

CHARAKTERISIERUNG DES MIKROBIELLEN SYMBIOMS VON BLUTEGELN

Stephanie Michel, Nadine Jork, Christian Rockmann, Markus Grohme, Philipp Franke, Detlef Menzel, Marcus Frohme

Zusammenfassung

Die medizinischen Blutegel, *Hirudo medicinalis* und *Hirudo verbana*, werden wegen ihrer kurativen Wirkung in der Humanmedizin angewandt. Während des Blutsaugens injizieren sie über ihren Speichel eine Vielzahl bioaktiver, derzeit noch unbekannter Moleküle. Eine vollständige Aufklärung aller Inhaltsstoffe mit Wirkmechanismen ist für die Entwicklung von neuen Pharmaka von großem Interesse. Vor diesem Hintergrund wurden verschiedene Organe beider Arten auf ihre Besiedlung durch symbiontische Bakterien untersucht. Dazu wurden die Bakterien zunächst unter geeigneten Bedingungen kultiviert und mittels biochemischer Methoden charakterisiert. Die Identifizierung der Symbionten erfolgte durch Polymerasekettenreaktion (PCR) und Sequenzierung der 16S rDNA. Die biochemischen Tests ergaben, dass die kultivierbaren Bakterien Amylase positiv, Gram negativ und Ornithin Decarboxylase negativ sind. Mit Hilfe von datenbankgestützten Analysen der 16S rDNA-Sequenzen konnte *Aeromonas veronii* biovar *sobria* nachgewiesen werden. Hochdurchsatzsequenzierungen der gesamtgenomischen DNA des Bakteriums aus *H. medicinalis* zeigten deutliche Abweichungen zum Referenzgenom von *Aeromonas veronii* B565.

Abstract

The medical leeches, *Hirudo medicinalis* and *Hirudo verbana*, are increasingly used in human medicine because of their curative effect. During bloodsucking, they inject a variety of bioactive molecules via their saliva of which most are still unknown. The investigation of all contents and their mechanisms of action are of great interest, especially for the development of new pharmaceutical products. Against this background, the colonization of various organs of both species by symbiotic bacteria was examined. For this purpose, the bacteria were cultivated under suitable conditions and characterized using biochemical methods. The identification of the symbionts was carried out by polymerase chain reaction (PCR), supported by sequencing of the 16S rDNA. The biochemical tests indicated that the culturable bacteria are amylase positive, gram negative and ornithine decarboxylase negative. The occurrence of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* could be proved by database analyses of the 16S rDNA. High-throughput sequencing of the genomic DNA showed significant differences from the already known reference genome of *Aeromonas veronii* B565.

» I. EINFÜHRUNG

Der medizinische Blutegel, *Hirudo medicinalis*, wurde bereits in der Antike zum therapeutischen Aderlass eingesetzt. Aufgrund der antikoagulativen, antiinflammatorischen, immunisierenden und analgetischen Wirkung hat sich die Blutegeltherapie vor allem in der Mikrochirurgie, Naturheilkunde sowie für die Behandlung von Thrombosen und Embolien etabliert (Wells et al. 1993: 183). Da *H. medicinalis* in Europa fast ausgestorben ist, werden heutzutage entweder Zuchttiere oder die in Kleinasien lebenden Egel namens *H. verbana* zu therapeutischen Zwecken verwendet. Während des Blutsaugens, aber auch beim Loslassen, injiziert der Egel über seinen Speichel eine Vielzahl von medizinisch nützlichen, bioaktiven Molekülen. Bisher sind nur acht Inhaltsstoffe bekannt. Dazu zählen unter anderem das *Hirudin* und das *Calin*, welche die Koagulation des Blutes hemmen (Zaidi et al. 2011: 437). Für die Anwendung in der Humanmedizin rücken die Blutegel

zunehmend in den arzneimittelrechtlichen Fokus. Seit dem Jahr 2004 sind die Tiere zwar gemäß § 2 Absatz 1 des Arzneimittelgesetzes als Arzneimittel zugelassen, jedoch ist der Egel an sich vergleichsweise schlecht definiert. So verfügen die Tiere über symbiontische Bakterien, welche sich obligat im Verdauungstrakt (*Intestinum*) befinden, wobei die mikrobielle Flora des Blutegels im Vergleich zu anderen Tieren relativ einfach aufgebaut zu sein scheint (Graf et al. 2006: 365). Bisher konnten nur zwei Bakterien, *Aeromonas veronii* biovar *sobria* und Bakterien der Gattung *Rikenella*, im Verdauungstrakt des Egels identifiziert werden (Graf 1999: 1). Neue Erkenntnisse über diese symbiontischen Bakterien könnten die Arzneimittelsicherheit in Hinblick auf eine standardisierte Laboraufzucht verbessern und dazu beitragen, die physiologischen Zusammenhänge im Egel besser zu verstehen. Letzteres ist vor allem für die rekombinante Herstellung von neuen therapeutischen Proteinen von Bedeutung. Die Symbiose zwischen dem Wirt

