



## Trabzon (Karadeniz) Deniz Sedimentlerinden Elde Edilen Denizel Aktinomisetlerin Sekonder Metabolit Biyosentez Genlerinin Taranması

Kadriye Özcan\*

Giresun Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü, 28200 Giresun, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

#### Araştırma Makalesi

Geliş 29 Kasım 2016  
Kabul 28 Mart 2017

#### Anahtar Kelimeler:

PCR  
PKS  
NRPS  
Aktinomiset  
Sekonder metabolit

\*Sorumlu Yazar:

E-mail: kadriye.ozcan@giresun.edu.tr

### ÖZET

Bu çalışmada, Trabzon (Karadeniz) deniz sedimentlerinden elde edilen aktinomiset izolatlarının aktif sekonder metabolit üretme kapasitesi moleküler tekniklerle araştırılmıştır. Toplamda 24 aktinomiset, sekonder metabolit biyosentez genleri PKS/NRPS varlığı bakımından PCR tabanlı incelenmiştir. Yapılan PCR sonuçlarına göre Trabzon deniz sedimentlerinden elde edilen aktinomisetlerin %25'i PKS-NRPS gen bölgelerini birlikte, %58'i ise sadece NRPS gen bölgelerini bulundurduğu belirlenmiştir. PCR verileri değerlendirildiğinde izolatların ribozomal olmayan yolla peptid yapıda aktif sekonder metabolit üretim kapasitesinin PKS yolağı ile sekonder metabolit üretme kapasitesinden yüksek olduğu bulunmuştur. Ayrıca aktif sekonder metabolit üretimi için Karadeniz deniz sedimentlerinin yüksek potansiyel barındırdığı belirlenmiştir.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 5(5): 502-506, 2017

### Screening of secondary metabolite biosynthesis genes of marine actinomycetes isolated from Trabzon (Black Sea) sea sediments

### ARTICLE INFO

#### Research Article

Received 29 November 2016  
Accepted 28 March 2017

#### Keywords:

PCR  
PKS  
NRPS  
Actinomycetes  
Secondary metabolite

\*Corresponding Author:

E-mail: kadriye.ozcan@giresun.edu.tr

### ABSTRACT

In this study, active secondary metabolite production capacity of actinomycete isolates obtained from Trabzon (Black Sea) sea sediments was investigated by molecular techniques. Totaly 24 actinomycetes were investigated by PCR based on the presence of secondary metabolite biosynthesis genes PKS / NRPS. According to the PCR results, 25 and 58% of actinomycetes obtained from Trabzon sea sediments were found to contain PKS-NRPS and only NRPS gene regions, respectively. When PCR data were evaluated, it was found that the production of the peptide form active secondary metabolite of the isolates by non-ribosomal way was higher than that of the secondary metabolite production by the PKS pathway. In addition, it has been determined that Black Sea marine sediments have high potential for active secondary metabolite production.

