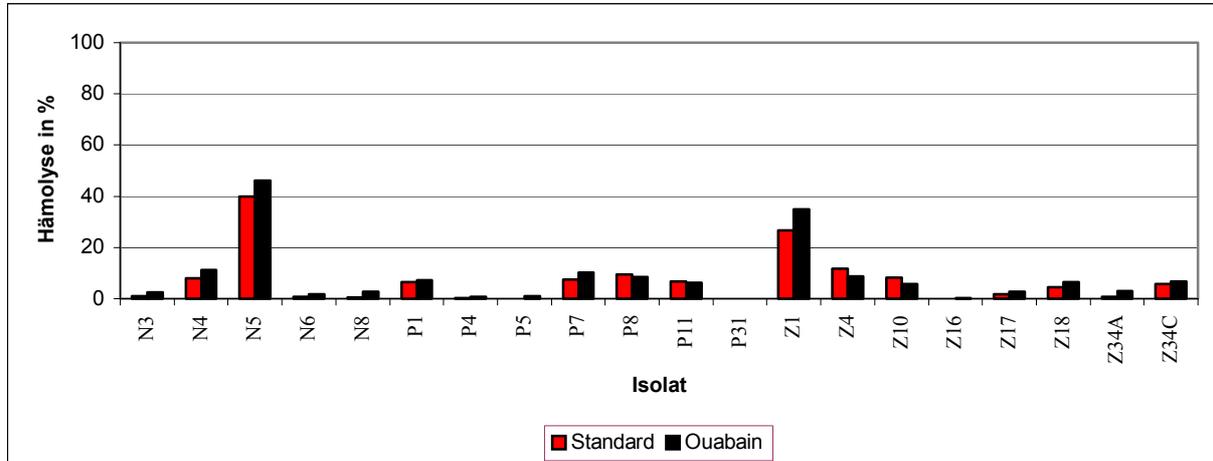


Abb. 17 Hämolytische Aktivität der Butanol-Extrakte der Bakterien-Überstände.

Die 4 Tage in 400 ml ZoBell-Medium herangewachsenen Bakterien-Kulturen wurden sterilfiltriert und mit Butanol ausgeschüttelt. Die organische Phase wurde eingedampft, in 2 ml H₂O resuspendiert und davon 50 µl anschließend auf hämolytische Aktivität ohne (**Standard**) und mit Ouabain (**Ouabain**) getestet.

Nach Butanol-Extraktion war die Hämolyseaktivität von P5, N4 und Z10 kaum mehr messbar, hingegen konnte eine leichte Anreicherung bei N5 und Z1 beobachtet werden. Ouabain-Hemmmbarkeit war auch in diesem Versuchsansatz nicht feststellbar.

4.3 Direkt-PTX-Assay für Mikroorganismen

4.3.1 Entwicklung

Um in Zukunft Palytoxin-produzierende Bakterien unkompliziert identifizieren zu können und darüber hinaus

1. die Korrelation von Wachstumsbedingungen und zeitgleicher PTX-Produktion beobachten zu können,
2. unabhängig von technischen Geräten zu sein und somit
3. schon während einer Expedition, auch unter einfachen Bedingungen, ein Vorab-Screen durchführen zu können,

sollte ein PTX-Assay auf Agar entwickelt werden. Dazu wurde zunächst LB-Blutagar mit und ohne Ouabain hergestellt und der Hämolyseverlauf der Isolate auf beiden Agarplatten vergleichend beobachtet.

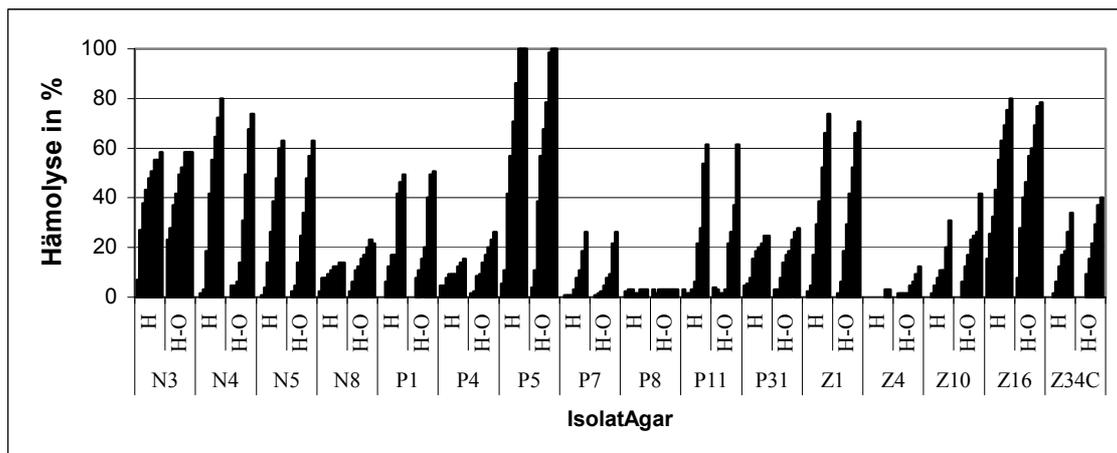


Abb. 18 Hämolyseverlauf über 9 Tage der einzelnen Isolate auf LB-Blutagar ohne (H) und mit Ouabain (H-O).

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytischen Aktivitäten bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 9 Tagen.

Jedes Bakterien-Isolat zeigt ein spezifisches, zeitabhängiges Hämolysemuster welches jedoch nicht durch die Anwesenheit von Ouabain im Medium beeinflusst wurde. Die Isolate N6, Z17, Z18 und Z34A sind während des Beobachtungszeitraums nicht auf dem Nährmedium gewachsen.

Als Positivkontrolle wurde auf LB-Blutagar mit und ohne Ouabain verschiedene Verdünnungen von PTX gegeben und über Nacht inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 19 und 20 dargestellt.

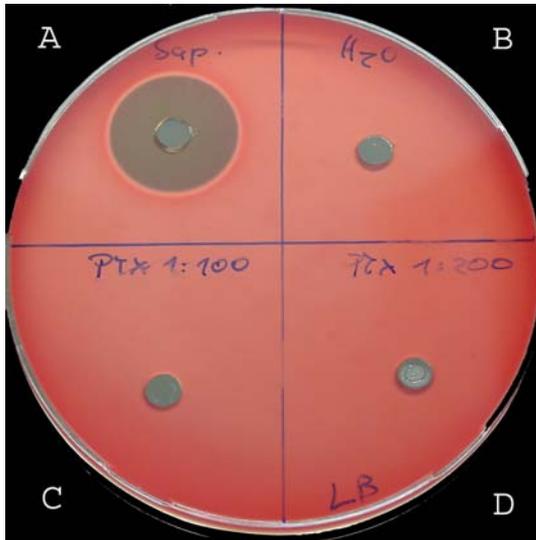


Abb. 19 PTX-Hämolysetest auf LB-Blutagar.

In LB-Blutagar wurden 6 mm-Löcher gestanzt, anschließend 20 µl **A**: Saponin; **B**: H₂O; **C**: PTX, 1:100-Verdünnung; **D**: PTX 1:200-Verdünnung aufgetragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

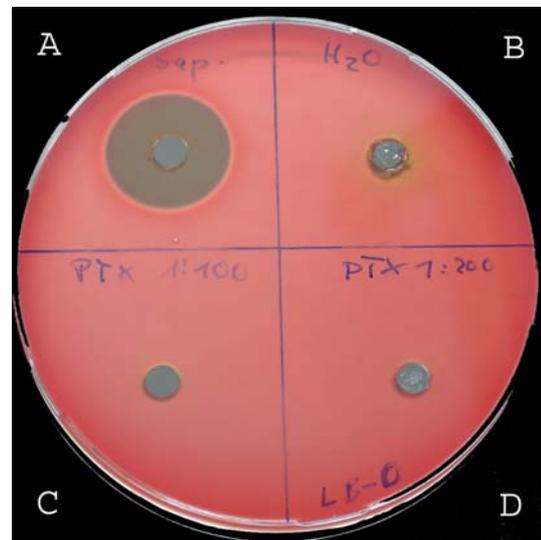


Abb. 20 PTX-Ouabain-Test auf LB-Blutagar.

In LB-Blutagar mit Ouabain wurden 6 mm-Löcher gestanzt, anschließend 20 µl **A**: Saponin; **B**: H₂O; **C**: PTX, 1:100-Verdünnung; aufgetragen; **D**: PTX 1:200-Verdünnung und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

Während das Detergenz Saponin einen deutlichen Hämolysehof auf LB-Blutagar unabhängig von der Anwesenheit des Herzglykosids Ouabain ausprägt, zeigt PTX überraschenderweise überhaupt keine Hämolyseaktivität.

Nach mehrmaliger Wiederholung hat sich bestätigt, dass sich der selbsterstellte LB-Blutagar sowie der kommerziell erwerbliche Blutagar der Firma Oxoid (nicht dargestellt) unter diesen Bedingungen nicht zum PTX-Nachweis eignen.

Der Hämolysetest im Reagenzglas wurde modifiziert und sollte somit eine geeignete Nährstoff-Zusammensetzung für den PTX-Nachweis auf Blutagar, der sowohl Bakterienwachstum als auch PTX-Nachweis ermöglicht, eruieren.

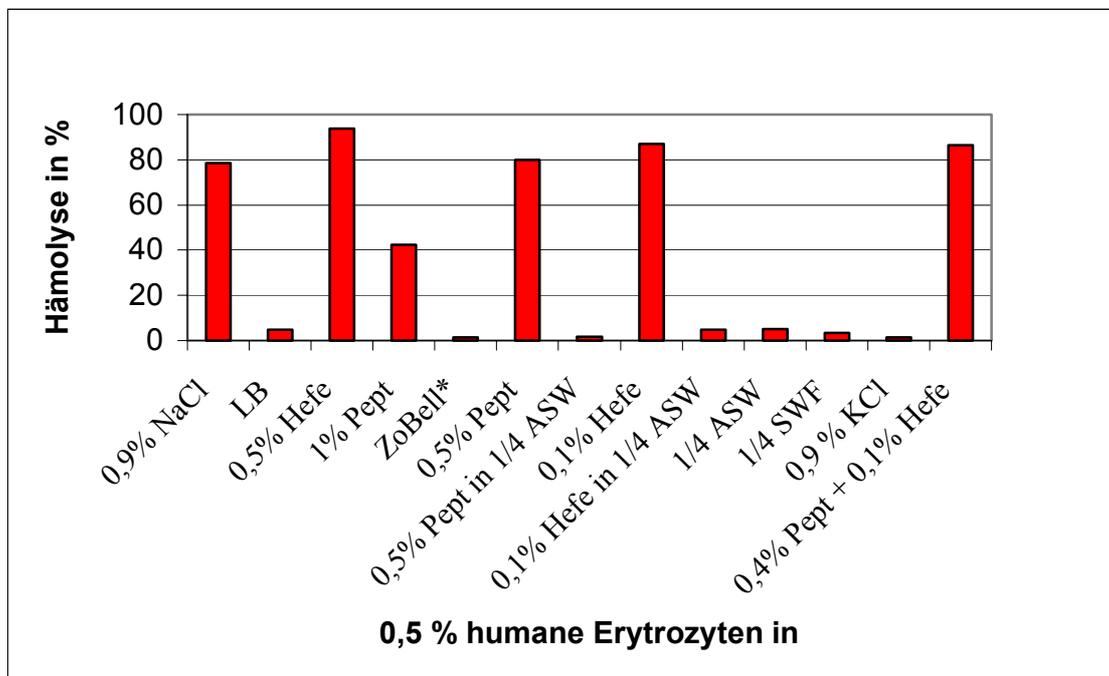


Abb. 21 Hämolytische Aktivität von PTX gegenüber humanen Erythrozyten, die in verschiedenen Medien suspendiert wurden.

0,9% NaCl: 0,9% NaCl, 0,5% Erythrozyten (entspricht dem Hämolysetest im Reagenzglas); **LB:** LB-Medium, 0,5% Erythrozyten; **0,5% Hefe:** 0,9% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% Erythrozyten; **1% Pepton:** 0,9% NaCl, 1% Pepton, 0,5% Erythrozyten; **ZoBell*:** ZoBell-Medium mit 1/4 ASW, 0,5% Erythrozyten; **0,5% Pept:** 0,9% NaCl, 0,5% Pepton, 0,5% Erythrozyten; **0,5% Pept in 1/4 ASW:** 1/4 ASW, 0,5% Pepton, 0,5% Erythrozyten; **0,1% Hefe:** 0,9% NaCl, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Erythrozyten; **0,1% Hefe in 1/4 ASW:** 1/4 ASW, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Erythrozyten; **1/4 ASW:** 1/4 Artificial Seawater, 0,5% Erythrozyten; **1/4 SWF:** 1/4 Seewasser aus Frankreich, 0,5% Erythrozyten; **0,9% KCl:** 0,9% KCl, 0,5% Erythrozyten; **0,4%Pept + 0,1% Hefe:** 0,9% NaCl, 0,4% Pepton, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Erythrozyten.

Abbildung 21 macht deutlich, dass die biologische Aktivität von PTX durch Veränderungen des Suspensionmediums der Erythrozyten stark beeinflusst wird. Die Zugabe hoher Konzentrationen von Hefeextrakt und / oder Pepton bzw. der Austausch von NaCl durch andere Salze, im Speziellen KCl, inhibiert die PTX-induzierte Lyse nahezu vollständig.

Die im Hämolysetest im Reagenzglas bestimmte Nährstoffkonzentration (0,4% Pepton, 0,1% Hefeextrakt in 0,9% NaCl), die einen PTX-Nachweis zulässt, wurde mit Agar versetzt und eine erneute Positivkontrolle mit verschiedenen Verdünnungen von PTX durchgeführt.

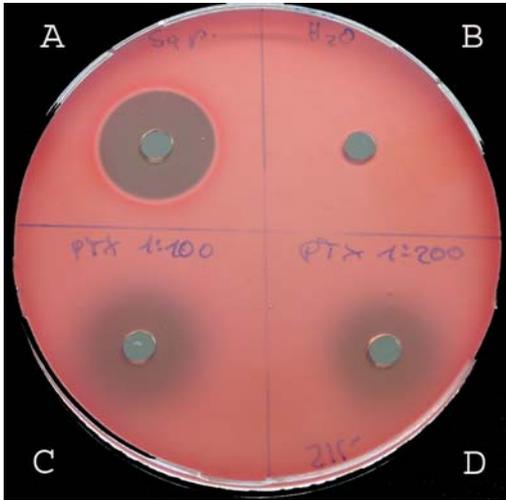


Abb. 22 PTX-Hämolysetest auf PS1-Blutagar.