H. medicinalis und dem Symbionten *A. veronii* biovar *sobria* ist noch weitgehend unverstanden. Es besteht die Annahme, dass der Symbiont den Wirt mit Nährstoffen versorgt (Graf 2010) und dass *Aeromonas* an der Verdauung des aufgenommenen Blutes beteiligt ist, zumal bislang keine an der Verdauung beteiligten Egel-Enzyme nachgewiesen werden konnten. Der Symbiont hingegen ist für seine beta-hämolytischen Fähigkeiten bekannt und könnte die Lyse der Erythrozyten übernehmen (Kozaki et al. 1989: 1782). Untersuchungen ergaben, dass der Wirt wiederum Proteasen ins *Intestinum* absondert, welche die Beta-Hämolyse inhibieren und somit die Speicherung der Erythrozyten ermöglichen (Roters et Zebe 1992: 85). Darüber hinaus zeigten weiterführende Studien, dass *Aeromonas* die Proliferation von nicht symbiontischen Bakterien im Kropf des Wirtes inhibiert (Indergand et Graf 2000: 4735).

Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Charakterisierung symbiontischer

Bakterien aus dem Verdauungstrakt des medizinischen Blutegels *H. medicinalis*. Parallel wurden die symbiotischen Bakterien aus *H. verbana*, welcher ebenfalls zu medizinischen Zwecken eingesetzt wird, extrahiert und bestimmt. Zur Isolierung der Bakterien wurden die Egel zunächst präpariert, der Inhalt des Verdauungstraktes (*Intestinums*) sowie die Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae*) entnommen und auf Stärke-Ampicillin-Agar ausplattiert. Anschließend wurden die Kolonien mithilfe geeigneter biochemischer Methoden, wie Amylase-, Gram- und Decarboxylase-Tests untersucht. Charakteristische Kolonien wurden in Flüssigmedien überführt und die Gesamt-DNA isoliert. Zur eindeutigen Identifizierung der Isolate wurden Amplifikate des 16S rDNA Gens mittels konventioneller Polymerasekettenreaktion (PCR) erstellt (Keller et al. 2010: 755) und sequenziert. Ziel war außerdem eine Hochdurchsatzsequenzierung der gesamtgenomischen DNA.

» II. MATERIAL UND METHODEN

Die Isolierung der symbiotischen Bakterien erfolgte aus *Hirudo medicinalis* und *Hirudo verbana*, welche von der BioRepro GmbH Potsdam bereitgestellt wurden. Dazu wurden Teile der Speicheldrüsen sowie des Verdauungstraktes herauspräpariert, auf Stärke-Ampicillin-Agar (10 g/l Trypton, 1 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l Natriumchlorid, 0,025 g/l Phenolrot, 15 g/l Agar, 10 g/l Stärke, pH 7,4) ausplattiert und über Nacht bei 29 °C inkubiert. Charakteristische Einzelkolonien wurden isoliert, ggf. auf Platte oder in LB-Medium (8 g/l Trypton, 4 g/l Hefe-Extrakt, 8 g/l Natriumchlorid, pH 7,0) weiter kultiviert, um mittels biochemischer und molekularbiologischer Methoden untersucht werden zu können. Zur Bestimmung der Amylaseaktivität wurden Stärke-Ampicillin-Agarplatten mit Bakterienkolonien nach einer Inkubationszeit von drei Wochen bei 4 °C mit Lugolscher Lösung überdeckt, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit Wasser gewaschen.

Die Untersuchung auf Gramverhalten erfolgte, indem 10 µl einer LB-Übernachtskultur auf einen Objektträger überführt und mit 30 µl 3%iger KOH-Lösung suspendiert wurden. Nach einer

Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurde die Viskosität der Suspension mit einer Impföse kontrolliert.