## Giriş

Aktinomisetler, monopodial nadiren de dikotomik dallı, ışınal yapıda koloniler oluşturan ve yavaş büyüme eğiliminde olan G+C içeriği yüksek iplikli bakterilerdir. Çoğu aktinomiset spor oluşturur ve sporlar genelde kullanılan besiyeri üzerinde pudramsı şekilde gözlenirler. Koloni morfolojileri oldukça değişkenlik göstermektedir. Öyle ki petrilere pembe, yeşile, beyazdan siyaha farklı renklerde aktinomiset kolonilerine rastlamak mümkündür. Kullanılan besiyeri ve inkübasyon süresine göre de koloni renkleri değişkenlik göstermektedir (Waksman, 1989). Aktinomisetlerin patojenlere karşı etkileri üzerine yapılan araştırmalarla 1940'dan itibaren sistematik olarak antibiyotik izolasyonları başlamıştır. Aktinomisetler, antibiyotik literatür veritabanında bulunan (ALD) biyoaktif bileşiklerin yarısından fazlasını üretmektedirler (Lazzarini ve ark., 2000). Toprak ekosisteminde aktinomisetlerin çok yaygın olması ve sekonder metabolit üretimi açısından oldukça verimli olmaları sebebiyle, topraktan sekonder metabolit taramaları yoğun bir şekilde günümüze kadar yapılmıştır. Bu nedenle karasal aktinomisetlerden ticari öneme sahip enzim ve terapotik öneme sahip biyoaktif moleküller, antibakteriyel, antifungal, antitümoral vb. birçok biyoaktif madde izole edilmiştir (Solanki ve ark., 2008). Fakat yapılan denemelerde yeni aktif madde bulma ihtimali gittikçe azalmaktadır. Denemeler sıklıkla bilinen metabolitlerin tekrar izolasyonu ile sonuçlanmaktadır (Mincer ve ark., 2005). Araştırmacılar mevcut sorunu, araştırmalarını ekstrem çevreler üzerine kurarak çözmeye çalışmışlardır. İçinde bulunulan ortamın organizmayı farklı metabolit üretimine yönlendirmesi nedeniyle farklı koşullara adapte olan aktinomisetlerden yeni bileşiklerin keşfedilmesi beklenmektedir (Lam, 2006). Bu nedenle özellikle denizel sistemler az çalışılmış olmaları ve farklı çevresel koşulları barındırmaları nedeniyle ilgiyle odaklanılan sistemler haline gelmişlerdir (Bernan ve ark., 1997). Önceleri denizel ortamın yüksek tuz oranı, besin miktarının azlığı gibi etkenler göz önünde bulundurularak aktinomisetlerin denizel ekosistemlerde nadiren buldukları düşünüldüğünden çalışılmaya değer sistemler olarak görülmemişlerdir (MacLeod, 1968). Fakat son dönemlerde yapılan çalışmalarda denizlerde bakteriyel çeşitliliğinin fazla olduğu ve aktinomisetlerin de bu sistemlerde geniş yayılım gösterdikleri yönünde sonuçlar alınmıştır (Bull ve ark., 2005). Denizel kökenli aktinomisetler karasal akrabaları gibi sekonder metabolit üretiminde oldukça üretkendir. Denizel kökenli aktinomisetler literatürde bulunan aktif bileşiklerin aynısını veya benzerini, bazıları ise tamamen farklı yapıda molekülleri üretebilmektedir (Ward ve Goodfellow, 2004).

Sekonder metabolit taramaları genel olarak, kültüre edilmiş organizmaların fermentasyon sıvıları kullanılarak yapılmaktadır. Fakat moleküler teknikler ve genom bilgisi üzerindeki bilgiler arttıkça genetik materyal üzerinden de tarama yapılabilmektedir. Genom üzerinden aktif metabolit taramalarında, PKS (poliketid sentaz) geni kullanılan önemli hedeflerden birisidir. PKS geni multimodüler bir yapıya sahiptir ve bu gende bulunan ketosentaz (KS) domaini filogenetik tanımlamada önemlidir. Çünkü KS domaini oldukça korunmuştur ve bu

bölgeyi hedefleyen dejener primerler ile kriptomik olarak tarama yapılabilmektedir (Gontang ve ark., 2010). Son moleküler araştırmalar, oldukça fazla sayıda kriptomik PKS geninin bulunduğunu göstermiştir. Örneğin; tüm genomu aydınlatılmış *Streptomyces coelicolor*, fonksiyonu bilinmeyen fazla sayıda PKS genlerine sahiptir (Bentley ve ark., 2002).