In PS1-Blutagar wurden 6 mm-Löcher gestanzt, anschließend 20 µl **A**: Saponin; **B**: H₂O; **C**: PTX, 1:100-Verdünnung; **D**: PTX 1:200-Verdünnung aufgetragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

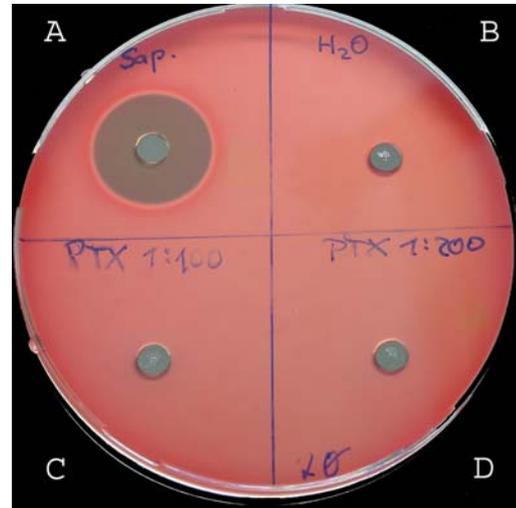


Abb. 23 PTX-Ouabain-Test auf PS1-Blutagar.

In PS1-Blutagar mit Ouabain wurden 6 mm-Löcher gestanzt, anschließend 20 µl **A**: Saponin; **B**: H₂O; **C**: PTX, 1:100-Verdünnung; **D**: PTX 1:200-Verdünnung aufgetragen und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

PTX zeigt auf dem PS1-Blutagar, im Gegensatz zu der klaren Lyse von Saponin, einen diffusen Lysehof, der durch die Anwesenheit von Ouabain vollständig gehemmt wird.

Um herauszufinden, ob die hemmende Wirkung der Nährstoffe und Salze durch Schutz der Erythrozytenmembran oder durch eine Maskierung des PTX zu Stande kommt, wurde PTX mit den jeweiligen Komponenten vorinkubiert und anschließend im Hämolysetest auf Aktivität überprüft.

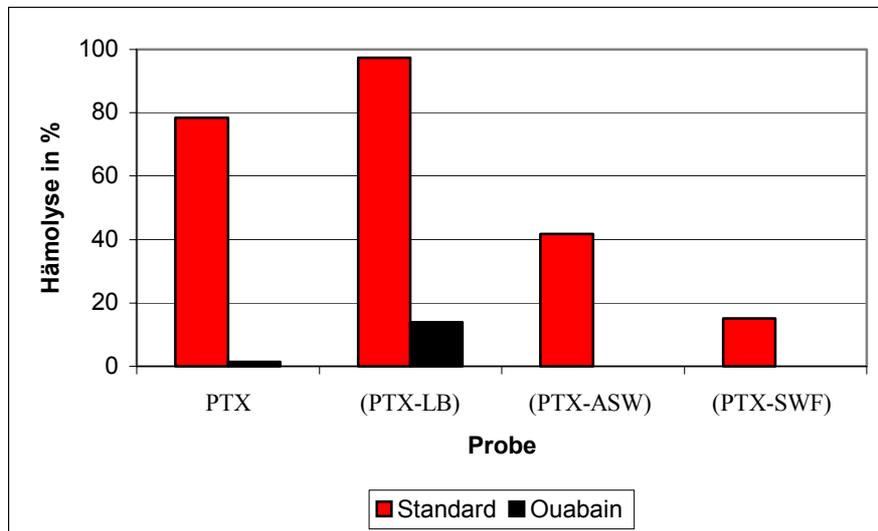


Abb. 24 Hämolytische Aktivität von Palytoxin in verschiedenen Lösungen gegen humane Erythrozyten.

PTX: Palytoxin in H₂O ; **(PTX-LB):** Palytoxin in LB-Medium; **(PTX-ASW):** Palytoxin in Artificial Sea-Water; **(PTX-SWF):** Palytoxin in Seewasser aus Frankreich

Wird PTX mit LB-Medium vorinkubiert, führt dies zu keiner Beeinträchtigung des Lyseverhaltens, hingegen inhibiert eine Vorinkubation von PTX mit ASW und SWF seine hämolytische Aktivität.

4.3.2 Screening

Die Bakterien wurden auf dem PTX-sensitivem PS1-Blutagar mit und ohne Ouabain ausgestrichen und das Lyseverhalten über 9 Tage dokumentiert.

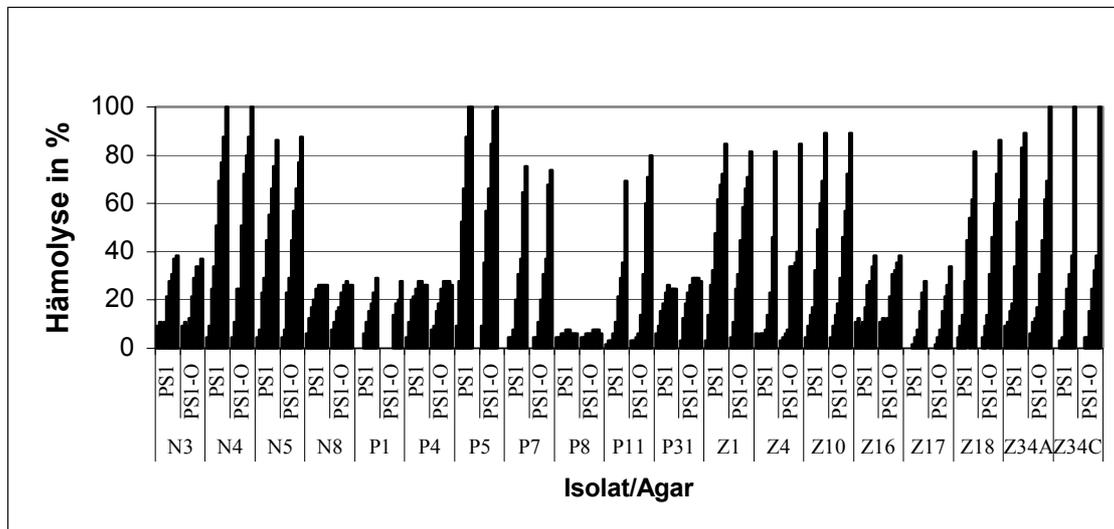


Abb. 25 Hämolyseverlauf der einzelnen Isolate über 9 Tage auf PS1-Blutagar mit Ouabain (PS1-O) und ohne Ouabain (PS1).

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 9 Tagen.

Auch auf PS1-Blutagar konnte keine Ouabain-hemmbarere Hämolyse festgestellt werden.

Isolat N6 ist unter diesen Bedingungen nicht gewachsen.

Da Bakterien oft nur unter Stressbedingungen Sekundärmetabolite produzieren, wurden die Nährstoffe des etablierten PS1-Humanblut-Agar halbiert (PS2-Humanblut-Agar) bzw. der fünfte Teil an Nährstoffen verwendet (PS3-Humanblut-Agar). Alle Isolate wurden nunmehr auf diesen 3 verschiedenen PS-Blutagar ausgestrichen und über 4-6 Tage täglich beobachtet (siehe Abbildungen 26 – 30).

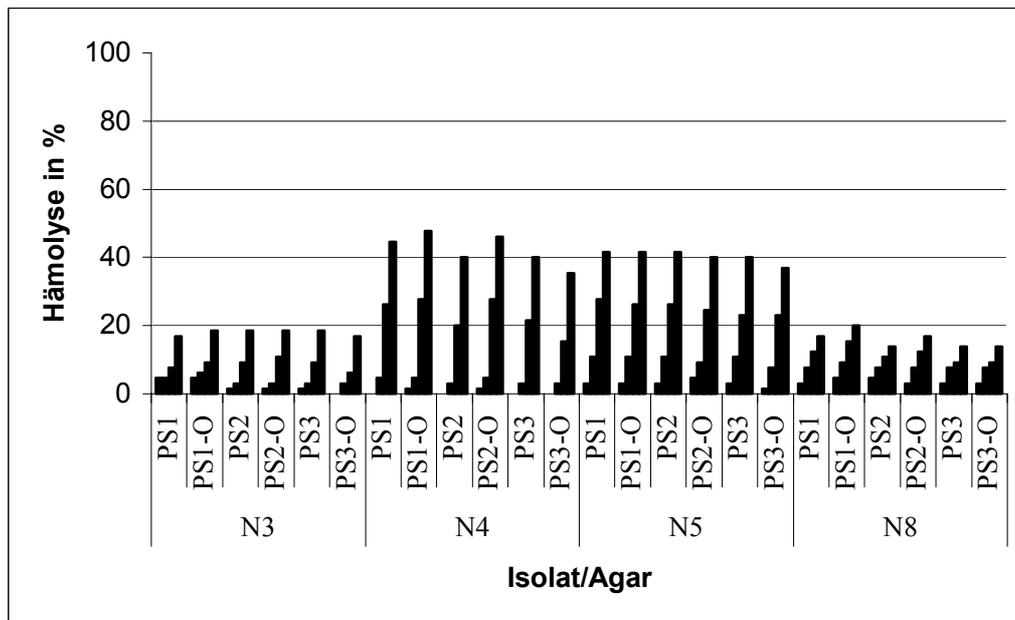


Abb. 26 Hämolyseverlauf der Isolate N3, N4, N5 und N8 über 4 Tage auf PS-Blutagar mit unterschiedlichen Nährstoff-Konzentrationen.

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 4 Tagen.

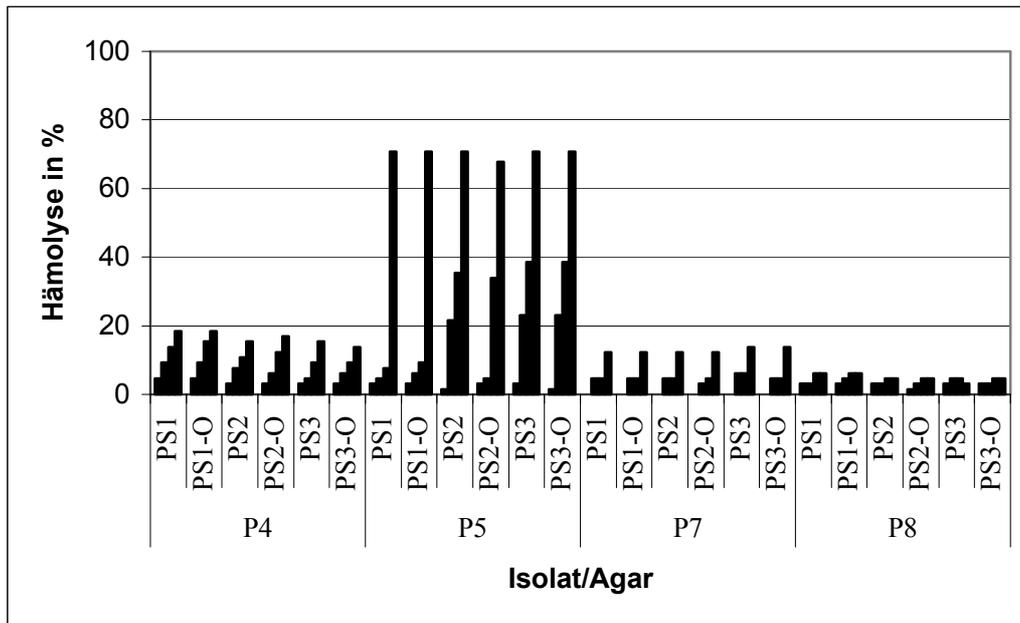


Abb. 27 Hämolyseverlauf der Isolate P4, P5, P7 und P8 über 4 Tage auf PS-Blutagar mit unterschiedlichen Nährstoff-Konzentrationen.

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 4 Tagen.

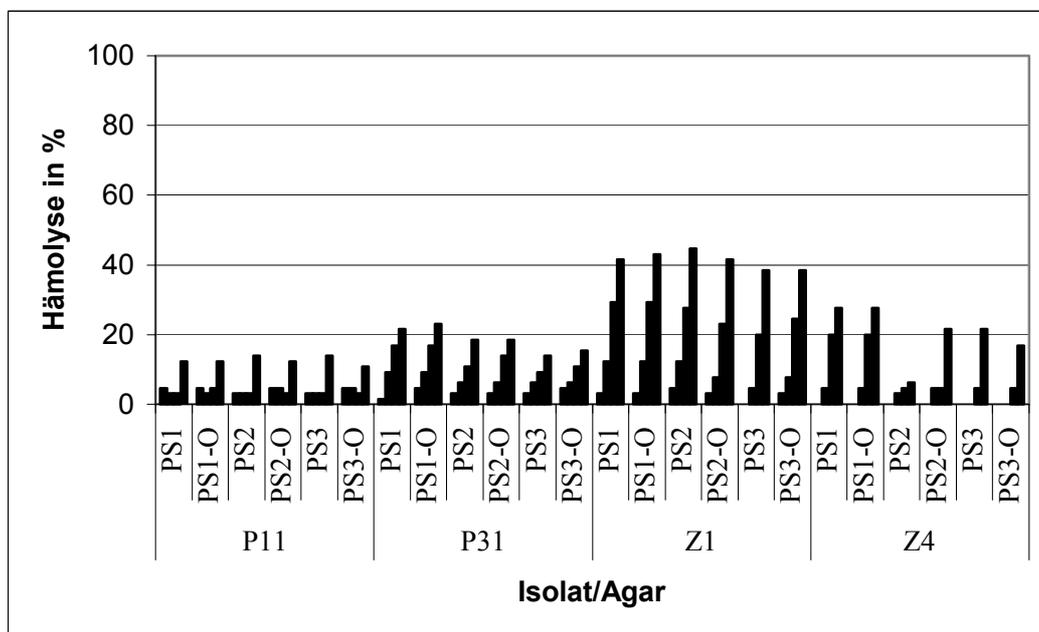


Abb. 28 Hämolyseverlauf der Isolate P11, P31, Z1 und Z4 über 4 Tage auf PS-Blutagar mit unterschiedlichen Nährstoff-Konzentrationen.

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 4 Tagen.

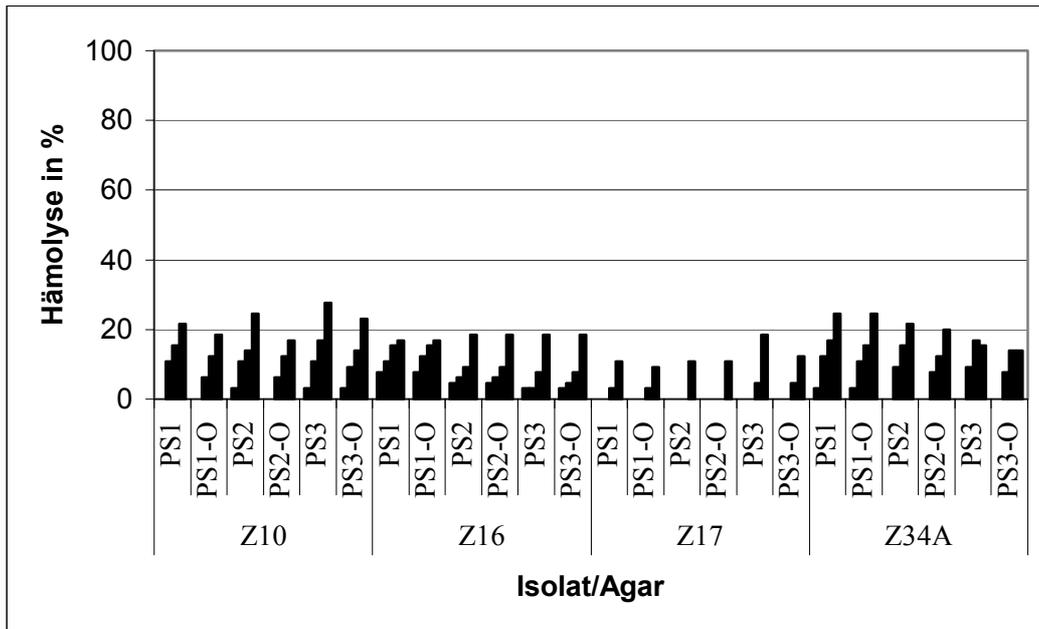


Abb. 29 Hämolyseverlauf der Isolate Z10, Z16, Z17 und Z34A über 4 Tage auf PS-Blutagar mit unterschiedlichen Nährstoffkonzentrationen.