Zur Bestimmung der *Aeromonas* Spezies wurde ein Ornithin-Decarboxylase-Test durchgeführt. Dazu wurden Einzelkolonien von Stärke-Ampicillin-Agarplatten gepickt und in jeweils 4 ml Ornithin-Decarboxylase-Medium (5 g/l Trypton, 3 g/l Hefe-Extrakt, 1 g/l Glukose, 0,02 g/l Bromkresolpurpur, 5 g/l Ornithin, pH 6,3) überführt. Die Reaktionsansätze wurden anschließend mit PlusOne DryStrip Cover Fluid (GE Healthcare) bedeckt und für 24 h bei 29 °C unter Schütteln inkubiert. Die Decarboxylase-Fähigkeit der Bakterien wurde optisch anhand des mitgeführten pH-Indikators Bromkresolpurpur bestimmt.

Zur Extraktion der Gesamt-DNA wurden 2 ml Übernachtskultur für fünf Minuten bei 13000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 500 µl TE-Puffer (50 mM TRIS-HCL, 1 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für fünf Minuten bei 13000 x g wurde das Pellet in 500 µl eiskaltem TES-Puffer (50 mM TRIS-HCL, 100 mM EDTA, 25% Saccharose) resuspendiert und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Lysozym (AppliChem) erfolgte eine Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurden 50 µl 20%iges SDS (Endkonzentration 2%) und 15 µl Proteinase K (AppliChem) zugegeben. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde ein Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (PCI) hinzugegeben, intensiv geschüttelt und für zehn Minuten bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die PCI-Aufreinigung wiederholt. Anschließend wurde ein Volumen Chloroform-Isoamylalkohol zugegeben, intensiv geschüttelt und für zehn Minuten bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA durch Zugabe des 0,7-fachen Volumens Isopropanol gefällt. Nach einer Zentrifugation von 30 Minuten bei 13000 x g und 4 °C wurde das Pellet zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen. Das getrocknete DNA-Pellet wurde mit 30 µl DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentrationsmessung der

DNA erfolgte mithilfe des NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab) durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Des Weiteren wurde der Absorptionsquotient A260/A280 herangezogen, um den Reinheitsgrad der DNA zu bestimmen. Die extrahierte Gesamt-DNA wurde anschließend mittels Gelelektrophorese bei 75 V für 35 Minuten in einem 1% Agarosegel und 1x TAE Puffer aufgetrennt. Das Gel wurde in einer Ethidiumbromidlösung (0,5 µg/ml) gefärbt und unter UV-Licht analysiert.

Die Amplifikation des variablen Bereichs der 16S rDNA wurde mithilfe einer PCR durchgeführt. Die Primer wurden der Publikation von Graf entnommen (Graf 1999: 1). Der Mastermix bestand aus 0,2 mM dNTPs, 0,25 µM des Forward Primers und des Backward Primers, 0,2 U Taq Polymerase (DreamTaq™, Fermentas) und 200 ng Ziel-DNA in einem Volumen von 50 µl 1x Reaktionspuffer (DreamTaq™, Fermentas). Die Amplifikationsbedingungen waren wie folgt: 95 °C für zwei Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 57 °C für 15 s und 72 °C für 30 s. Amplifikate in der Größe von 599bp wurden elektrophoretisch aufgetrennt und detektiert (wie oben beschrieben). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels QIAquick PCR purification kit (Quiagen) aufgereinigt. Dabei wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen und in 30 µl Elutionspuffer eluiert. Die Konzentration und Reinheit der Amplifikate wurden mit dem Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer (Peqlab) bestimmt. Die Sequenzierung der amplifizierten 16S rDNA wurde durch den Anbieter StarSEQ (Mainz) durchgeführt. Diese erfolgte vom 5'-Ende mit Hilfe des Forward-Primers (Graf 1999: 1).

Weiterhin wurden whole-genome-shotgun Sequenzierungen der Bakterien aus *H. medicinalis* mit GS Junior (Roche) und Ion Torrent (Life Technologies) durchgeführt. Für die referenzbasierten Assemblies wurden GS Reference Mapper 2.7 von 454 Life Sciences (<http://454.com/products/analysis-software/index.asp>) sowie MIRA 3.9.4 (Chevreux et al. 2009: 1147) verwendet. Die Reads der 454 und Ion Torrent Sequenzierungen wurden hierbei auf das Referenzgenom *Aeromonas veronii* B565 (Li et al. 2011: 3389) gemappt. Eine *de novo*

Assemblierung erfolgte mit GS De Novo Assembler 2.7 von 454 Life Sciences. Mit der minimus2-Pipeline (<http://sourceforge.net/apps/mediawiki/amos/index.php?title=Minimus2>) des AMOS Paketes wurden die Datensets aus dem Mappingassembly und dem *de novo* Assembly zusammengeführt. Mithilfe des Referenzgenoms wurden die Contigs mit Mauve (Rissman et al. 2009: 2071) sortiert.