Genom üzerinden aktif metabolit taramalarında kullanılan diğer önemli hedef gen bölgesi ribozom dışı peptid sentetazdır (NRPS). Bu gen bölgesi ribozom dışı peptidlerin (NRP) üretiminden sorumlu multienzim sentezinden sorumludur. Non ribozomal peptitler yağ asidi sentezine benzer bir mekanizmayla bu kompleks yapı üzerinden sentezlenir (Zinger ve ark., 2011). Bu mekanizma tarafından sentezlendiği belirlenen ilk peptidler Gramisidin S ve tirosidindir (Lipmann ve ark., 1971). Daha sonraki çalışmalarda basil, fungus ve streptomisetlerden elde edilen bazı peptidlerin de bu ribozomal olmayan yolla üretildikleri anlaşılmıştır. Ribozom dışı yolla üretilen peptidlerin ortak özelliği ise antimikrobiyal, antifungal ve immün baskılayıcı etkilerinin olmasıdır (Kleinkauf ve Dohren, 1990; Kleinkauf ve Dohren, 1996). NRPS adenilasyon (A), tiyoesterifikasyon (T), kondensasyon (C) alt birimlerden oluşan enzim kompleksidir (Schwarzer ve ark., 2001). Adenilasyon bölgesi yaklaşık 500 aminoasit içerir ve aminoasitleri tanıyıp aktive eder. Bu nedenle işlevleri ribozomal sistemde aminoasitlerin aminoasıl-tRNA'lar oluşturmak üzere aktive edilmeleri ile kıyaslanabilir. Adenilasyon bölgesinin büyük kısmı çok iyi korunmuş aminoasit dizilerinden oluşur (Weber ve ark., 2000). Ribozom dışı peptidler önemli sekonder metabolit grubunu oluşturmaktadır (Ayuso-Sacido, 2005). Farida ve ark. (2007), antikanserijen etki potansiyeli olan yeni bileşikler bulmayı amaçladıkları çalışmada, öncelikle izolatlar PCR temelli taramış ve fermentasyon sıvısından aktivite tespiti çalışmalarına PKS ve NRPS pozitif izolatlarla devam etmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı Trabzon deniz sedimentlerinden elde edilen denizel aktinomisetlerin aktif sekonder üretme potansiyelinin araştırılması ve biyosentezlerinden sorumlu PKS/NRPS gen bölgelerinin PCR tabanlı tekniklerle taranmasıdır.

## Materyal ve Metot

### *Aktinomisetlerin Hazırlanması ve Genomik DNA İzolasyonu*

Araştırmada Trabzon'dan toplanmış denizel sediment örneklerinden önceki çalışmalarda izole edilmiş ve morfolojik olarak tanımlanmış 24 aktinomiset izolatu kullanılmıştır. Aktinomiset izolatları, Müller Hinton Broth kullanılarak 28°C'de 2 günlük 125 rpm çalkalamalı inkübasyon sonucunda aktive edilmiştir. Elde edilen taze bakteri kültüründen Fast DNA Spin Kit (MP, Biomedicals, Santa Ana, CA) ile DNA izolasyonu yapılmıştır. DNA izolasyonu üretici firma protokolüne uyularak gerçekleştirilmiştir. DNA saflığı %1 agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir.

**PCR Optimizasyonu ve Reaksiyon Koşulları**

Genomik DNA örnekleri ve sekonder metabolit üretiminden sorumlu PKS/NRPS genlerini hedefleyen hedef spesifik dejenere primerler (Tablo 1) kullanılarak PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. PKS ve NRPS gen bölgeleri için birer primer seti kullanılmıştır. PKS tarama için kullanılan primer korunmuş ketosentez (KS) domainine, NRPS için kullanılan primerler de korunmuş adenilasyon (A) domainine spesifik dejenere primerlerdir.

Öncelikle PCR optimizasyonu yapılmış ve uygun koşullar belirlenmiştir. Tüm PCR reaksiyonları 50µl total hacimde, 10 mM 10X PCR tampon, 0,2 mM her forward ve reverse primer (10 pM- Macrogen), 0,4 mM dNTP mix (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 1,25 U *Taq* DNA polimeraz (Promega, GoTaq Hot Start DNA polymerase), 10-20 ng genomik DNA, %10 DMSO (Merck) ve kalan hacim distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

PCR reaksiyonları BIORAD PCR cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve PCR sonuçları %1 agaroz jel kullanılarak kontrol edilmiştir. PKS gen bölgesi için K1F (5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3') ve M6R (5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3') (Ayuso-Sacido, 2005) primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR, 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonla başlamış, 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 58°C'de 2 dakika bağlanma ve 72°C'de 1 dakika 30 saniye uzama döngüsünün 30 kez tekrar etmesi ve 72°C'de 5 dakika sabitleme basamağıyla sonlanmıştır.