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 4 Tagen.

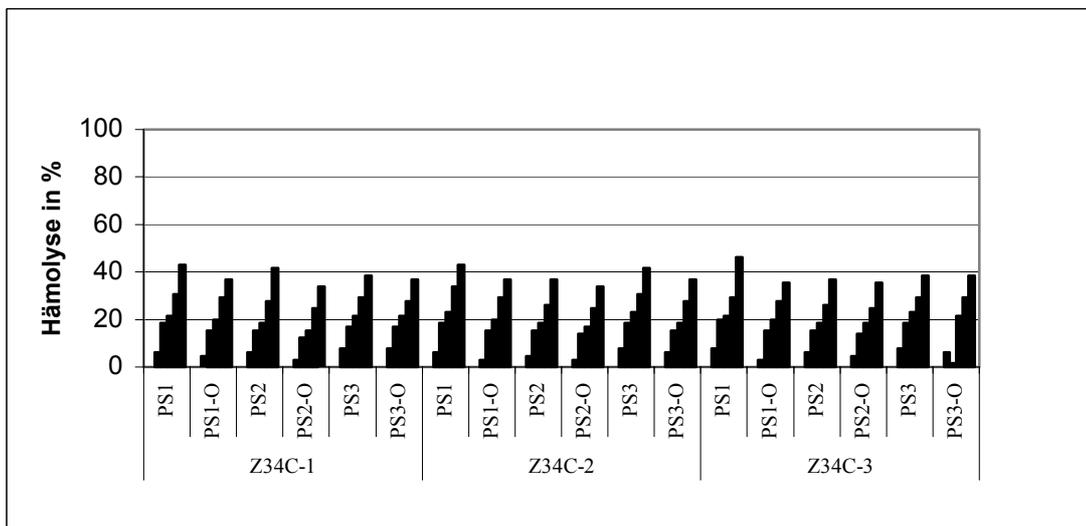


Abb. 30 Hämolyseverlauf von Isolat Z34C über 6 Tage auf PS-Blutagar mit unterschiedlichen Nährstoff-Konzentrationen.

Bakterien wurden auf den entsprechenden Agarplatten ausgestrichen, bei 25 °C inkubiert und ihre hämolytische Aktivität bestimmt. Dargestellt ist die Kinetik des Hämolyseverhaltens der Isolate über einen Zeitraum von 6 Tagen.

Alle Isolate zeigen ein individuelles, zeitabhängiges Hämolysemuster welches sich nicht, bzw. bei Isolat Z34C nur geringfügig (siehe Kapitel 4.3.3), durch Variation der Nährstoffkonzentration und durch Zusatz von Ouabain beeinflussen ließ.

4.3.3 Fokus

Während die Butanol-Extraktion des Isolats Z34C keine hämolytische Aktivität aufzeigte, war im Direkt-PTX-Assay eine geringfügige aber reproduzierbare Ouabain-Hemmbarkeit zu beobachten. Aus diesem Grund wurde Z34C in verschiedenen Minimalmedien jeweils 4 und 8 Tage angezogen, da diese eine mögliche PTX-Produktion zu induzieren vermögen, und nach anschließender Dialyse auf Hämolyseaktivität mit und ohne Ouabain sowohl im Reagenzglas als auch auf Agarbasis untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 31 und 32 dargestellt.

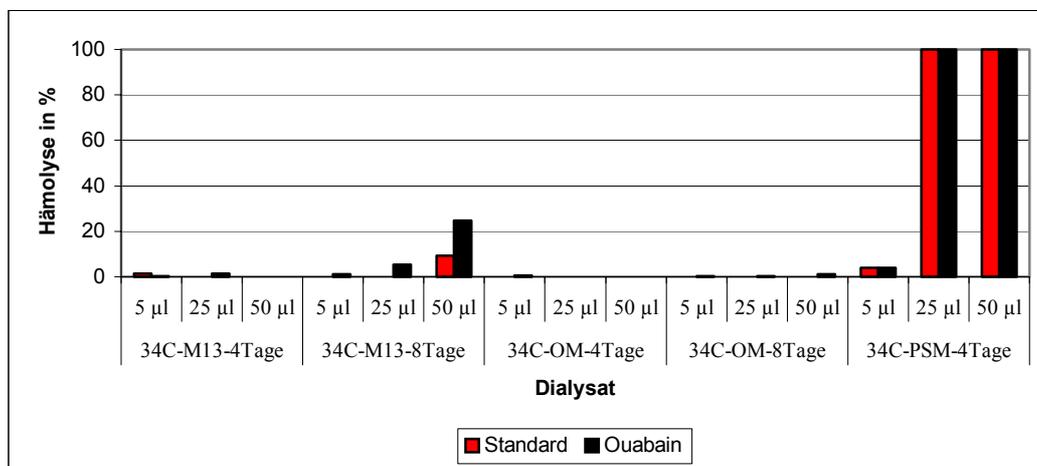


Abb. 31 Hämolyseaktivität der Z34C-Dialysate.

Z34C wurde 4 bzw. 8 Tage in je 400 ml M13-Medium, OM-Medium und PSM-Medium angezogen, gefriergetrocknet, dialysiert und anschließend im Hämolysetest auf Aktivität überprüft.

Zwar war im Dialysat des PSM-Mediums (Flüssigkeitsmedium) eine vergleichsweise hohe Hämolyseaktivität nachweisbar, doch war diese nicht durch Ouabain hemmbar.

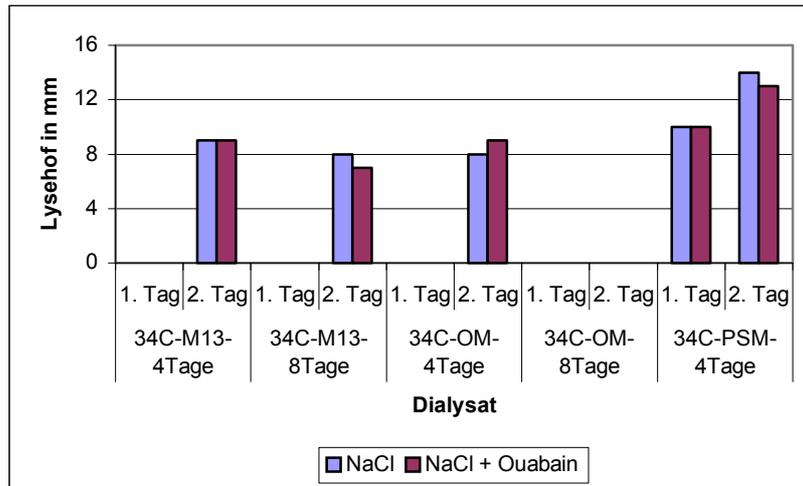


Abb. 32 Agarhämolysetest der Dialysate über 2 Tage.

20 µl des jeweiligen Dialysats wurden im Stanztest eingesetzt und bei 37 °C für 2 Tage auf ON-Blutagar mit Ouabain (**NaCl + Ouabain**) und ohne Ouabain (**NaCl**) inkubiert, wobei jeden Tag der Hämolysehof ausgemessen wurde.

Der über zwei Tage verfolgte Hämolysetest auf ON-Blutagar zeigte ebenfalls keine Ouabain-hemmbar Hämolyse der Z34C-Dialysate.

4.4 16S rDNA Phylogenie

4.4.1 Datenbankvergleich

Um die Isolate auch phylogenetisch charakterisieren zu können, wurde aus allen hämolytisch aktiven Isolaten von *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* DNA isoliert, mittels PCR mit eubakteriellen Primern für das 16S rDNA-Gen amplifiziert und nach erfolgreicher Klonierung eine 16S rDNA-Sequenzierung durchgeführt. Anschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Online-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* abgeglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Phylogenie

Isolat: Bezeichnung des Bakteriums; **Länge:** Basenpaaranzahl der sequenzierten 16S rDNA; **Alignment (BLAST):** Ergebnis des Sequenzalignments über die NCBI Datenbank; **Accession-Number:** Identitäts-Nummer der verglichenen 16S rDNA-Sequenz; **Identität:** prozentuale Übereinstimmung zwischen klonierter und verglichener Sequenz.

Isolat	Länge	Alignment (BLAST)	Accession-Number	Identität
N3	636 bp	unidentified low G+C gram-positive bacterium	AB010843	98%
		<i>Bacillus</i> sp.	AF227848	98%
		<i>Bacillus anthracis</i>	AF290553	98%
		<i>Bacillus anthracis</i>	AF290552	98%
		<i>Bacillus cereus</i>	AF290548	98%
N4	745 bp	<i>Vibrio campbellii</i>	AY035896.1	99%
		<i>Vibrio</i> sp.	VSP391193	99%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF064637	98%
		Uncultured <i>Vibrio</i> sp.	AF108137	98%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF094701	98%
N5	710 bp	<i>Vibrio tubiashi</i>	VT16SRRNA	98%
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AF388389	97%
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AF388387	97%
		<i>V. nereis</i>	VNER16SRA	96%
		<i>V. orientalis</i>	VO16SRRNA	96%
N6	709 bp	Uncultured marine eubacterium HstpL18	AF159668	97%
		<i>Vibrio proteolyticus</i>	VPR16SRRA	96%
		<i>V. carchariae</i>	VCH16SRRA	96%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF094702	96%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF319768	96%

Isolat	Länge	Alignment (BLAST)	Accession-Number	Identität
N8	817 bp	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	AB032015	98%
		<i>Photobacterium histaminum</i>	AB032014	98%
		<i>V. damsela</i>	VD16SRRNA	98%
		<i>Photobacterium damsela</i>	PDA18496	98%
		<i>P. damsela</i>	PP16SRRW	98%
P1	690 bp	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. AS-43	PSP391204	98%
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	AF030381	98%
		<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	AF081498	98%
		<i>Pseudoalteromonas piscicida</i>	AF297959	98%
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	AF227237	98%
P4	656 bp	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	AB032015	98%
		<i>Photobacterium histaminum</i>	AB032014	98%
		<i>V. damsela</i>	VD16SRRNA	98%
		<i>P. damselea</i>	PP16SRRW	98%
		<i>P. damsela</i>	PP16SRR	98%
P5	702 bp	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	AB032015	99%
		<i>Photobacterium histaminum</i>	AB032014	99%
		<i>V. damsela</i>	VD16SRRNA	98%
		<i>Photobacterium damsela</i>	PDA18496	98%
		<i>P. damsela</i>	PP16SRRW	98%
P7	774 bp	<i>Vibrio carchariae</i>	VCH16SRRA	98%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF094702	98%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF319768	98%
		<i>Vibrio carchariae</i>	AF134581	98%
		<i>V. harveyi</i>	VHAR16SRA	98%
P8	757 bp	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	AB032015	98%
		<i>Photobacterium histaminum</i>	AB032014	98%
		<i>Photobacterium damsela</i>	PDA18496	98%
		<i>V. damsela</i>	VD16SRRNA	98%
		<i>Photobacterium damsela</i>	AB026844	98%
P11	708 bp	<i>Aeromonas</i> sp.	AF099027	99%
		<i>Aeromonas caviae</i>	AC16SRDNA	99%
		<i>Aeromonas</i> sp.	ASU88656	99%
		<i>A. caviae</i>	AC16SRRN	99%
		<i>A. veronii</i>	AF410949	99%

Isolat	Länge	Alignment (BLAST)	Accession-Number	Identität
P31	717 bp	<i>Photobacterium damsela</i> <i>damsela</i>	AB032015	97%
		<i>Photobacterium histaminum</i>	AB032014	97%
		<i>Photobacterium damsela</i>	PDA18496	98%
		<i>V. damsela</i>	VD16SRRNA	98%
		<i>P. damsela</i>	PP16SRRW	98%
Z1	1114 bp	<i>Vibrio tubiashi</i>	VT16SRRNA	98%
		<i>V. proteolyticus</i>	VPR16SRRA	97%
		<i>V. nereis</i>	VNER16SRA	97%
		<i>V. nigripulchritudo</i>	VNI16SRRA	97%
		<i>Vibrio</i> sp.	VSU64016	97%
Z4	589 bp	<i>Photobacterium leiognathi</i>	PL16SRRNA	95%
		<i>Photobacterium leiognathi</i>	PHR16SRD3	95%
		<i>P. leiognathi</i>	PL16SRRNG	94%
		<i>Photobacterium phosphoreum</i>	PPH16SRRA	94%
		<i>Photobacterium</i> sp.	AB038032	94%
Z10	680 bp	<i>V. harveyi</i> strain M4	AY046956.1	99%
		<i>Vibrio</i> sp. BB4	AF319768	99%
		<i>Vibrio carchariae</i>	AF134581	99%
		<i>V. carchariae</i>	VCH16SRRA	99%
		<i>Vibrio</i> sp.	AF199438.1	98%
Z16	759 bp	<i>Bacillus</i> sp. AH526	AF290562	97%
		<i>Bacillus anthracis</i>	AF290553	97%
		<i>Bacillus anthracis</i>	AF290552	97%
		<i>Bacillus cereus</i>	AF290548	97%
		<i>Bacillus cereus</i>	AF290547	97%
Z17	630 bp	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. A28	AF227238	96%
		Hydrothermal vent eubacterium PVB_OTU_5	HVU15114	96%
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	AB029824	96%
		Uncultured bacterium clone Car70fc	AF224867	96%
		<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	AF317677	96%
Z18	842 bp	<i>Vibrio tubiashi</i>	VT16SRRNA	96%
		<i>Vibrio nereis</i>	VNER16SRA	96%
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> clone Vp 27	AF388389	95%
		<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	AF388387	95%
		<i>V. proteolyticus</i>	VPR16SRRA	95%

Isolat	Länge	Alignment (BLAST)	Accession-Number	Identität
Z34A	696 bp	<i>V. harveyi</i> strain M4	AY046956.1	97%
		<i>Vibrio</i> sp. BB4	AF319768	97%
		<i>Vibrio carchariae</i>	AF134581	97%
		<i>V.carchiariae</i>	VCH16SRRA	96%
		<i>V.proteolyticus</i>	VPR16SRRA	95%
Z34C	1399 bp	uncultured <i>Stenotrophomonas</i> sp.	AF408330	96%
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain LMG 10857	SMA131117	96%
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SMA293462	96%
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SMA293463	96%
		<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	SMA131912	96%

Die 16S rDNA-Phylogenie-Untersuchungen zeigt, dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten hämolytisch aktiven Isolaten aus *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* zu 70% um Bakterien der nah verwandten Gattungen *Vibrio* und *Photobacterium* handelt. Während *Bacillus* und *Pseudoalteromonas* mit nur 10% vertreten sind, finden sich außerdem noch zu je 5% Bakterien der Gattungen *Aeromonas* und *Stenotrophomonas*.