» III. ERGEBNISSE

Zur Charakterisierung des mikrobiellen Symbioms in medizinischen Blutegeln

Nach einem Kultivierungszeitraum von drei Wochen bei 4 °C wurden die Bakterien auf ihre Fähigkeiten untersucht, Stärke zu hydrolysieren. Dazu wurden die Stärke-Ampicillin-Agarplatten mit Lugolscher Lösung angefärbt. Anhand der farblosen Zonen, welche sich um die Kolonien bildeten, konnten in den Speicheldrüsen- und Verdauungstraktproben beider Egel Amylase-positive Bakterien nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten alle Bakteriensuspensionen nach der Behandlung mit KOH eine Zunahme in ihrer Viskosität, was auf die Lysierung der Zellwände schließen lässt. Somit konnten alle Isolate als Gram-negativ identifiziert werden.

Zur Bestimmung der *Aeromonas* Spezies wurde ein Ornithin-Decarboxylase-Test im Flüssigmedium durchgeführt. Sind die Bakterien in der Lage, die im Medium enthaltene Glukose zu fermentieren, entsteht ein saures Nebenprodukt, woraus ein Farbumschlag von violett zu gelb resultiert. Besteht die Fähigkeit, Ornithin zu decarboxylieren, werden alkalische Nebenprodukte (Putrescine) gebildet und das Medium bleibt violett gefärbt. Während *A. veronii* biovar *veronii* die Fähigkeit besitzt Ornithin zu decarboxylieren, ist *A. veronii* biovar *sobria* negativ für diese Reaktion. Nach einer Inkubation von 24 h bei 29 °C konnte sowohl bei den isolierten Bakterien aus *H. medicinalis* als auch bei denen aus *H. verbana* ein Farbumschlag von violett nach gelb beobachtet werden. Während sich bei den Kulturen aus *H. verbana* das gesamte Medium verfärbte, ist bei denen aus *H. medicinalis* nur ein Teil des Mediums in gelb umgeschlagen (Abb. 2). Demnach fermentieren die Bakterien beider Egel die im Flüssigmedium enthaltene Glukose. Sie besitzen nicht die Fähigkeit, Ornithin zu decarboxylieren und können demzufolge als *A. veronii* biovar *sobria* identifiziert werden.

Die Gesamt-DNA der Bakterien aus *H. medicinalis* und *H. verbana* wurde mittels Phenol Chloroform Isoamylalkohol und anschließender Isopropanolfällung isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei konnte eine DNA Bande oberhalb der 20000bp nachgewiesen werden, welche hochmolekularer genomischer DNA entspricht. Zudem waren zwei DNA Banden oberhalb von 1500bp und 1000bp zu erkennen,