NRPS gen bölgesi için ADEdom5' (5'-ACSGGCNNCCSAAGGGCGT-3') ve ADEdom3' (5'-

CTCSGTSGGSCCGTA-3') (Busti, 2006) primerleri ile 2 aşamalı PCR programı kullanılarak reaksiyon gerçekleştirilmiştir. PCR, 94°C'de 5 dakika ön denatürasyonla başlamış, 1. aşamada 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 50°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama basamağının 10 döngü tamamlanmasının ardından 2. aşamaya geçilmiştir. Bu aşama da 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 45 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama basamağının 20 döngü tekrar etmesinin akabinde 72°C'de 5 dakika sabitleme basamağıyla sonlanmıştır.

PCR sonucu iyi bant oluşumu belirlenen K22, PKS ve NRPS PCR ürünü sekanslanmış ve NCBI BLAST analizi sonucunda *Streptomyces sp.* PKS ve NRPS gen dizilerine sırasıyla %98 ve %99 benzerlik gösterdiği tespit edildiğinden PCR taramalarında pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

**Bulgular**

Yapılan PCR taramasında 24 denizel aktinomisetin sekonder metabolit üretiminden sorumlu PKS/NRPS hedef genleri içerme durumları araştırılmıştır (Tablo 2). Beklenen PKS PCR ürünü 1200-1400bp, NRPS PCR ürünü 450bp uzunluğundadır. Elde edilen ampliconlar, daha önce de belirtildiği gibi korunmuş KS ve A domainine aittir. PCR taramalarında 6 izolattın PKS, 20 izolattın NRPS, 6 izolattın PKS ve NRPS genlerini birlikte bulundurduğu, 4 izolattın ise hedef genleri bulundurmadıkları saptanmıştır (Şekil 1 ve Tablo 2).

Tablo 1 PCR taramalarında kullanılan primerler

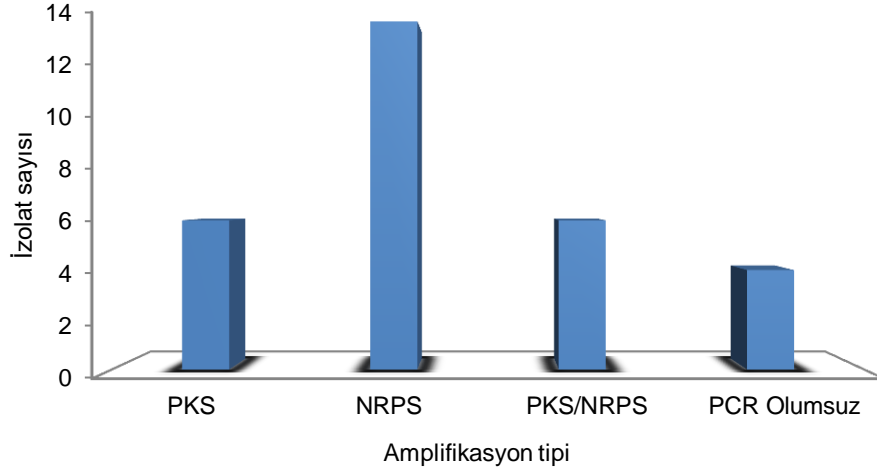
Primer adı	Sekanslar	Hedef Gen	AU	Kaynak
K1F	5'-TSAAGTCSAACATCGGBCA-3'	PKS	1200-1400	Ayuso-Sacido, 2005
M6R	5'-CGCAGGTTSCSGTACCAGTA-3'			
ADEdom5'	5'-ACSGGCNNCCSAAGGGCGT-3'	NRPS	450	Busti, 2006
ADEdom3'	5'-CTCSGTSGGSCCGTA-3'			

AU: Amplicon Uzunluğu (bp)

Tablo 2 İzolatlar ile hedef gen PCR tarama

İzolot kodu	PKS PCR M6R/K1F	NRPS PCR ADEdom5'/3'	İzolot kodu	PKS PCR M6R/K1F	NRPS PCR ADEdom5'/3'
K1		+	K22	+	+
K2		+	K23		+
K3		+	K30	+	+
K4	+	+	K31		
K5		+	K32		+
K7		+	K34		+
K9			K35		+
K11			K42		+
K16	+	+	K43		+
K18	+	+	K44		+
K19	+	+	K46		+
K21		+	K47		