4.4.2 Stammbaumanalyse

Die Sequenzen wurden von Dr. U. Hentschel mittels der Software ARB in einen 16S rDNA-Stammbaum eingerechnet.

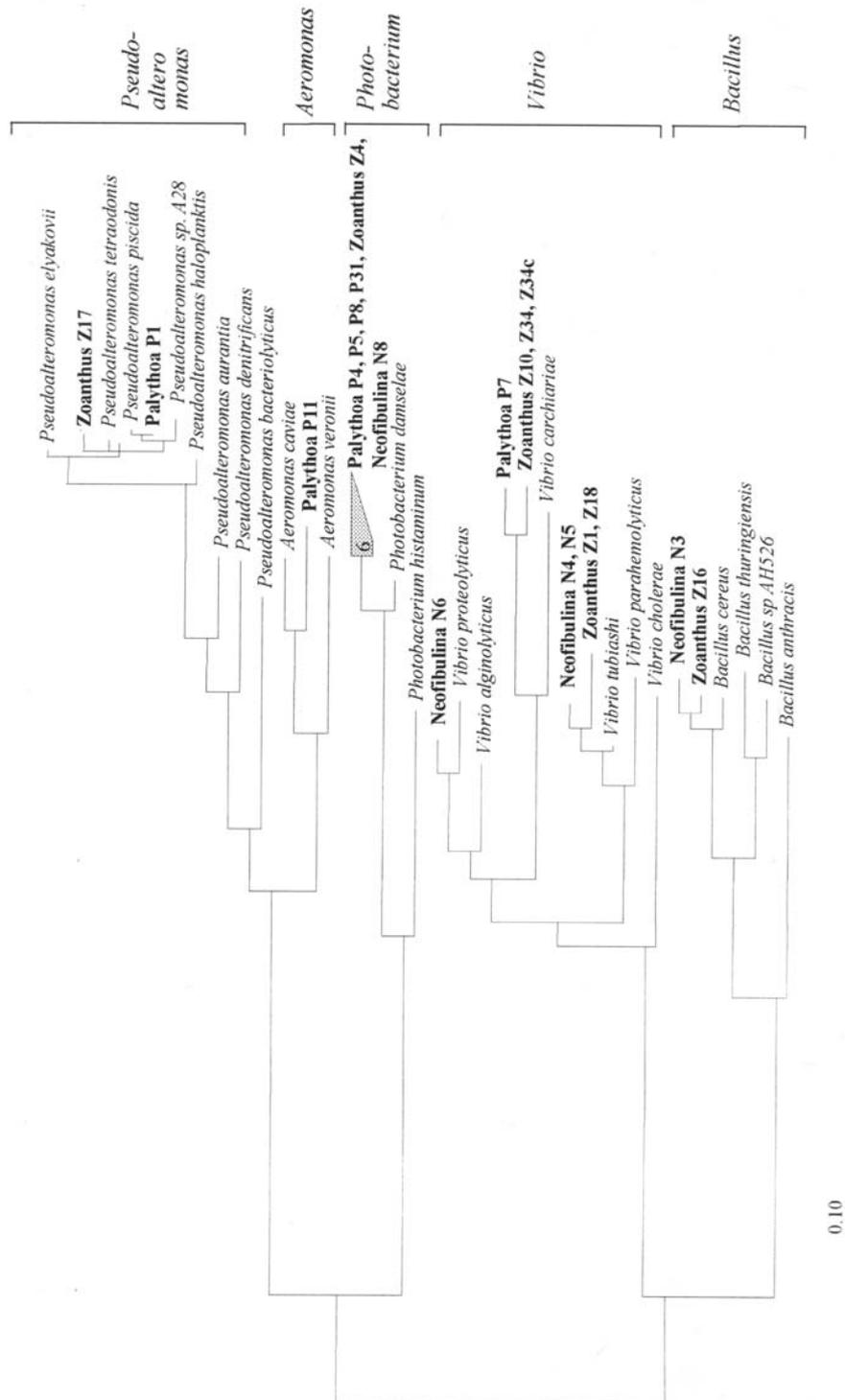


Abb. 33 16S rDNA-Stammbaum

5 Diskussion

5.1 Mikrobielle Herkunft von Palytoxin?

5.1.1 Mikroorganismen als Naturstoffquelle bioaktiver Substanzen

Marine Organismen enthalten eine große Vielfalt an bioaktiven Sekundärmetaboliten. Dies trifft besonders auf sessile Invertebraten, wie Schwämme und Korallen, zu, die sich durch giftige Inhaltsstoffe vor Fressfeinden, dem Überwachsen durch andere Arten oder vor Infektionen schützen. In vielen Fällen sind assoziierte Mikroorganismen die biosynthetische Quelle dieser komplexen Naturprodukte (Haygood et al., 1999). Auch in höheren marinen Organismen, wie Fischen, sind hochaktive Naturstoffe nachgewiesen worden, von denen der mikrobielle Ursprung als erwiesen gilt. Anzuführen sind in diesem Zusammenhang:

- Bakterien und Tetrodotoxin (TTX)

Tetrodotoxin blockiert die Natriumkanäle und gehört mit einer LD_{50} von 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Maus zu den aktivsten marinen Toxinen. Es findet sich hauptsächlich in Kugelfischen (Tetraodontidae), aber auch in weiteren marinen Tieren, wie Krabben, Schnecken, Seesternen, Platt- und Pfeilwürmern, im blaugeringelten Oktopus, aber auch in einigen terrestrischen Tieren, wie Kröten und Molchen (Mebs, 2000). Als Primärproduzenten von TTX oder seinen Derivaten gelten verschiedene Bakterienstämme der Gattungen *Vibrio*, *Alteromonas* und *Aeromonas*, die symbiontisch in den erwähnten Tieren leben (Simidu et al., 1987; Simidu et al., 1990), zumindest ist dies für Kugelfische nachgewiesen.

- Dinoflagellaten und Ciguatoxin (CTX)

Ciguatoxin ist Hauptauslöser der sporadisch auftretenden Fischvergiftung Ciguatera. CTX ist lipophil, besitzt eine LD_{50} von 0,45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und bewirkt, im Gegensatz zu TTX, eine Öffnung der Natriumkanäle (Mebs, 2000). Mehr als 110 verschiedene Fischarten wurden bisher mit Ciguatera in Verbindung gebracht (Halstead, 1988). Die Toxinproduktion geht zurück auf verschiedene, mit Algen assoziierte Dinoflagellaten, wie *Gambierdiscus toxicus* (Yasumoto & Murata, 1993) und *Ostreopsis lenticularis*, die über die Nahrungskette zunächst in pflanzenfressende Fische und anschließend in räuberische Fische gelangen.

Palytoxin, erstmals isoliert aus der Krustenanemone *Palythoa toxica* (Moore & Scheuer, 1971), zeigt sowohl strukturelle, physiologische als auch ökologische Parallelen zu Tetrodotoxin und Ciguatoxin. Gemeinsamkeiten der 3 Toxine sind unter anderem die sehr niedrigen LD₅₀-Werte (PTX: 0,15 µg/kg, TTX: 9 µg/kg, CTX: 0,45 µg/kg) (Mebs, 2000), die weite Verbreitung aller drei Toxine im Tierreich sowie die Schwankungen im Toxingehalt, unabhängig vom untersuchten Gewebe, der Jahreszeit, der geographischen Herkunft und dem Geschlecht der untersuchten Tierarten (Lee et al., 2000; Gleibs & Mebs, 1999). Anhand dieser Parallelen, kam die Vermutung auf, dass PTX, genau wie TTX und CTX von Mikroorganismen produziert werden könnte (Moore et al., 1982; Carballeira et al., 1998; Yasumoto, 1998).

Da der Nachweis des mikrobiellen Ursprungs von PTX bisher nicht reproduzierbar gelang (Moore et al., 1982), (Frolova et al., 2000), sollte die Frage nach der biosynthetischen Herkunft im Rahmen dieser Diplomarbeit bearbeitet werden. Es wurde die biologische Aktivität von Palytoxin, die Hämolyse, genutzt, um entsprechende Bakterien aus PTX-enthaltenden marinen Invertebraten zu isolieren und auf ihre mögliche PTX-Produktion zu untersuchen.

5.1.2 Hämolysecharakteristika und 16S rDNA-Phylogenie

Bei der Probenaufbereitung von *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* wurden auf Blutagar (Oxoid) 80 hämolytisch aktive Bakterienstämme isoliert. Hiervon wurden insgesamt 20 Isolate in dieser Arbeit eingehend charakterisiert.

Die hämolytische Aktivität der Bakterien-Isolate auf Blutagar lässt sich durch deren Produktion von hämolytisch aktiven Naturprodukten erklären, die sich durch eine hohe Bindungsaffinität an spezielle Membrankomponenten der Erythrozyten auszeichnen (Moni et al., 1992). Alle Substanzen, die es vermögen, die Membran von Erythrozyten zu zerstören, fasst man unter dem Oberbegriff Hämolysine zusammen. Meist wirken sie nicht nur toxisch auf Erythrozyten, wonach sie benannt sind, sondern auch auf andere Zelltypen. Anhand ihrer Wirkungsmechanismen lassen sich Hämolysine in 3 Gruppen unterteilen (Rowe & Welch, 1994):

- enzymatische Hämolysine

besitzen eine hohe Substratspezifität, können durch ständiges Recycling viele Zellen zerstören - ihre Aktivität ist temperaturabhängig;

- Poren-bildende Hämolysine

binden zunächst an die Zelloberfläche und bilden eine Pore aus (geschwindigkeitsbestimmender Schritt) und verändern damit die Membranpermeabilität, was schließlich zur Cytolyse führt – die Hämolyse tritt zeitverzögert ein;

- oberflächenaktive Hämolysine

sind sehr hydrophob und extrem thermostabil – die Hämolyse erfolgt sofort.

Palytoxin ist ein Poren-bildendes Hämolysin (Ahnert-Hilger et al., 1982). Es findet keine Spontanhämolyse durch direkte Zerstörung der Zellmembran statt, vielmehr wird die Zellmembran durch einen Zusammenbruch des Ionengleichgewichts instabil. Auslöser für die Hämolyse, einen eher sekundären Effekt, ist die von PTX initiierte Umwandlung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ in einen offenen Ionenkanal. So kommt es zu einer zeitlichen Verzögerung der Hämolyse von 2 bis 4 Stunden, abhängig von der Spezies, von der die Erythrozyten stammen, der Konzentration des Toxins, der Ionenkonzentration der Lösungen, der Temperatur, dem pH-Wert und der Anwesenheit von Hemm- oder Verstärkersubstanzen (Habermann, 1989). Ein weiteres

charakteristisches Merkmal der von PTX ausgelösten Hämolyse ist, dass sie kompetitiv durch Ouabain gehemmt werden kann (Habermann & Chhatwal, 1982). Beide Substanzen binden antagonistisch an der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Im Gegensatz zu PTX schließt Ouabain den Kanal der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Der genaue Ablauf dieser Interaktion ist bisher auf molekularer Ebene noch nicht geklärt (Redondo et al., 1996). Es kann jedoch davon ausgegangen werden, dass die PTX-Bindungsstelle die Ouabain-Bindungsstelle einschließt, aber nicht mit ihr identisch ist (Habermann, 1989). Zu dieser Vermutung führten Experimente, in denen die Empfindlichkeit verschiedener Säugetier-Erythrozyten gegenüber PTX beziehungsweise gegenüber Ouabain untersucht wurde. Während die PTX-Sensitivität mit der Reihe Ratte > Mensch > Rind > Hund (Habermann et al., 1989) abnimmt, sind Ratten-Erythrozyten gegenüber Ouabain wesentlich weniger empfindlich als die Erythrozyten anderer Säuger. Diese unterschiedliche Sensitivität verschiedener Zelltypen gegenüber den beiden Liganden kann nur damit erklärt werden, dass PTX und Ouabain nicht an der gleichen Stelle des $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Moleküls binden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Invertebraten *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* wurden nach Alkoholextraktion (Beress et al., 1983) im Hämolysetest auf PTX-Aktivität untersucht. In den beiden Zoantharia-Arten, *Palythoa caribaeorum* und *Zoanthus pulchellus*, konnte die Hämolyse durch Vorinkubation der Erythrozyten mit Ouabain gehemmt werden, was auf die Anwesenheit von PTX hinweist. Der ebenfalls untersuchte Schwamm *Neofibularia nolitangere* zeigte nur nach wässriger Extraktion Hämolyseaktivität, die geringfügig die für PTX typische Ouabain-Hembarkeit aufwies.

Die aus *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* isolierten Bakterien zeigten auf LB-Blutagar keine Ouabain-hemmbarke Hämolyseaktivität. Im Laufe der Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass sowohl der zur Bakterien-Isolierung verwendete, kommerziell erwerbbar Blutagar (Oxoid) als auch der selbst hergestellte LB-Blutagar aufgrund der reichhaltigen Nährstoffzusammensetzung sich nicht für den Palytoxin-Nachweis eignen (siehe hierzu Kapitel 5.1.3). Bekannt ist jedoch, dass Bakterien oft unterschiedliche Hämolsine produzieren (Chopra et al., 1991; Agaisse et al., 1999), daher besteht nach wie vor die Möglichkeit, dass sie dennoch zur PTX-Synthese befähigt sind. Da Mikroorganismen unter suboptimalen *in vitro*-Bedingungen ihr Sekundärmetabolit-Expressionsmuster im Vergleich zu den *in vivo*-Bedingungen ändern bzw. einstellen, wurden die Isolate in

unterschiedlichen marinen Flüssigmedien (400 ml) bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen und verschiedenen PTX-Anreicherungs- und -Isolierungsmethoden (Butanolausschüttlung, Säulenaufreinigung und Dialyse) unterworfen. Doch auch in diesem Fall konnte bei keinem der Isolate PTX-Aktivität festgestellt werden.

Wie 16S rDNA-Untersuchungen ergaben, handelte es sich bei den aus *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* isolierten Bakterien zu 70% um Vertreter der nah verwandten Gattungen *Vibrio* und *Photobacterium*, die restlichen 30% setzten sich aus Vertretern der Gattungen *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas* und *Stenotrophomonas* zusammen. Bei diesen Gattungen handelt es sich um überwiegend typisch marine Bakterien, die, mit Ausnahme der Bacillen, den gram-negativen gamma-Proteobakterien angehören. Die Sequenzanalyse schließt somit weitgehend aus, dass es sich bei den untersuchten Bakterien um Laborkontaminanten handelt. Weit schwieriger gestaltet sich der Nachweis, dass es sich bei den isolierten Bakterien auch tatsächlich um mit Invertebraten assoziierte Organismen und nicht aus dem Seewasser entstammende Mikroorganismen handelt. Eine Möglichkeit zu überprüfen, ob es sich um abundante Mikroorganismen der entsprechenden Invertebraten handelt, wären FISH-Untersuchungen (Floureszent *in situ* Hybridisierung) mit einer spezifisch entwickelten Sonde, deren Grundlage mit der 16S rDNA-Sequenzierung geschaffen worden ist. Da bislang bei keinem Bakterium eine PTX-Aktivität nachgewiesen werden konnte, stellt sich der Anwendungsbedarf jedoch vorerst nicht.