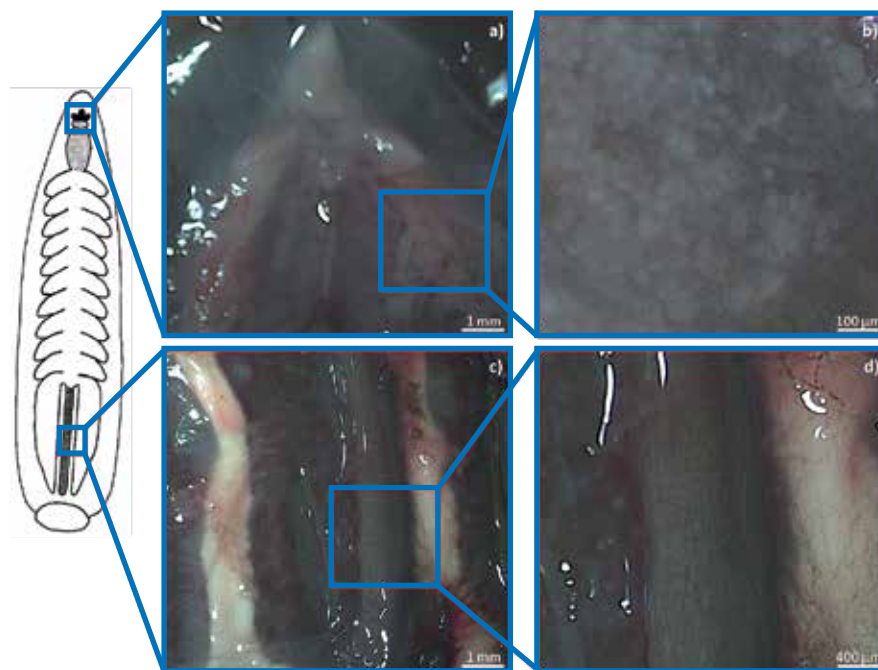


Abb. 1) Ventralschnitt der Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae*) und des Verdauungstraktes (*Intestinum*) von *H. medicinalis*. (*H. verbana* analog) im Schema. Foto links oben: Übersicht der Kieferplatten mit angrenzenden Speicheldrüsen. Foto rechts oben: Speicheldrüsengewebe. Foto links unten: Übersicht Verdauungstrakt mit angrenzender Leibeshöhle (*Peritoneum*). Foto rechts unten: Gefüllter Verdauungstrakt.

wurden aus den Speicheldrüsen und dem Verdauungstrakt von *H. medicinalis* und *H. verbana* Proben entnommen (Abb. 1), auf Stärke-Ampicillin-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 29 °C inkubiert. Bereits nach 12 h konnte sowohl bei den Bakterienausstrichen von *H. medicinalis* als auch bei denen von *H. verbana* ein Wachstum von großen, runden, gelb bis grauweißen Kolonien beobachtet werden. Die vorliegende Ampicillin-Resistenz sowie die phänotypischen Merkmale deuteten auf die Bakteriengattung *Aeromonas* hin (Imzili 2001: 796; Glünder und Reetz 2005: 223).

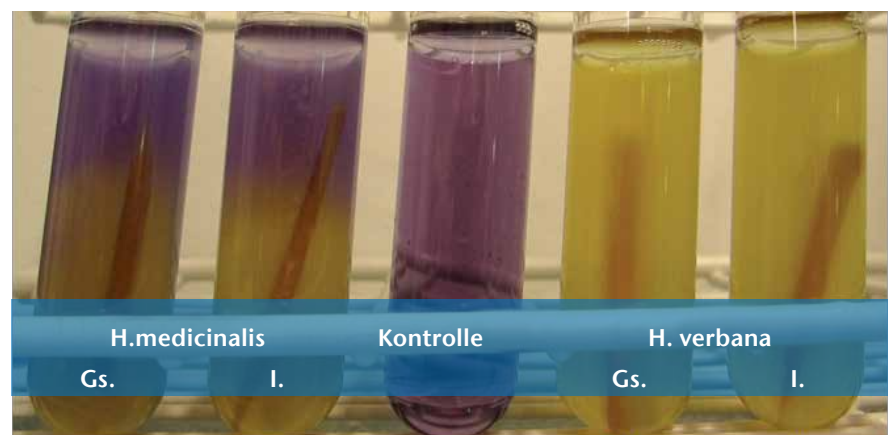


Abb. 2) Ornithin-Decarboxylase Test (Farbumschlag von violett nach gelb). Farbumschlag des Mediums bei Ornithin-Decarboxylase-negativen Bakterien, isoliert aus den Speicheldrüsen (*Glandulae salivariae* = Gs.) bzw. dem Verdauungstrakt (*Intestinum* = I.) von *H. medicinalis* und *H. verbana*.