+: beklenen uzunlukta PCR ürünü oluşumu



Şekil 1 İzolatların PCR sonuçları

### Tartışma ve Sonuç

DNA izolasyonu yapılan 24 izolatta PCR ile biyoaktiviteden sorumlu genlerin varlığı araştırılmıştır. Taramada kullanılan hedef genin varlığı sekonder metabolit üretimiyle ilgili bilgi vermektedir (Ketela ve ark., 2002). Tarama için seçilen hedef genler sekonder metabolit üretiminden sorumlu olduğu bilinen PKS ve NRPS gen bölgeleridir (Pathom-aree ve ark., 2006). PCR taramaları için literatürde yaygın kullanılan primerler tercih edilmiştir (Tablo 1). Uygun koşullarda yapılan PCR'larda pozitif kontrol ile aynı uzunlukta ürün elde edilen örnekler taranan gen açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir. İzolatların %25'i PKS-NRPS genlerinin her ikisini taşımaktadır (Şekil 1). Organizmaların %58'i ise sadece NRPS geni taşımaktadır (Tablo 2). NRPS peptid yapıda sekonder metabolit üretiminden sorumlu genlerdir. NRPS pozitif sonuçlar, peptid yapıda molekül üretileceği anlamına gelebilmektedir (Finking ve Marahiel, 2004).

PCR ile hedef gen taramaları organizmaların sekonder metabolit üretme kapasiteleri hakkında bilgi vermekte ve birçok çalışmada aktivite tespiti için tercih edilmektedir. Schneemann ve ark. (2010), izole ettikleri denizel aktinomisetlerden PCR taramaları sonunda %37'sinin NRPS, %13'ünün PKS, %15'inin ikisini birlikte %20'sinin her ikisini de içermediğini bulmuşlardır. Mariana çukurundan alınan sediment örneklerinin incelendiği farklı bir çalışmada, elde edilen 38 aktinomiset izolatu kullanılarak yapılan PCR temelli taramalarda izolatların %68'i NRPS, %3'ü PKS2, %13'ü ise PKS1 ve NRPS pozitif bulunmuştur. Bu çalışma ekstrem derinliklerde de çeşitliliğin olduğunu ve organizmaların sekonder metabolit üretme kapasitesine sahip olduklarını göstermektedir (Pathom-aree ve ark., 2006). Farida ve ark. (2007), antikanserijen etki potansiyeli olan yeni bileşikler bulmayı amaçladıkları çalışmada, öncelikle izolatlar PCR temelli taranmıştır ve 52 denizel aktinomisetin 10'unda PKS1-NRPS, 11'inde NRPS varlığı tespit edilmiştir. Çalışmaya PKS ve NRPS pozitif izolatlarla devam edilmiştir.

PCR ile biyoaktiviteden sorumlu hedef gen taramaları somut olarak bileşik eldesi ile sonuçlanmamaktadır. Fermentasyon temelli araştırmalarda olduğu gibi tarama

sonunda aktif bileşik elde edilmez. Fakat sekonder metabolit üretimi organizmanın genetik yapısıyla bağlantılı olduğundan, organizmanın sekonder metabolit üretme kapasitesi hakkında genel bilgi vermektedir. Ayrıca PCR taramaları, yapılacak ileri çalışmaları yönlendirebilmektedir.

Sonuç olarak araştırılan denizel aktinomiset izolatlarının %83 'ünde PCR ile en az bir adet antibiyotik biyosentezinden sorumlu gen olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle 20 izolat fonksiyonel olarak aktif metabolit üretme kapasitesindedir. Bulunan değer, literatürle karşılaştırıldığında oldukça yüksek bir değerdir. Bu çalışma göstermektedir ki, Karadeniz sedimentlerinden elde edilen aktinomisetlerin sekonder metabolit üretim kapasitesi yüksektir ve genom bazında aktif metabolit üretimi için önemli bir potansiyel barındırmaktadır. Karadeniz deniz sedimentlerinin sahip olduğu bu potansiyel ileri çalışmalarla değerlendirilmeyi beklemektedir.

### Teşekkür

Bu çalışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FEN-BAP-A-200515-87 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

### Kaynaklar

- Ayuso-Sacido A. and Genilloud O. 2005. New PCR primers for the screening of NRPS and PKS-I systems in actinomycetes: detection and distribution of these biosynthetic gene sequences in major taxonomic groups, *Microb. Ecol.* 49:10-24.
- Bentley S D, Chater KF, Cerden AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kiese, T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA. 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, 417: 141-147.