Die charakterisierten hämolytisch aktiven Bakterien-Isolate gehören überwiegend Gattungen an, von denen die Expression eines breiten Spektrums an Hämolytinen bereits bekannt ist:

- *Vibrio und Photobacterium:*

Die Gattung *Vibrio* beinhaltet einige pathogene Spezies, die verschiedene toxische Proteine produzieren (Shinoda, 1999). Am bekanntesten sind das Cholera Toxin (CT) und CT-verwandte Toxine, welche unter anderem Diarrhoe verursachen. Aber auch das vom Fischpathogen *Photobacterium damsela* produzierte Damselysin, ein hitzelabiles Zytolysin mit Phospholipase D und Hämolyseaktivität (Kreger, 1984) ist eingehend untersucht. Ebenfalls zu erwähnen sind die für viele Fischvergiftungen mitverantwortlichen Hämolytine, TDH (*thermostable direct hemolysin*) und TRH (*thermostable related hemolysin*), des fakultativ halophilen Bakteriums *V. parahaemolyticus* (Cabassi & Mori, 1976).

- *Aeromonas*:

Aeromonaden bilden eine ganze Reihe an Hämolsinen (Chopra et al., 1991), wobei Aerolysin (Howard et al., 1987), ein Poren-bildendes Hämolysin (Abrami et al., 2000), sicherlich am eingehendsten charakterisiert ist.

- *Bacillus*:

Von Bacillen, die ubiquitär vorkommen, sind bereits viele membranzerstörender Toxine bekannt, allein *B. cereus* bildet Haemolysin BL (HBL), Cereolysin O, Haemolysin II und III, sowie mehrere Proteasen und 3 Phospholipasen C (Beecher & Wong, 2000). Die meisten dieser potentiellen Virulenzfaktoren werden gemeinsam exprimiert (Agaisse et al., 1999).

Die charakterisierten Hämolyseeigenschaften der 20 Bakterien-Isolate zeigten keine Korrelation mit ihrer phylogenetischen Einordnung, d.h., Bakterienstämme, die das gleiche BLAST-Ergebnis erzielten, wiesen ein unterschiedliches Hämolyse-Profil auf. In den meisten Fällen waren die Hämolsine hitzelabil, nur Isolat P5 zeigte nach 10-minütiger Erhitzung auf 99° C noch einen Teil seiner hämolytischen Aktivität, was auf die Anwesenheit des TDH schließen lassen könnte. Überraschende Ergebnisse jedoch erbrachte die enzymatische Hydrolyse von Bakterienkulturen. Während zu erwarten war, dass die Kulturen nach enzymatischer Verdauung entweder ihre hämolytische Aktivität beibehalten, sofern es sich um Hämolsine von Nicht-Protein-Natur handelt oder die Hämolyseaktivität verlieren, wenn es sich um Protein-Hämolsine handelt, entwickelten viele Proben erst nach der Inkubation mit Proteinase K hämolytische Aktivität. Dies wäre damit zu erklären, dass es sich bei diesen allesamt hoch aktiven Hämolsinen um Sekundärmetaboliten handelt, die von den Bakterien mit Hilfe von Proteinen maskiert werden, um die eigenen Zellen vor der zytolytischen Aktivität zu schützen. Werden die maskierenden Proteine durch Proteinase K-Einwirkung zerstört, entfaltet sich das hämolytische Potential der Sekundärmetabolite.

5.1.3 Probleme des PTX-Nachweises bei Mikroorganismen

Zum Nachweis von Palytoxin wurden in den letzten Jahren unterschiedliche Methoden etabliert, angefangen von Letalitätstests an Mäusen (Moore & Scheuer, 1971; Alcalá et al., 1988; Ito et al., 1996) und Crustaceen (Wiles et al., 1974; Beress et al., 1983) über Ionenstrommessungen an Nervenzellen (Noguchi et al., 1987), immunologischen Nachweistests (Bignami et al., 1992) bis hin zur analytischen HPLC (Fukui et al., 1987; Mahnir et al., 1992) und dem durch seine unkomplizierte Durchführung und Spezifität bewährten Hämolysetest (Habermann et al., 1981; Tosteson et al., 1994a; Gleibs et al., 1995).

Da es sich bei Bakterienkulturen jedoch nicht um Reinsubstanzen, sondern um komplexe Medien handelt, ergeben sich einige Probleme bei den verschiedenen PTX-Nachweismethoden: Unabhängig von der Versuchstierproblematik wären Letalitätstests an Tieren ungeeignet, da Toxizität auch durch andere Substanzen in den Proben verursacht werden könnte. Ebenso wären Ionenstrommessungen zu unspezifisch, da viele Substanzen als Neurotoxine wirken können. Immunologische Tests bergen immer die Gefahr von Kreuzreaktionen, die gerade in komplexen Medien nicht auszuschließen sind. Zudem wurde bereits nachgewiesen, dass PTX-Antikörper auch mit toxisch inaktivem PTX reagieren (Bignami et al., 1992). Bei allen genannten Nachweismethoden ist man auf die Isolierung von PTX aus den Bakterienkulturen angewiesen. Daher wurden in dieser Arbeit drei verschiedene Isolierungsmethoden angewandt. Allerdings hat man bei jeder Aufreinigungsprozedur sowohl mit quantitativen als auch mit qualitativen Verlusten zu rechnen. Zudem besteht beim Isolieren und Kultivieren der Symbionten die Gefahr, dass sich ihre metabolische Aktivität drastisch verändert und die PTX-Ausbeute nochmals reduziert wird.

Aus diesen Überlegungen heraus wurde ein Direkt-PTX-Nachweis für Mikroorganismen entwickelt. Die PTX-Aktivität sollte direkt auf den Kulturplatten sichtbar gemacht werden, ohne den Umweg über Flüssigkultivierung und umständliche Isolierungsmethoden zu gehen. Zur Umsetzung bot sich LB-Blutagar mit und ohne Ouabain, einem spezifischen PTX-Inhibitor, an. PTX-produzierende Bakterien würden entsprechend auf dem LB-Blutagar ohne Ouabain Hämolyse zeigen, dagegen auf dem LB-Blutagar mit Ouabain nicht. Es stellte sich heraus, dass die hohe Nährstoffkonzentration, die in dem LB-Blutagar enthalten ist, die Palytoxin-Wirkung unterdrückt. Aus diesem Grund wurde ein Palytoxin-sensitiver Blutagar (PS-Blutagar)

entwickelt, der eine geeignete Nährstoffzusammensetzung bietet, um sowohl Bakterien auf ihnen kultivieren zu können als auch PTX-induzierte Hämolyse zu ermöglichen. Da es sich bei den zu untersuchenden Bakterien um marine Organismen handelt, wurden zuerst Blutagarplatten auf Meerwasserbasis hergestellt, jedoch inhibierte die Anwesenheit von diversen Salzen ebenso wie eine zu hohe Hefeextrakt- und Peptonkonzentration die Hämolyse durch Palytoxin. Diese Beobachtung gab Anstoß zu der Hypothese, dass Palytoxin im natürlichen Habitat durch die Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen keine Toxizität aufweisen könnte (vergleiche Kapitel 5.2).

Nachdem es gelungen war, einen Direkt-PTX-Assay für Mikroorganismen zu etablieren, wurden die vorhandenen, hämolytisch aktiven Bakterien-Isolate aus *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus pulchellus* und *Neofibularia nolitangere* erneut auf PTX-Aktivität untersucht. Doch auch in diesem Fall konnte keine PTX-Aktivität beobachtet werden. Was jedoch aufgrund der Ausgangssituation, dass das Initial-Screening der Isolate auf PTX-insensitiven Blutagar von Oxoid durchgeführt wurde, keine Überraschung darstellte und die Aussage über die mögliche Produktion von PTX durch Bakterien relativiert.

Da sich hiermit die Diskussion um den mikrobiellen Ursprung von Palytoxin nicht abschließen ließ, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des etablierten Direkt-PTX-Assay für Mikroorganismen eine erneute Isolierung von Bakterien aus der Krustenanemone *Palythoa caribaeorum* in der Karibik durchgeführt. Es wurde eine Stammsammlung von rund 250 Bakterien erstellt, die in weiterführenden Arbeiten auf PTX-Aktivität untersucht werden soll.

5.2 Die Wirkung von Palytoxin im natürlichen Umfeld

Ungeachtet der Frage, ob Palytoxin von der Krustenanemone selbst oder von mit ihr symbiontisch lebenden Bakterien produziert wird, stellt sich das Problem, welche Funktion das Toxin im natürlichen Umfeld hat. Die Beobachtung, dass PTX im Nanogrammbereich letal für terrestrische Lebewesen ist, jedoch im marinen Bereich offenbar in hohen Dosen toleriert wird, erstaunt. Denn erst die hohe Toleranz mariner Tiere gegenüber Palytoxin macht dessen weite Verbreitung und damit eine Anreicherung des Toxins über die Nahrungskette, an deren Ende der Mensch steht und Gefahr läuft, vergiftet zu werden, möglich (Gleibs & Mebs, 1999).

In der Vergangenheit wurde intensiv die Wirkung von Palytoxin auf verschiedene Zelltypen (Blut-, Muskel-, Nerven-, Nieren- und Gehirnzellen), die von unterschiedlichen Tierarten stammten, untersucht. Hierzu zählten vorrangig terrestrische Vertebraten wie Nager, Rinder, Schafe, Schweine, Hasen, Hunde und Menschen (Übersichtsartikel hierzu: Beress et al., 1983; Habermann, 1989; Terao et al., 1992 und Pichon, 1982). Hauptsächliches Interesse galt den durch PTX hervorgerufenen Muskelkontraktionen, der Nervenzelldepolarisation und anderen grundlegenden zellulären Reaktionen. PTX stellte sich dabei für alle Zelltypen terrestrischer Wirbeltiere als hochgradig toxisch dar. Jedoch wurden über die PTX-Wirkung auf Zellen von marinen Lebewesen, die unter natürlichen Bedingungen mit dem Toxin konfrontiert werden könnten, kaum Untersuchungen angestellt. Lediglich die Nervenzellen von Krebsen (Kim et al., 1995) und Tintenfischen (Pichon, 1982) wurden auf ihre Reaktion gegenüber PTX untersucht. Auffällig war, dass bei diesen Zellen höhere PTX-Konzentrationen als bei den meisten Vertebratenzellen benötigt wurden, um eine vergleichbare Depolarisation zu erhalten (Habermann, 1989).

Aufgrund der extremen Unterschiede der Palytoxin-Wirkung auf terrestrische und marine Lebewesen wurden verschiedene Hypothesen über mögliche Resistenz-Mechanismen aufgestellt: (1) PTX wird in eine inaktive Form durch körpereigene Enzyme metabolisiert; (2) die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ unterscheidet sich strukturell bei marinen und terrestrischen Lebewesen; (3) oral aufgenommenes PTX hat im Gegensatz zu intraperitoneal oder intravenös verabreichtem Toxin eine geringere Toxizität (Wiles et al., 1974) oder (4) PTX hat im Laufe der Evolution seine Toxizität im marinen Bereich eingebüßt (Mebs, 2001).

Beobachtungen in dieser Arbeit haben gezeigt, dass die einfache Anwesenheit von Meerwasser die Aktivität von PTX stark beeinträchtigt. Eine Abwandlung des Hämolysetests durch die Inkubation humaner Erythrozyten in 0,9% Seewasser anstatt in physiologischer Kochsalzlösung führt zur Inhibierung der durch PTX bewirkten Hämolyse. Das gleiche Phänomen ist zu beobachten, wenn KCl als Lösungsmittel dient. Die inhibierende Wirkung von Kalium auf die des PTX ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben worden (Rouzaire-Dubois & Dubois, 1990; van Renterghem & Frelin, 1993; Iordanov & Magun, 1998).

Meerwasser weist einen durchschnittlichen Salzgehalt von ca. 3,5% (w/v) auf, wobei in Nebenmeeren der Salzgehalt durch Vermischung mit Süßwasser niedriger oder durch stärkere Verdunstung höher sein kann. Die Zusammensetzung der gelösten Salze ist weltweit annähernd konstant. Durchschnittliche Werte der häufigsten Ionen sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tab. 9 Haupt-Ionen-Zusammensetzung von Seewasser (Brock, 2000)

Ion	Konzentration (g/l)
Na ⁺	10,6
K ⁺	0,38
Mg ²⁺	1,27
Ca ²⁺	0,4
Cl ⁻	18,9
Br ⁻	0,065
SO ₄ ²⁻	2,65
HCO ₃ ⁻ / CO ₃ ²⁻	0,14
pH	8,1

Im Meerwasser sind insgesamt 70 chemische Elemente nachgewiesen worden, wenn auch zum Teil in äußerst geringer Konzentration. Nach der Verdampfung von Meerwasser bleiben hauptsächlich Kochsalz (NaCl), Magnesiumchlorid (MgCl₂), Magnesiumsulfat (MgSO₄), Gips (CaSO₄ x 2 H₂O), Kaliumsulfat (K₂SO₄), Calciumcarbonat (CaCO₃) und Magnesiumbromid (MgBr₂) zurück, während alle anderen Stoffe weniger als ein zehntel Promille ausmachen.

Der überwiegende Anteil der Organismen, in denen PTX nachgewiesen wurde, gehören zu den marinen Wirbellosen (Cnidaria, Mollusken, Crustaceen, Polychaeten, Echinodermen und Tunicaten). Sie alle sind zur Osmoregulation nicht befähigt und besitzen eine zum Außenmedium (Meerwasser) isoosmotische Körperflüssigkeit. Da das Leben im Meer entstanden ist, ist es verständlich, dass die extrazelluläre Flüssigkeit primärer Meerestiere sowohl in der Ionenzusammensetzung als auch in der Höhe des osmotischen Wertes große Ähnlichkeit mit dem Meerwasser aufweisen. Hingegen haben terrestrische Tiere ebenso wie Süßwassertiere eine deutlich geringere Ionenkonzentration in der extrazellulären Flüssigkeit (Remane et al., 1985). Dies erklärt auch die Beobachtung, dass Zellen der Regenbogenforelle auf PTX extrem sensitiv reagieren (Gleibs, 1998). Die PTX-Toleranz von marinen Fischen könnte sich durch die aktive Salzaufnahme aus dem Meerwasser erklären. Ihre Blutsalzkonzentration beträgt etwa 25 – 50% des Meerwassers. Pro Tag nehmen sie etwa 4 – 8% ihres eigenen Körpergewichts an Salzwasser auf, dabei werden Natrium, Kalium und Chlorid aktiv aufgenommen und anschließend Wasser osmotisch nachgezogen. Die wesentlich niedrigere Ionenkonzentration (vornehmlich die Kaliumkonzentration) der extrazellulären Flüssigkeiten (Blut, Hämolymphe) bei Landtieren gegenüber Meerestieren könnte demnach ursächlich für die unterschiedliche Wirkung von PTX sein. Während marine Organismen PTX durch die hohe K^+ -Ionenkonzentration in seiner Wirkung neutralisieren könnten, wirkt es auf die Zellen von terrestrischen Wirbeltieren letal.

Interessant gestaltet sich auch die Frage nach dem Prinzip, mit der Salze die PTX-Aktivität zu inhibieren vermögen. Denkbar ist sowohl eine direkte Interaktion der Salze mit dem Toxin, als auch ein indirekter Schutz über die Einwirkung der Salze auf die Na^+K^+ -ATPase.