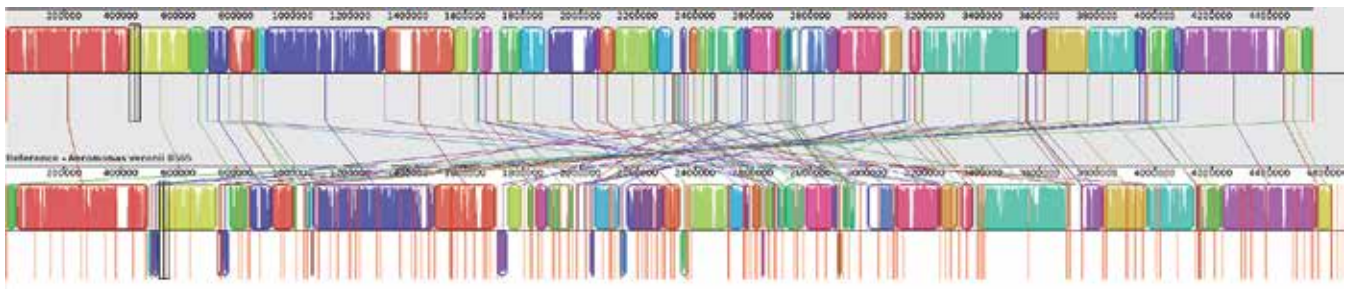


Abb. 3) Sequenzvergleich des publizierten *Aeromonas veronii* Stamm B565 (oben) mit dem Assembly des sequenzierten Bakteriums aus *H. medicinalis*.

welche laut Nawaz et al. charakteristisch für niedermolekulare Plasmid DNA in *A. veronii* sind (Nawaz et al. 2006: 6461). Mithilfe der Sequenzierung der 16S rDNA durch den externen Anbieter StarSEQ (Mainz) konnten alle Amplifikate der Gattung *A. veronii* zugeordnet werden. Anhand der 16S rDNA-Sequenz konnte jedoch nicht zwischen den beiden Subspezies *A. veronii biovar veronii* und *A. veronii biovar sobria* unterschieden werden.

Die referenzbasierten Assemblies mit GS Reference Mapper bzw. MIRA zeigten eine Abdeckung der Referenzsequenz von 81% bzw. 82% (4265 Contigs) aus einem de novo Assembly resultierten 282 Contigs. Das Zusammenführen beider Datensets mit minimus2 reduzierte die Anzahl der Contigs auf 159, welche mit Mauve sortiert wurden (Abb. 3).

» IV. DISKUSSION

Mithilfe biochemischer Methoden konnten Amylase-positive, Gram-negative und Ornithin-Decarboxylase-negative Bakterien in den Speicheldrüsen und dem Verdauungstrakt von *H. medicinalis* und *H. verbana* nachgewiesen werden. Zusammen mit den Ergebnissen der 16S rDNA-Sequenzierung konnte *Aeromonas veronii biovar sobria* als Symbiont identifiziert werden. Auffällig war jedoch, dass die isolierten Bakterien aus *H. verbana* und *H. medicinalis* unterschiedliche Glukose-Fermentationsaktivitäten zeigten. Somit ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den aus beiden Egelarten isolierten Bakterien um unterschiedliche Subspezies des Bakteriums *A. veronii* handeln könnte, obwohl die Ergebnisse der 16S rDNA-Sequenzierung beider Symbionten auf das *A. veronii biovar sobria* hindeuten. Es wäre denkbar, dass sich die Aeromonaden infolge der standardisierten Laboraufzucht differenziert

haben. Wie bereits von Graf et al. beschrieben, scheint die mikrobielle Flora des Blutegels im Vergleich zu anderen Tieren relativ einfach aufgebaut zu sein (Graf et al. 2006: 365). Bisher konnten nur zwei Bakterien, *Aeromonas veronii biovar sobria* und Bakterien der Gattung *Rikenella*, im Verdauungstrakt des Egels identifiziert werden (Graf 1999: 1). Die Ergebnisse der Sequenzierung der Bakterien aus *H. medicinalis* zeigten, dass diese in ihrer Genomsequenz nur zu ca. 80% mit dem publizierten *Aeromonas veronii* Stamm B565 übereinstimmen. Ein gesamtgenomischer Sequenzierungsansatz auf größere Fragmente wird die vorhandenen Lücken in der Sequenz schließen können. Im Vergleich mit dem noch zu analysierenden Genom aus *H. verbana* wird deutlich werden, worin die Unterschiede beider Symbionten hinsichtlich der DNA und biochemischer Ebene bestehen.