- Bernan S, Greenstein M and Maiese WM. 1997. Marine microorganisms as a source of new natural products, *Adv. Appl. Microbiol.*, 43:57-90.
- Bull AT, Stach JEM, Ward AC and Goodfellow M. 2005. Marine actinobacteria: perspectives, challenges and future directions, *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:65-79.
- Busti E, Monciardini P, Cavetti L, Bamonte R, Lazzarini A, Sosio M and Donadio S. 2006. Antibiotic-producing ability by representatives of newly discovered lineage of actinomycetes, *Microbiology*, 152:675-683.
- Farida Y, Widadaa J and Meiyanto E. 2007. Combination methods for screening marine actinomycetes producing potential compounds as anticancer, *Indonesian Journal of Biotechnology*, 12: 988-997.
- Finking R, Marahiel AM. 2004. Biosynthesis of nonribosomal peptides, *Annu. Rev. Microbiol.*, 28:453-488.
- Gontang E, Gaudêncio S, Fenical W and Jensen P. 2010. Sequence-based analysis of secondary-metabolite biosynthesis in marine actinobacteria, *Appl. Environ. Microbiol.*, 76:2487-2499.
- Ketela MM, Halo L, Manukka E, Hakala J, Mantsala P and Ylihanko K. 2002. Molecular evolution of aromatic polyketides and comparative sequence analysis of polyketide ketosynthase and 16S ribosomal DNA genes from various *Streptomyces* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:4472-4479
- Kleinkauf H and von Dohren HA. 1996. Nonribosomal system of peptide biosynthesis, *Eur. J. Biochem.*, 236:335-351.
- Kleinkauf H. and von Dohren H. 1990. Nonribosomal biosynthesis of peptide antibiotics, *Eur. J. Biochem.*, 192:1-15.
- Lam KS. 2006. Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes, *Current Opinion in Microbiology*, 9:245-51.
- Lazzarini A, Cavaletti L, Toppo G and Marinelli F. 2000. Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics, *Antonie van Leeuwenhoek*, 78:399-405.
- MacLeod RA. 1968. On the role of inorganic ions in the physiology of marine bacteria, VI, In: *Advances in Microbiology of the Sea*, Droop, M.R. and Wood, E.J.F. (Eds.), N.Y.: Academic Press, 95-126.
- Mincer TJ, Jensen PR, Kauffman CA, Maldonado LA, Stach JEM, Pathom W, Ward AC, Bull AT and Goodfellow M. 2005. Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments, *Antonie van Leeuwenhoek*, 87:11-18.
- Pathom-aree W, Nogi Y, Sutcliffe IC, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT and Goodfellow M. 2006. *Dermacoccus abyssi* sp. nov., a piezotolerant actinomycete isolated from the Mariana Trench, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:1233-1237.
- Schneemann I, Nagel K, Kajahn I, Labes A, Wiese J and Imhoff JF. 2010. Comprehensive Investigation of Marine Actinobacteria Associated with the Sponge *Halichondria panicea*, *Applied And Environmental Microbiology*, 76:3702-3714.
- Schwarzer D, Mootz HD and Marahiel MA. 2001. Exploring the impact of different thioesterase domains for the design of hybrid peptide synthetases, *Chem. Biol.*, 8:997-1010.
- Solanki R, Khanna M and Lal R. 2008. Bioactive compounds from marine actinomycetes, *Indian J. Microbiol.*, 48:410-431.
- Waksman AS. 1989. Actinomycetes, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi 89, İZMİR, 328s (Ward and Goodfellow, 2004)
- Weber T, Baumgartner R, Renner C, Marahiel MA and Holak TA. 2000. Solution structure of PCP, a prototype for the peptidyl carrier domains of modular peptide synthetases, *Structure*, 8:407-418.
- Zinger L, Amaral-Zettler LA, Fuhrman JA, Horner-Devine MC, Huse SM, Welch DBM, Martiny JBH, Sogin M, Boetius A and Ramette A. 2011. Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems, *PlosOne*, 9:24570.