5.3 Ausblick

Die Frage nach dem Syntheseweg von Palytoxin ist weiterhin unbeantwortet. Da ein kultivierbarer Mikroorganismus die komfortabelste Grundlage zur molekularen Erforschung dieses Weges bieten würde, erscheint es lohnend, weiterhin nach geeigneten Bakterien zu suchen. Die bereits angelegte Stammsammlung von 250 Isolaten wird auf die Produktion von PTX überprüft werden, was mit Hilfe des etablierten Direkt-PTX-Assays möglich sein sollte.

Um auch die nicht kultivierbaren Bakterien auf PTX-Produktion untersuchen zu können, sollten FISH-Untersuchungen hier weiterhelfen. Cohybridisierungen mit einem PTX-Antikörper und Bakterien-spezifischen FISH-Sonden wären dafür ein vielversprechender Anfang.

Ein weiterer Ansatzpunkt, die mikrobielle Produktion von PTX zu untersuchen, wäre eine Krustenanemone durch Zugabe von antibiotischen Substanzen im Aquarium steril zu halten und die Veränderung des PTX-Gehaltes zu dokumentieren. Sollte die Toxizität abnehmen oder gar verschwinden, wäre dies ein Hinweis auf die mikrobielle Herkunft von PTX.

Darüber hinaus bietet die in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese zur PTX-Resistenz bei marinen Tieren aufgrund der K^+ -Ionenkonzentration in extrazellulären Flüssigkeiten viele Ausgangspunkte für weitergehende Untersuchungen. So könnten über *patch clamp*-Analysen mit Zellen mariner Invertebraten oder Fischen deren Resistenz gegenüber PTX überprüft werden, was auch die molekularen Schutzmechanismen der Salze gegenüber der Toxizität von PTX einschließt.

6 Zusammenfassung

1. Palytoxin (PTX) ist eines der aktivsten Toxine im marinen Bereich. Es wurde erstmals aus der Krustenanemone *Palythoa toxica* isoliert und gehört, mit Ausnahme von Biopolymeren, zu den komplexesten Naturprodukten. Inzwischen wurde PTX in einer Reihe von marinen Organismen nachgewiesen, die alle eine hohe Resistenz dem Toxin gegenüber aufweisen. Über den Biosyntheseweg von Palytoxin ist bisher wenig bekannt. Die Tatsache, dass PTX im Korallenriff weit verbreitet ist, deutet auf eine mögliche mikrobielle Herkunft des Toxins hin.
2. Aus marinen Invertebraten, die PTX enthielten (*Palythoa caribaeorum* und *Zoanthus pulchellus*), wurden Bakterien isoliert, kultiviert und auf ihre hämolytische Aktivität, eine Charakteristika von PTX, untersucht.
3. Da sich der PTX-Nachweis durch Hämolyse bei Mikroorganismen als problematisch erwies, musste ein neuer Test entwickelt werden, der einen spezifischen Nachweis erlaubt. Hierbei handelt es sich um modifizierten Blutagar mit und ohne Ouabain-Zusatz.
4. Die Hämolyseeigenschaften von 20 Bakterien-Isolaten zeigen ein unterschiedliches Profil. In den meisten Fällen waren die gebildeten Hämolsine hitzelabil. Durch enzymatische Verdauung wurden einige Hämolsine nicht beeinträchtigt, während andere ihre Aktivität verloren bzw. sogar erhöhte Hämolyseaktivitäten zeigten. Eine PTX-spezifische Hämolyse, die sich in einer Hemmung durch Ouabain auszeichnet, konnte jedoch nicht beobachtet werden.
5. Sequenzanalysen ergaben, dass es sich bei den Isolaten zu 70% um Vertreter der nahe verwandten Gattungen *Vibrio* und *Photobacterium* handelte, die übrigen setzten sich aus Vertretern der Gattungen *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas* und *Stenotrophomonas* zusammen.
6. Die im Seewasser enthaltenen Salze üben offenbar auf Palytoxin eine hemmende Wirkung aus, was möglicherweise die Ursache der PTX-Toleranz bei marinen Organismen darstellt.

7 Summary

1. Palytoxin (PTX) is a very potent marine toxin. Its first isolation was accomplished in 1971 from the Zoanthid *Palythoa toxica*. PTX represents one of the most complex products of nature with the exception of large biopolymers. Meanwhile its presence was detected in many organisms which all display an effective resistance to its toxic potential. Details of its biosynthetic pathways are not known, yet. The widespread occurrence in coral reefs albeit indicates that PTX might be of microbial origin.
2. Bacteria were isolated from marine invertebrates that are known to contain PTX. A characteristic property of this marine toxin is its ability to induce haemolysis. Thus the aforementioned bacteria were grown and tested for their haemolytic potential using mammalian erythrocytes and a standard coculture procedure.
3. It turned out that the chosen method to characterize PTX-producing bacteria via their haemolytic properties is problematic. A new protocol had to be developed that allowed a more specific and reproducible detection. It employs a modified blood-based agar recipe together with and without the addition of ouabain.
4. The haemolytic profile of 20 different bacterial isolates was analyzed. Most haemolysins turned out to be heat-sensitive and resistant to proteolytic hydrolysis. However, some isolates lost their haemolytic potential completely while others presented with augmented haemolytic properties after a proteinase K treatment. A PTX-specific haemolysin that can be competed for by ouabain cotreatment was not observed within this series of experiments.
5. DNA-sequence analysis indicated that 70% of the isolates were exponents of the closely related genera *Vibrio* and *Photobacterium*. The other isolates belonged to the genera *Bacillus*, *Pseudoalteromonas*, *Aeromonas* and *Stenotrophomonas*.
6. The high concentration of certain anorganic ions in sea water has an impeding effect on the haemolytic activity of PTX. This finding may represent a crucial factor for the tolerance observed among a vast number of different marine organisms.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung	RNA	Ribonukleinsäure
Amp	Ampicillin	RT	Raumtemperatur
ASW	<i>Artificial Sea Water</i>	sec	Sekunde(n)
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>	SWF	Seewasser aus Frankreich
bp	Basenpaar(e)	Tab.	Tabelle
°C	Grad in Celsius	T_m	Schmelzpunkt
CT	Cholera Toxin	TDH	<i>thermostable direct hemolysin</i>
CTX	Ciguatoxin	TRH	<i>thermostable related hemolysin</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	TTX	Tetrodotoxin
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat	U	Unit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	U/min	Umdrehungen pro Minute
FISH	Floureszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	V	Volt
h	Stunde	v/v	Volumen/Totalvolumen
IPTG	1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	w/v	Gewicht/Totalvolumen
IR	Floureszenzfarbstoff		
kb	Kilobase(n)		
kDa	Kilodalton		
km	Kilometer		
l	Liter		
M	Mol/l		
m	Meter		
min	Minute(n)		
μl	Microliter		
ml	Milliliter		
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>		
n. d.	nicht dargestellt		
ng	Nanogramm		
nm	Nanometer		
OD₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm		
ori	<i>origin of replication</i>		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PTX	Palytoxin		
rDNA	für ribosomale RNA codierende DNA		

9 Literaturverzeichnis

- ABRAMI, L., FIVAZ, M. & VAN DER GOOT, F. G. (2000). Adventures of a pore-forming toxin at the target cell surface. — *Trends Microbiol* 8, 168-72.
- AGAISSE, H., GOMINET, M., OKSTAD, O. A., KOLSTO, A. B. & LERECLUS, D. (1999). PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. — *Mol Microbiol* 32, 1043 - 1053.
- AHNERT-HILGER, G., CHHATWAL, G. S., HESSLER, H. J. & HABERMANN, E. (1982). Changes in erythrocyte permeability due to palytoxin as compared to amphotericin B. — *Biochim Biophys Acta* 688, 486-94.
- ALBERTS, B., BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M., ROBERTS, K.; WATSON, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. — VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- ALCALA, A. C., ALCALA, L. C., GARTH, J. S., YASUMURA, D. & YASUMOTO, T. (1988). Human fatality due to ingestion of the crab *Demania reynaudii* that contained a palytoxin-like toxin. — *Toxicon* 26, 105-7.
- AMIR, I., HARRIS, J. B. & ZAR, M. A. (1997). The effect of palytoxin on neuromuscular junctions in the anococcygeus muscle of the rat. — *J Neurocytol* 26, 367-76.
- ATTAWAY, D. H. & CIERESZKO, L. S. (1974). Isolation and partial characterisation of Caribbean palytoxin. — 2nd Int. Coral Reef Symp., Brisbane, Australia.
- BAKUS, G. J. (1981). Chemical defense mechanisms on the Great Barrier Reef, Australia. — *Science* 211, 497 - 499.
- BEECHER, D. J. & WONG, A. C. (2000). Cooperative, synergistic and antagonistic haemolytic interactions between haemolysin BL, phosphatidylcholine phospholipase C and sphingomyelinase from *Bacillus cereus*. — *Microbiology* 146 Pt 12, 3033-9.
- BERESS, L., ZWICK, J., KOLKENBROCK, H. J., KAUL, P. N. & WASSERMANN, O. (1983). A method for the isolation of the caribbean palytoxin (C-PTX) from the coelenterate (zooanthid) *Palythoa caribaeorum*. — *Toxicon* 21, 285-90.
- BERTANI, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. — *Journal of bacteriology* 62, 293 - 300.

- BIGNAMI, G. S. (1993). A rapid and sensitive hemolysis neutralization assay for palytoxin. — *Toxicon* 31, 817-20.
- BIGNAMI, G. S., RAYBOULD, T. J., SACHINVALA, N. D., GROTHAUS, P. G., SIMPSON, S. B., LAZO, C. B., BYRNES, J. B., MOORE, R. E. & VANN, D. C. (1992). Monoclonal antibody-based enzyme-linked immunoassays for the measurement of palytoxin in biological samples. — *Toxicon* 30, 687-700.
- BROCK. (2000). *Biology of Microorganisms*. — Prentice Hall.
- CABASSI, E. & MORI, L. (1976). *Vibrio parahaemolyticus*: aetiological agent of food poisoning. — *Folia Vet Lat* 6, 335-54.
- CARBALLEIRA, N. M., EMILIANO, A., SOSTRE, A., RESTITUYO, J. A., GONZALEZ, I. M., COLON, G. M., TOSTESON, C. G. & TOSTESON, T. R. (1998). Fatty acid composition of bacteria associated with the toxic dinoflagellate *Ostreopsis lenticularis* and with Caribbean *Palythoa* species. — *Lipids* 33, 627-32.
- CHOPRA, A. K., HOUSTON, C. W. & KUROSKY, A. (1991). Genetic variation in related cytolytic toxins produced by different species of *Aeromonas*. — *FEMS Microbiol Lett* 62, 231-7.
- DUBOIS, J. M. & COHEN, J. B. (1977). Effect of palytoxin on membrane and potential and current of frog myelinated fibers. — *J Pharmacol Exp Ther* 201, 148-5.
- ENCARTA. (2001). *Ocean and Oceanography*. — In: *Encyclopedia* (M. E. Online, ed).
- FROLOVA, G. M., KUZNETSOVA, T. A., MIKHAILOV, V. V. & ELIAKOV, G. B. (2000). [Immunoenzyme method for detecting microbial producers of palytoxin]. — *Bioorg Khim* 26, 315-20.
- FUKUI, M., MURATA, M., INOUE, A., GAWEL, M. & YASUMOTO, T. (1987). Occurrence of palytoxin in the trigger fish *Melichtys vidua*. — *Toxicon* 25, 1121-4.
- GLEIBS, S. (1998). *Vorkommen und Rolle eines toxischen Sekundärmetaboliten (Palytoxin) im Ökosystem Korallenriff*. — Dissertation, Universität Frankfurt.
- GLEIBS, S. & MEBS, D. (1999). Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. — *Toxicon* 37, 1521-7.
- GLEIBS, S., MEBS, D. & WERDING, B. (1995). Studies on the origin and distribution of palytoxin in a Caribbean coral reef. — *Toxicon* 33, 1531-7.

- GRIMBERG, J., MAGUIRE, S. & BELLUSCIO, L. (1989). A simple method for the preparation of plasmid and chromosomal *E. coli* DNA. — *Nucleic Acids Res* 17, 8893.
- HABERMANN, E. (1989). Palytoxin acts through Na⁺,K⁺-ATPase. — *Toxicon* 27, 1171-87.
- HABERMANN, E., AHNERT-HILGER, G., CHHATWAL, G. S. & BERESS, L. (1981). Delayed haemolytic action of palytoxin. General characteristics. — *Biochim Biophys Acta* 649, 481-6.
- HABERMANN, E. & CHHATWAL, G. S. (1982). Ouabain inhibits the increase due to palytoxin of cation permeability of erythrocytes. — *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319, 101-7.
- HABERMANN, E., HUDEL, M. & DAUZENROTH, M. E. (1989). Palytoxin promotes potassium outflow from erythrocytes, HeLa and bovine adrenomedullary cells through its interaction with Na⁺, K⁺ -ATPase. — *Toxicon* 27, 419-30.
- HALSTEAD, B. W. (1988). *Poisonous and Venomous Marine Animals of the World*. — Darwin Press, Princeton.
- HASHIMOTO, Y., FUSETANI, N. & KIMURA, S. (1969). Aluterin: A toxin of the filefish, *Alutera scripta* probably originating from a zoantharian *Palythoa tuberculosa*. — *Bull. Jap. Soc. Sci. Fisheries* 35, 1086 - 1093.
- HAYGOOD, M. G., SCHMIDT, E. W., DAVIDSON, S. K. & FAULKNER, D. J. (1999). Microbial symbionts of marine invertebrates: opportunities for microbial biotechnology. — *J Mol Microbiol Biotechnol* 1, 33-43.
- HENTSCHEL, U., SCHMID, M., WAGNER, M., FIESELER, L., GERNERT, C. & HACKER, J. (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. — *FEMS Microbiol Ecol* 35, 305-312.
- HIRSH, J. K. & WU, C. H. (1997). Palytoxin-induced single-channel currents from the sodium pump synthesized by in vitro expression. — *Toxicon* 35, 169-76.
- HOWARD, S. P., GARLAND, W. J., GREEN, M. J. & BUCKLEY, J. T. (1987). Nucleotide sequence of the gene for the hole-forming toxin aerolysin of *Aeromonas hydrophila*. — *J Bacteriol* 169, 2869-71.