LITERATUR

- Chevreur B., Pfisterer T., Drescher B., Driesel A. J., Müller W. E. G., Wetter T., Suhai S. (2004): Using the miraEST Assembler for Reliable and Automated mRNA Transcript Assembly and SNP Detection in Sequenced ESTs. In: *Genome Research*. 2004; 14: 1147-1159.
- Delcher A. L., Phillippy A., Carlton J., Salzberg S.L. (2002): Fast Algorithms for Large-scale Genome Alignment and Comparison. In: *Nucleic Acids Research*. 2002; 30: 2478-2483.
- Glünder G. und Reetz G. (2005): *Aeromonas*-Septikämie. Hrsg. v. Otfried Siegmund u. Ulrich Neumann: Kompendium der Geflügelkrankheiten. Schlütersche Verlag. 2005; 6. Auflage. Kapitel 3, 223.
- Graf J. (1999): Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *sobria* and *Hirudo medicinalis*, the medicinal leech: a novel model for digestive tract associations. In: *Infect. Immun*. 1999; 67: 1-7.
- Graf J., Kikuchi Y., Rio RV. (2006): Leeches and their microbiota: naturally simple symbiosis models. In: *Trends Microbiol*. 2006; 14: 365-371.
- Graf J. (2010): The Digestive-Tract Symbiosis of *Hirudo verbana*, the Medicinal Leech. <http://web.uconn.edu/mcbstaff/graf/AvHm/AvHmmain.htm>.
- Imziln B. (2001): Occurrence and antibiotic resistance of mesophilic *Aeromonas* in three riverine freshwaters of Marrakech, Morocco. In: *Scientific World Journal*. 2001; 1:796-807.
- Indergand S., Graf J. (2000): Ingested Blood Contributes to the Specificity of the Symbiosis of *Aeromonas veronii* biovar *Sobria* and *Hirudo medicinalis*, the Medicinal Leech. *Appl. Environ. Microbiol*. 2000; 66(11): 4735-41.
- Keller P. M., Hombach M., Bloemberg G. V. (2010): 16S-rRNA-Gen-basierte Identifikation bakterieller Infektionen. In: *BIOspectrum*. 2010; 16: 755-758.
- Kozaki S., Asao T., Kamata Y., Sakaguchi G. (1989): Characterization of *Aeromonas sobria* hemolysin by use of monoclonal antibodies against *Aeromonas hydrophila* hemolysins. In: *J. Clin. Microbiol*. 1989; 27(8): 1782-1786.
- Li Y., Liu Y., Zhou Z., Huang H., Ren Y., Zhang Y., Li G., Zhou Z., Wang L. (2011): Complete Genome Sequence of *Aeromonas veronii* Strain B565. In: *Journal of Bacteriology*. 2011; 193: 3389-3390.
- Nawaz M., Sung K., Saeed A., Khan S. A., Khan A. A., Steele R. (2006): Biochemical and Molecular Characterization of Tetracycline-Resistant *Aeromonas veronii* Isolates from Catfish. In: *Appl. Environ. Microbiol*. 2006; 72: 6461-6466.
- Rissman A. I., Mau B., Biehl B. S., Darling A. E., Glasner J. D., Perna N. T. (2009): Reordering contigs of draft genomes using the Mauve aligner. In: *Bioinformatics*. 2009; 25: 2071-2073.
- Roters F. J., Zebe E. (1992): Protease inhibitors in the alimentary tract of the medicinal leech *Hirudo medicinalis*: in vivo and in vitro studies. In: *J. Comp. Physiol*. 1992; B: 85-92.
- Wells M. D., Manktelow R. T., Boyd J. B., Bowen V. (1993): The medical leech: an old treatment revisited. In: *Microsurgery*. 1993; 14: 183-186.
- Zaidi S. M., Jamil S. S., Sultana A., Zaman F., Fuzail M. (2009): Safety and efficacy of leeching therapy for symptomatic knee osteoarthritis using Indian medicinal leech, In: *Indian Journal of Traditional Knowledge*. 2009; 8(3): 437-442.

AUTOREN

Stephanie Michel*

M. Sc. der Biosystemtechnik/Bioinformatik
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
smichel@th-wildau.de

Nadine Jork*

M. Sc. der Biosystemtechnik/Bioinformatik
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
njork@th-wildau.de

Christian Rockmann

M. Sc. der Biosystemtechnik/Bioinformatik
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
crockman@th-wildau.de

Markus Grohme

Diplom-Biologe
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
mgrohme@th-wildau.de

Philipp Franke

M. Sc. der Biosystemtechnik/Bioinformatik
Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
pfranke@th-wildau.de

Detlef Menzel

BioRepro GmbH, Potsdam
detlef.menzel@biorepro.de

Prof. Dr. Marcus Frohme

Molekulare Biotechnologie und Funktionelle Genomik
TH Wildau [FH]
mfrohme@th-wildau.de

* haben in gleichem Umfang zur Arbeit beigetragen