- IORDANOV, M. S. & MAGUN, B. E. (1998). Loss of cellular K⁺ mimics ribotoxic stress. Inhibition of protein synthesis and activation of the stress kinases SEK1/MKK4, stress-activated protein kinase/c-Jun NH₂-terminal kinase 1, and p38/HOG1 by palytoxin. — *J Biol Chem* 273, 3528-34.
- ISHII, K., IKEDA, M. & ITO, K. (1997). Characteristics of palytoxin-induced cation currents and Ca²⁺ mobilization in smooth muscle cells of rabbit portal vein. — *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355, 103-10.
- ITO, E., OHKUSU, M., TERAOKA, K. & YASUMOTO, T. (1997). Effects of repeated injections of palytoxin on lymphoid tissues in mice. — *Toxicon* 35, 679-88.
- ITO, E., OHKUSU, M. & YASUMOTO, T. (1996). Intestinal injuries caused by experimental palytoxicosis in mice. — *Toxicon* 34, 643-52.
- ITO, K., KARAKI, H. & URAKAWA, N. (1979). Effects of palytoxin on mechanical and electrical activities of guinea pig papillary muscle. — *Jpn J Pharmacol* 29, 467-76.
- KAN, Y., UEMURA, D., HIRATA, Y., ISHIGURO, M. & IWASHITA, T. (2001). Complete NMR signal assignment of palytoxin and N-acetylpalytoxin. — *Tetrahedron Letters* 42, 3197 - 3202.
- KIM, S. Y., MARX, K. A. & WU, C. H. (1995). Involvement of the Na,K-ATPase in the induction of ion channels by palytoxin. — *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 351, 542-54.
- KODAMA, A. M. & HOKAMA, Y. (1989). Variations in symptomatology of ciguatera poisoning. — *Toxicon* 27, 593-5.
- KODAMA, A. M., HOKAMA, Y., YASUMOTO, T., FUKUI, M., MANEA, S. J. & SUTHERLAND, N. (1989). Clinical and laboratory findings implicating palytoxin as cause of ciguatera poisoning due to *Decapterus macrosoma* (mackerel). — *Toxicon* 27, 1051-3.
- KREGER, A. S. (1984). Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. — *Infect Immun* 44, 326-31.

- LEE, M. J., JEONG, D. Y., KIM, W. S., KIM, H. D., KIM, C. H., PARK, W. W., PARK, Y. H., KIM, K. S., KIM, H. M. & KIM, D. S. (2000). A tetrodotoxin-producing *Vibrio* strain, LM-1, from the puffer fish *Fugu vermicularis radiatus*. — *Appl Environ Microbiol* 66, 1698-701.
- LI, S. & WATTENBERG, E. V. (1999). Cell-type-specific activation of p38 protein kinase cascades by the novel tumor promoter palytoxin. — *Toxicol Appl Pharmacol* 160, 109-19.
- MAEDA, M., KODAMA, R., T., T., YOSHIKAWA, H., NOMOTO, K., TAKEMOTO, T. & FUJITA, M. (1985). Structure of insecticidal substances isolated from a red alga *Chondria armata*. — 27th Symposium on the Chemistry of Natural Products, Hiroshima.
- MAHNIR, V. M., KOZLOVSKAYA, E. P. & KALINOVSKY, A. I. (1992). Sea anemone *Radianthus macrodactylus*--a new source of palytoxin. — *Toxicon* 30, 1449-56.
- MARTINEZ, J. P., GIL, M. L., CASANOVA, M., LOPEZ-RIBOT, J. L., GARCIA DE LOMAS, J. & SENTANDREU, R. (1990). Wall mannoproteins in cells from colonial phenotypic variants of *Candida albicans*. — *J Gen Microbiol* 136, 2421-32.
- MEBS, D. (1989). Gifte im Riff. Toxikologie und Biochemie eines Lebensraumes. — Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart.
- MEBS, D. (1998). Occurrence and sequestration of toxins in food chains. — *Toxicon* 36, 1519-22.
- MEBS, D. (2000). Gifttiere. — Wissenschaftl. Verlagsges. mbH, Stuttgart.
- MEBS, D. (2001). Toxicity in animals. Trends in evolution? — *Toxicon* 39, 87-96.
- MONI, R. W., PARSONS, P. G., QUINN, R. J. & WILLIS, R. J. (1992). Critical micelle concentration and hemolytic activity--a correlation suggested by the marine sterol, halistanol trisulfate. — *Biochem Biophys Res Commun* 182, 115-20.
- MOORE, R. E. (1985). Structure of palytoxin. — *Fortschr Chem Org Naturst* 48, 81-202.
- MOORE, R. E. & BARTOLINI, G. (1981). Structure of palytoxin. — *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2491 - 2494.
- MOORE, R. E., HELFRICH, P. & PATTERSON, G. M. L. (1982). The deadly seaweed of Hana. — *Oceanus* 25, 54 - 63.

- MOORE, R. E. & SCHEUER, P. J. (1971). Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. — *Science* 172, 495-8.
- NOGUCHI, T., HWANG, D.-F., ARAKAWA, O., DAIGO, K., SATO, S., OZAKI, H., KAWAI, N., ITO, M. & HASHIMOTO, K. (1987). Palytoxin is the causative agent in the parrotfish poisoning. — *Nat. Univ., Singapore*.
- ONUMA, Y., SATAKE, M., UKENA, T., ROUX, J., CHANTEAU, S., RASOLOFONIRINA, N., RATSIMALOTO, M., NAOKI, H. & YASUMOTO, T. (1999). Identification of putative palytoxin as the cause of clupeotoxism. — *Toxicon* 37, 55-65.
- PICHON, Y. (1982). Effects of palytoxin on sodium and potassium permeabilities in unmyelinated axons. — *Toxicon* 20, 41-7.
- REDONDO, J., FIEDLER, B. & SCHEINER-BOBIS, G. (1996). Palytoxin-induced Na⁺ influx into yeast cells expressing the mammalian sodium pump is due to the formation of a channel within the enzyme. — *Mol Pharmacol* 49, 49-57.
- REMANE, A., STORCH, V. & WELSCH, U. (1985). *Kurzes Lehrbuch der Zoologie*. — Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- ROUZAIRE-DUBOIS, B. & DUBOIS, J. M. (1990). Characterization of palytoxin-induced channels in mouse neuroblastoma cells. — *Toxicon* 28, 1147-58.
- ROWE, G. E. & WELCH, R. A. (1994). Assays of Hemolytic Toxins. — *Methods in Enzymology* 235, 657 - 667.
- SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. — *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- SCHEINER-BOBIS, G., MEYER ZU HERINGDORF, D., CHRIST, M. & HABERMANN, E. (1994). Palytoxin induces K⁺ efflux from yeast cells expressing the mammalian sodium pump. — *Mol Pharmacol* 45, 1132-6.
- SHINODA, S. (1999). Protein toxins produced by pathogenic vibrios. — *J Nat Toxins* 8, 259-69.
- SIMIDU, U., KITA-TSUKAMOTO, K., YASUMOTO, T. & YOTSU, M. (1990). Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. — *Int J Syst Bacteriol* 40, 331-6.
- SIMIDU, U., NOGUCHI, T., HWANG, D. F., SHIDA, Y. & HASHIMOTO, K. (1987). Marine bacteria which produce tetrodotoxin. — *Appl Environ Microbiol* 53, 1714-5.

- SUH, E. M. & KISHI, Y. (1994). Synthesis of Palytoxin from palytoxin carboxylic acid. — *J. Am. Chem. Soc.* 116, 11205 - 11206.
- TANIYAMA, S., MAHMUD, Y., TANU, M. B., TAKATANI, T., ARAKAWA, O. & NOGUCHI, T. (2001). Delayed haemolytic activity by the freshwater puffer *Tetraodon* sp. toxin. — *Toxicon* 39, 725-7.
- TERAO, K. K., ITO, E. & YASUMOTO, T. (1992). Light and electron microscopic observation of experimental palytoxin poisoning in mice. — *Bull Soc Pathol Exot* 85, 494-6.
- TOSTESON, M. T., BIGNAMI, G. S., SCRIVEN, D. R., BHARADWAJ, A. K. & TOSTESON, D. C. (1994a). Inhibition of the actions of palytoxin on the K⁺ efflux from red cells and on the Na/K-ATPase activity by a monoclonal antibody. — *Biochim Biophys Acta* 1191, 371-4.
- TOSTESON, M. T., HALPERIN, J. A., KISHI, Y. & TOSTESON, D. C. (1991). Palytoxin induces an increase in the cation conductance of red cells. — *J Gen Physiol* 98, 969-85.
- TOSTESON, T. R., BARD, R. F., GONZALES, I. M., BALLANTINE, D. L. & BIGNAMI, G. S. (1994b). Toxin diversity in the ciguatera food chain. — *Proc. Int. Symp. on Ciguatera and Marine Natural Products*, 73 - 87.
- UEMURA, D., UEDA, K., HIRATA, Y., NAOKI, H. & IWASHITA, T. (1981). Structure of Palytoxin. — *Tetrahedron Lett.* 22, 2781 - 2784.
- USAMI, M., SATAKE, M., SHIDA, S., INOUE, A., KAN, Y. & YASUMOTO, T. (1995). Palytoxin analogs from dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. — *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5389 - 5390.
- VAN RENTERGHEM, C. & FRELIN, C. (1993). 3,4 dichlorobenzamil-sensitive, monovalent cation channel induced by palytoxin in cultured aortic myocytes. — *Br J Pharmacol* 109, 859-65.
- WACHI, K. M., HOKAMA, Y., HAGA, L. S., SHIRAKI, A., TAKENAKA, W. E., BIGNAMI, G. S. & LEVINE, L. (2000). Evidence for palytoxin as one of the sheep erythrocyte lytic factors in crude extracts of ciguateric and non-ciguateric reef fish tissue. — *J Nat Toxins* 9, 139-46.

-
- WILES, J. S., VICK, J. A. & CHRISTENSEN, M. K. (1974). Toxicological evaluation of palytoxin in several animal species. — *Toxicon* 12, 427-33.
- YASUMOTO, T. (1998). Fish poisoning due to toxins of microalgal origins in the Pacific. — *Toxicon* 36, 1515-8.
- YASUMOTO, T. & MURATA, M. (1993). Marine toxins. — *Chem. Rev.* 93, 1897 - 1909.
- YASUMOTO, T., YASUMURA, D., OHIZUMI, Y., TAKAHASHI, M., ALCALA, A. C. & ALCALA, L. C. (1986). Palytoxin in two species of xanthid crab from the Philippines. — *Agric. Biol. Chem.* 50, 163 - 167.
- YOKOYAMA, A., MURATA, M., OSHIMA, Y., IWASHITA, T. & YASUMOTO, T. (1988). Some chemical properties of maitotoxin, a putative calcium channel antagonist isolated from marine dinoflagellate. — *J. Biochem.* 104, 184 - 187.
- ZOBELL, C. E. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. — *Journal of marine research* 4, 42 - 75.

10 Anhang

16S rDNA-Sequenzen der Bakterien-Isolate

N3 (636 bp)

GaGCGGaGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACtGCCATNAAGACTGGGATAACTCCGGGA
AACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCG
GCTGTCACTTATGGaTGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAG
GCAACGATGCGTASCGaCCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAG
ACTcCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTtCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACG
CCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTA
GTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG
CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGcTCAACCgtGGAGGGTCAiTTGGAAACT
GGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAGTGGGAATTcCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
AGATATGGGAGGAACACCA

N4 (745 bp)

CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGAiCCACGATTACTAGCGATT
CCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACTTTTTGGGATTTCG
CTCACTTTCGCAAGTtGGCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACCCG
TAAgGCCATGATGACTTGACGTTCGTCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTG
GAGTTCCCGACATTACTCGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAAC
CCAACATTTCAACACGaGCTGACGaCAGCCATGCAGCACCTGTMTcAGAGTTCCCGAAGG
CACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA
TCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTgCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATC
TTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAgTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGC
CACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCT
CCCCACGCTTTCGCATCTGAGTGTcAGTATCTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGaCACCGGTATTC
CTTCAGATCTCTACGcATTTCAcCGCTACACCTGAAATTcTACCCCCTcTACAGTACT

N5 (710 bp)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG
AAACGAGTAACTGAACCTTCGGGGAACGTAAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAA
TGCCTGGGGAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATA
ATAGCTTCGGCTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGG
ATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGA
TGATCAGCCACACTGGAAGTGAACGACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TATTGCACAATGGGCGCAAGCTGtATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAGTACTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCATTGACGTTAG
CTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGC
GTAAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAAGC
CCGGGGCTCAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGT
AGAATTTCAgGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATC

N6 (709 bp)

GCTCAATTGAACGCTGGCgGCAGGCCTAACACATGCAAGTtGAGCGGAAACGAGTAACTGA
ACCTTcGGgGAACGTAAACgGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGAAATTGCC
CTGATGTKGGGGATAACCATTGGAAACGATGGCTAATACCGCATAATAGCTTCgGCTCAAAG
AGGGGGACCTTcgGGCCTCTYGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGG
TAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAA
CTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCA
AGCTGYATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAaGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTC
GTGAGGAAGGTGGTGTTCGTTAATAGCGGCATCATTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCG
GCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTK
GGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTAGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGTGCTCAACCTCG
GAACTGCATTTGAAACTTGCTGAcTAGAGTACTGTAGAGGGGGGTAGAATTTAGGTGTAGC
GGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGaATACCGT

N8 (817 bp)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGaGCGGC
AGCGGCTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAAGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTGGGAATATGCCCTGATGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAT
CTCTTCGGAGCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATTAGCCCAGGTGGGATT
AGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTTACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAAGTGAACGACCGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGTAGTGTAGTTAACACCTGCACTATTTGACGTTACCTA
CAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGaGGGTGCGaGCGTTA
ATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGCGGCCTCTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCgG
GGCTTAAcCTCGGAATTGCATTTgAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTgTAGAGGGGGGTAGAATT
TCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCAGTGGCGAAGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTTACGcTcAGATGCGAAACGTGGcGAGCAAACAGATTAGATACCTGGTAGTC
AcGCGTAAcGATTT

P1 (690 bp)

GAGTTTGATCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCgGCAGGCcTAACACATGCAAGTYGAGCGGT
AACATTTCTAGCTTGCTAGAAGATGACGAGCGGCGGACgGGTGAGTAATACTTGGGAACATG
CCTTGAgGTGGGGGACAACcATTGGAAACGATGGCTAATACcGCATAATGTCTACKGACCAA
AGGGGGCTTCGGCTCTCGCCTTTAGATTGGCCCAAGTgGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAA
GGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTTTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCT
GGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCAGGA
GGAAAGGTTAGTAGTTAATACctGCTAGCTGTGACGTTACTGACAGAAGAAGCACCSGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGCGTACGCAGGCGGTTTGTAAAGCGAGATGTGAAAGCCCCGGGCTTAACCTGGGAMCT
GCATTTTCGAcCTGGCAAACCTAGAGTGTGATAGAGGGTGGTAGAATTTTCAGGTGTAGCGGTGA
AATGCGTAGAGA

P4 (656 bp)

CGGGGAGCGGTAAGGGCGGCGAGCGGcGGACGGGgGAGTAATGcCtGGGAATATGCCcGNA
TGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAATCTCTTCGGAGCAAAGAGG
GGGACCTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATTAGCCAGGTGGGATTAGCTTGTtGGTGAGGTAA
TGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGiCTGAGAGGAiGATCAGCCACACTGGAActGA
GACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCC
TGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAGGGA
GGAAGGTAGTGTAGTTAACACCTGCAiTATTTGACGTTACCTACAGAAGAAGCACCCGGCTAA
CTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGT
AAAGYGCATGCAGGCGGCCTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTTAACCTCGGAATT
GCATTTgAAACTGGcAGGYTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGA
AATgCGTAGAGATCTgAMGGaATACCASTKGC GGAGGCGG

P5 (702 bp)

GAGTTTGAWCCTGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGG
CAGCgGCTTAACTGAACcTTCGGGGAACGTTAAGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTGGGAATATGCCCTGATGTGGGGGATAACTATTGGAAACGATAGCTAATACCGCATAAT
CTCTTCGGAGCAAAGAGGGGGACTTCGGGCCCTCTCGCGTCAGGATTAGCCAGGTGGGATT
AGCTTGTtGGTGAGGTAAATGGCTCACCAAGGCAACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCACACTGGAActGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT
GCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCTATGCCGCGTGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGT
AAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGTAGTGTAGTTAACACCTGCACTATTTGACGTTACCTA
CAGAAGAAGCACCCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAGCGTT
AATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCATGCAGGCGGCCTGTAAAGTCAGATGTGAAAGCCC
GGGGCTTAACCTCGGAATTGCATTTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGaGGGGGGTAGG
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG

P7 (774 bp)

TGCAAGTCGAGCGGAAACGAGTTATCTGAACCTTCGGGGAACGATAACGGCGTCGAGCGGC
GGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAAATTGCCCTGGTGTGGGGGATAACCATTGGAAACGATG
GCTAATACCGCATAATACCTACGGGTCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGAT
ATGCCTAGGTGGGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCTGGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAG
AAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTCGTGAGGAAGGTAGTGTAGTTAATAGCTGCAT
TATTTGACGTTAGCGACAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGCAGCGTTAATCGGAATTAAGCGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTGTAAAG
TCAGATGTGAAAGCCCGGGGCTCAACCTCGGAATAGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTA
CTGTAGAGGGGGGTAGAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATAC
CGGTGGCGAAGCGGCCCCCTGGACAGATACTGACACTCAGGATGCCGAAGCGTGGGGGAGCA
AACAGGGTTAGATACCCTgGKAGTSCACGSCGTAAACGA

P8 (757 bp)

TGTATATgCCAAtGTAGCACGTGTGTaGCCCTACTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCC
CCACCTTCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCCTGGAGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAA
CAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACACGAGCTGACG
ACAGCCATGCAGCACCTGTcTCAGAGTTCCCGAAGCACACTCGAATCTcTTCAAGCTTCTCTG
GATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCACATGCTCCACCGcTT
GTGCGgGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGTCTAC
TTAACGCGTTAgTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCCACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACG
GCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCATCTGAGCGTCAGTC
TTTGTCCAGGGGGCCGCCTTCGCCACTGGTATTCCTTCAGATCTCTACGCATTTcACCGCTAC
ACCTGAAATTCTACCCCCCTCTACAAGACTCTAGCCTGCCAGTTTCAAATGCAATTCCGaGGT
TAAGCCCCGGGCTTTCACATCTGACTTAACAGGCCGCCTGCATGCGCTTTACGCCAGTAAT
TtCCGATTAACGCTCGCACCCcTCCGTATTACCGCGGGTtCTgGGaACGGAGTTAGCCGGTGCTTT
TTCT

P11 (708 bp)

CGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCAACATTCTGATTTGCGATTACTAGCGAT
TCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCGCTTTCTGGGATTC
GCTCACTATCGCTAGCTTGCAGCCCTTTGTACGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGCC
GTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCC
TTGAGTTCCCACCATTACGTGCTGGCAACAAAGGACAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTTCTGATTCCCGAA
GGCACTCCCGTATCTCTACAGGATTCCAGACATGTCAAGGCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CATCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAA
CCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAgTCCGGAAGCCACGTCTCAAG
GACACAGCCTCCAAATCGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTTgC
TcCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAgTCTTTGTCCAGGGGGCCGCCTTcGCCACCGGTATTt
CTcCAGATCTCTACGGATTT

P31 (717 bp)

TATAGAATACTCAAGCTATGCATCCaACGCGTTGGGAGCTcTcMcATAtgWCGAMMTGCAGG
CgGCcGCGAATtCACTAGTGATTGARTtTRAWccYgGCTCAgATTGAaCGCTGGCGGCAGGCcTA
ACACATGCaAGTMGAGCGGCAGRGCCTTAACTGAaCCTTCGGGGAACGTTAAGGGCGGCGA
GCgGCGGACGGGTGAGTaATGCCCTGGgAATATgCcCTGATGTgGGGGATAACTATTGGAAAC
GATAGCTAATaccGCATAATCTCTTCGGAGCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTcGCGTCAG
GaTTaGCCCAGGTGGGATTWGCTTGTGGTgAGGTAATgGCTCACCAAGGCAACGATCCCTA
GCTGGTCTGAgAGGATGAiCAGCCACACTGGAAGTgAGACACGGTCCAGACTcCTACGGGAG
GCAGCAGTGGGGAATaTTgCACAATGGGGGAAACCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAA
GAAGGCCTTCgGGTTGTAAAGCACTTTCAGTAGGGAGGAAGGTAGTGTAGTTAACACCTGCA
CTATTTDAMGTTACCTACAGAaGAaGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATAC
GGAGGGTGCgGcTAAATCGGAATTaCTgGGCGTAAAGCGCATGCaGGCGGCCTGTAAAGTC
AGATGTGAAAGCCCCGGTGTCTAACCTCGG

Z1 (1114 bp)

GAGTTTGATCCyGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTyGAGCGGA
AACGAGTTAACTGAACCTTCGGGGAACGTTAACGGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAAT
GCCTGGGAAATTGCCCTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACCGCATAAT
AGCTTCGGCTCAAAGAGGGTGGACCTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATATGCCAGGTGGGAT
TAGCTAGTTGGTGAAGTAAGGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATG
ATCAGCCACACTGGAAGTGAACGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
ccggTTGgCrcAAkGcGGCsCmagCTGatGaCAGmyAcTGaCaCkCrtGtATGcAwgAAGgCsTtcGGGwtGy
AAAcAaGkAcTTtcAGcAgTgAccctGGwAGgTyCAyGCcGTwAAygAtGtCgTAcTtGGAggTTgTGrCsTT
gAGCtgCaGwaGaaGCwytCGgaCTAAcKcCgTkmcAGyAGaCCGCctGGkrAgTACGGagggTcGCrAGm
gTTAAaacTCraatGAATTgACkGGGgCccGyAcAAGCGsaTGsAGcatGTGGTTTraTTmgAgTgCAGyG
yGAAgArCCcggTgTtAaCCTaCksaTTGaCATyyaGAgAaCTTkCcAGAsaTrGAkTvbTgccTTmGaGGaac
tctGaGacaGGTaGctGcATggcTgTcaGtbtAGCtcGtGtGtgAAATGygTaGaGryTcTAAaGgaTwCCCGt
ggCggAAgCGaGCgCaaCCCTTATCCTTGTGGCCAGCGAGTAATGTCGGGAACTCCAGGGAGAC
TGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTA
GGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATAACAGAGGGCAGCCAACTTGCGAAAGTGAGCGAA
TCCCAAAAAGTGCgTCGTAGTCCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCG

Z4 (589 bp)

TGCTTCGGGGGcATCATGGGCGGCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGCCTGGGgATATGCC
CTGATGTGGGGGATAACCATTTGAAACGaTGGCTAATACCGCATAATCTCTTCGGaGCAAAGa
GGGGGACTTCGGGCCTCTCGCGTCAGGATTAGCCCAGGtGGGATTAGCTAGTTGGTGAAGTA
AAGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTTAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGT
CaGACACGGTCCAGACTCCTACGgGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGGGAAAC
CCTGATGCAGCCATGCCGcGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCAGT
GAGGAAGGTGGTGTCTTAATAGCGGcATTGCTTGACGfTAGCTGCAGaAGAAGCACCGGCTA
ACTCCGTGCCAGcAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGfTAATCGGAATTACTKgGCGT
AAAGCGCATGCAGGCGGTCTKKTAAGCAAGaTGTGAAAGCCCgGGCTTWACCTCGCGACTGC
ATTTTGARCTgGCAGACTAGAGTCTTGTaGG

Z10 (680 bp)

CGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGAT
TCCGACTTCACGGAGTCGAGTTGCAGACTCCGATCCGGACTACGACGCACTTTTTGGGATTC
GCTCACTCTCGCAAGTTGGCCGCCCTCTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTC
GTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCGTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCCC
TGGAGTTCCCACCCGAAGTGCTGGCAAACAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTA
ACCCAACATTTCAACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAA
GcACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCA
TCGAATTAACCACATGCTCCACCGcTTGTGCGGGCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATC
TTGCGACCGTACTCCCCAGGcGGTCTACTTAACGCGTTAgTCCGAAAGCCACGGCTCAAGGCC
ACAACCTCCAAGTAGACATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTC
CCACGcTTTCGCATCTGAGTGTCAAGTATCTGTCCAGGGGCCGCCTTCGCCACCGGT

Z16 (759 bp)

CAGTcGcGCGAATGGATtAAGAGCTTgCTCTTAAtGCAGTTAGCGGCGGACGcGTGAGTAACACG
TGGGTAActgCCCATAAGNCTGGGATAACTCCGGGAAACCGAGGCTAATACCGGATAACATT
TtGAACcGCATGGTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTtATGGATGGACCCGCGtCG
CATTAGCTAGTtGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTACCGaCCTgAGAGGGT
GATCgGCCACACTGGGACTGAGtACACGgCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTgATGAAGGCTTTCGGGTC
GTAAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTAC
CTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGC
GTTATCCGgAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAgGTTGTTTCTTAAGTCTGATGTGaaAGCC
CACGGCTCAACCGTGGAGGGGTCATTCgGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAgAG
TGGAATTCCATGTGTAGCGGtGAAATGCGTAGAGATATGGaGGAACACCAAtTgGCGAAGaCGA
CTTCTGTCTGTAACATAACTGAGGCGcGAAAGCTGGGGGAGCAAAcAgGAtTAGATACcCG
GGaGTcCACG

Z17 (630 bp)

CGGGGGGtGCAAGGCCCGGAACGTATTCACCGCaTCATTCTGATAGGCGATTACTAGCGAttC
CGACTtCATGGAGTCGAGtTGCAGACTCCAAtCCGGACTACGAcGCACTttAAGGGAiTCGcTtAC
CCtCGCAGGGTCGCAGCACTCTGGATGcGCCATTGtAGCACGGGTGTAGCCcAcACGTAAGGG
CCATGAtGACTTGACGGCGGCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGtCTCCTTAGaGTTc
CCGACCGAATCGcTGGcAACTAAGGATAGGGGTTGCGcTCGtTGCGGGACTTAACCCAACATC
TcACAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTATCAGAGTTCCCGAAGcACCAAACC
ATCTCTGGTAAGTTCTCTGTATGTCAAGTGTAGGTAAgGTTCTTcGTGTTGCATCGAATAAA
CCACATGCTCCACCGCTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGaGTTTTAACCTTgCGgCCGTA
CTCCCAGGgGGTCTACTTAATGTGTTAGTTTTGAAAAACAAGtCCGAAGcCCCGaGCTTTCTA
GTAGACATcgTTTAcGGCGTGGaCTACCAGGGTATYtAATCCTcTTTCCTCCCAcG

Z18 (842 bp)

GAGTTTGATCcTKGCTCAGATTGAACGCTGGCgGCAGGCCTAACACATGCAAGTYGAGCGGA
AACGAGTTATCTGAACCTTCgGgGAACGATAACgGCGTCGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATG
CCTGGGAAATTGCCCTGATGTKGGGATAACCATTTGAAACGATGGCTAATACcGCATAATA
GCTTCgGCTCAAAGAGGGGGACCTTCKGGCCTCTcGCGTCAGGATATGCCCAGGTGGGATTA
GCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTgGTCTGAGAGGATGATC
AGCCACACTgGAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTgGGGAATATTGC
ACAATGGGCGCAAgCTGGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAaGAAGGCCTTCGGGTTGTA
GTACTTTTCAGCAGTGAGGAAGGTGGTAGTGTAAATAGCACTATCATTgACGTTAGCTGCAG
AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAAT
CGGAATTACTGGGGCGTAAAGCGCATGCAGGTGGTTTTGTTAAGTCAGATGTGAAAGCCCGG
TGCTCAACCTCGGAATWGCATTTGAAACTGGCAGACTAGAGTACTGTAGAGGGGGGGTAGA
ATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGAAGGAATACCgGTGGCGAAGGCGGCC
CCCTGGACAGATACTGACACTCAGATGCGAAAGCGTGGGgGAGCAAACAGGATTAGATACcC
TGGGTAGTCCACGgCCGTAAACGATGTCTACTTGGAGGTT

Z34A (696 bp)

CgGTGTGTGCaGGCccGGGAACgTATTCACCGTGGCATTCTGAtCCACGATTACTAGCGATTccG
ACTTCACGGAGTCGGAGGTTGCAGACTCcGATCcGGACCTACCGAcCGCACCTTTTTGGGATT
cGCTCACTCTcGCAAGTTGGCcGCCCTCTGTATGCgCcATTGTAGcACGtGTGTAGcCCTACTCGT
AAGGGCCaTGATGACTTGACGTCTCCCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCgGCAGTCTCCCTG
GAGTTCCCACCCGAAGTGTGGCAAACAAGGATAAAGGGTTGCGcTCGTTGCGGGACTTAACC
CAACATTTCAACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCAGAGTTCCCGAAGGC
ACCAATCCATCTCTGGAAAGTTCTCTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCAT
CGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTCcGGGCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAATCT
TGCACCGTACTTCCCAGGCGGTCTACTTAACGCGTTAgTTCCGAAAGCCAMGGCTYAAAGG
CACAACCTCCAAGTAGACAtcGTTTAGGCGTGGMfTaCAGGGTATCTAATCTGTTTSTTCCCAG
CTTcGATCTGAGTgTAGTWCTGTCAGGGGgCGCTTCGGCACgGTATTTCTTAGAtCTTTAGGA

Z34C (1399 bp)

GAGTTTGATCTGCTCAAGAGTGAACGCTGGCGGTAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGC
AGCACAGGAGAGCTTGTCTCTGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATACATCGGAAT
CTAChTyTTCGTGGGGGATAACGTAGGGAAACwTACGCTAATAChGCATACGACCTTCGGGT
GAAAGCAGGGGACHyTCGGGCCTTGC CGGATAGATGAGChGATGTCCGATTAGCTAGTTGG
CGGGGTAAAGGCCACmAAGGCGACGATCyGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACAC
TGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGG
GCGCAAGCTGATCCAGCCATACCGGTGGGTGAAGAAGGCyTTCGGGTTGTAAAGCCTTTT
GTTGGGAAAGAAAAGCAGCCAGTTAATACCTGGTTGTTCTGACGGTACCCAAAGAATAAGC
ACCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTACTCGGAATT
ACTTGGCGTAAAGCGTGC GTAGGTGGTTGTTAAGTCTGTTGTGAAAsCCCTGGgCTyAACCT
GGGAATTGCAGTrGATACTkGGCGACTAGAGTGTGGTAGAGGGTAGTGGAAATyCykGGTGTAG
CAGTAAAATGCGTAGAAaGATCArGAGrGACATCCATkGtCGAAGgCAGCTACCTGGgACCAACA
CTGACACTaGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAaCAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACG
CCCTAAACGATGsGmACTkGATGTTGGGTGCAATTTGGCACGCAGTATCGAAACTAACGCGT
TAAGTTCGCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTG
ACATGTGCGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACTCGAACACAGGTGCTGCA
TGGCTGTCTGCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTG
TCCTTAGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGAACCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTACTACA
ATGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAACCCGCGAGGGCAAGCCAATCCCAGAAACCCTATCTCA
GTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGyACACACCG