

Das Mikrobiologische Institut der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich¹

5 Genetik von Streptomyceten und Hefen²

Ralf Hütter, ETH Zürich

Die mikrobielle Genetik spielt auch bei der Entwicklung heute klassisch genannter industrieller Verfahren eine wesentliche Rolle. Seit altersher gehören Produkte von Essigsäure- und Milchsäuregärungen sowie Hefeprodukte (alkoholische Getränke, Brot) zu unserem Kulturgut. Zur Herstellung werden Kulturrassen der verschiedenen Mikroorganismen verwendet, die mit Geduld und Erfahrung ausgewählt und entwickelt worden sind, ähnlich wie es bei den Kulturpflanzen der Fall ist. Zu den klassischen Einsatzgebieten der Mikroorganismen sind, besonders seit Mitte dieses Jahrhunderts, weitere Anwendungen gekommen: Herstellung von Aminosäuren, Vitaminen, Antibiotika, Mutterkornalkaloiden, organischen Säuren, Enzymen, Gewinnung von Alkohol als Rohstoff- und Energiequelle, und neuerdings gentechnologisch hergestellte Produkte. Die verwendeten Mikroorganismen waren für die industrielle Mikrobiologie grösstenteils neu. Von den aus der Natur isolierten Wildstämmen mussten Hochleistungsrassen gezüchtet werden.

Die mikrobielle Genetik befindet sich demnach in einem zweifachen Kräftefeld. Einerseits können mit Hilfe von Mikroorganismen, z. Zt. insbesondere Bakterien und Hefen, viele grundlegende Fragen der molekularen Genetik wesentlich leichter bearbeitet werden als mit komplizierten Systemen. Andererseits spielt sie bei der Stammentwicklung industriell genutzter Mikroorganismen eine wesentliche Rolle. Die mikrobielle Genetik ist damit ein typisches Beispiel einer möglichen engen Verflechtung von Grundlagenwissenschaften und anwendungsorientierten Wissenschaften.

Zwei Paradebeispiele für erfolgreiche Stamm- und Prozessentwicklungen sind die Herstellung des Antibiotikums Penicillin G und der Aminosäure L-Lysin. Penicillin kann auch chemisch synthetisiert werden und Lysin kann auch aus verschiedenen natürlichen Materialien extrahiert werden, aber die mikrobielle Herstellung ist effizienter und billiger. Die erreichten Ertragssteigerungen sind in Tab. 1 dargestellt. Sie sind, so schätzt man, etwa zur Hälfte auf eine verbesserte genetische Konstitution der Produktionsstämme zurückzuführen, zur anderen Hälfte auf verbesserte Züchtungsbedingungen (Tab. 1). Bei der genetischen Stammentwicklung wurde im Penicillinprozess fast ausschliesslich das sogenannte «random screening» eingesetzt. Dabei wird eine Zellpopulation des Produktionsstammes mit mutagenen Mitteln behandelt und unter den Überlebenden werden in mühseliger Arbeit höher produzierende Nachkommen ausgewählt. In der Regel bewegen sich die Ertragssteigerungen pro Mutationsrunde um etwa 10%.

Dieses aufwendige Vorgehen war nötig, da man über die genetische Konstitution des *Penicillium chrysogenum*, über die Penicilin-Biosyntheseschritte und über deren Regulation nichts wusste, als man die Entwicklungsarbeiten in Angriff nahm. Günstiger war die Lage beim L-Lysin. Man kannte den Biosyntheseweg und konnte, auf der Basis von früheren Untersuchungen am Modellbakterium *Escherichia coli*, Hypothesen über die Regulation beim verwendeten *Corynebacterium glutamicum* aufstellen. Obwohl man über die genetische Konstitution nur rudimentär Bescheid wusste, gelang es mit relativ wenigen Mutationsschritten einen hochproduzierenden Stamm zu konstruieren.

¹ Quellenangabe: Bulletins der ETH Zürich, Nrn. 191–195 (1985), und Jahresbericht ETHZ 1984.

² Beiträge 1 und 2 siehe Heft 1986/1, Beiträge 3 und 4 siehe Heft 1986/2

Tabelle 1 Zwei Beispiele erfolgreicher Stammentwicklungen bei mikrobiellen Verfahren

Jahr	Ertrag (g/l Kultur- medium)	Bemerkungen
<i>A. Penicillin G</i>		
1929	0.012	A. Fleming findet <i>Penicillium notatum</i> , das Penicillin aber nur in Oberflächenkulturen bildet.
1941	0.060	In Amerika wird von einer schimmigen Melone <i>Penicillium chrysogenum</i> isoliert, das fähig ist, Penicillin in Submerskultur zu bilden.
1945	0.480	} Mutantenstämme, erhalten nach vielen Mutations- und Selektionsschritten
1956	3	
1970	> 10	
heute	~ 50	
<i>B. L-Lysin</i>		
vor 1958	0.1	Wildstämme
1958	12	S. Kinoshita in Japan isoliert Lysin-produzierenden Mutantenstamm von <i>Corynebacterium glutamicum</i>
1970	~ 30	} Mutantenstämme, erhalten nach einigen Mutations- und Selektionsschritten
heute	~ 75	

Es ist heute im Prinzip möglich, für jeden gewünschten mikrobiellen Prozess eine vergleichbare Stammentwicklung durchzuführen. Allerdings sind der zeitliche und personelle Aufwand nach wie vor beträchtlich. Dafür sind besonders zwei Faktoren massgebend. Einerseits kennen wir die genetischen Eigenschaften der meisten Mikroorganismen nicht oder nur ungenügend, und dies gilt besonders für die vielen verschiedenen, industriell eingesetzten Mikroorganismen. Andererseits wissen wir zu Beginn der Entwicklungsarbeiten nichts oder nur wenig über die Biosyntheseschritte, die zum gewünschten Produkt führen, und über deren Regulation. An Modellbeispielen bearbeiten wir diese beiden Fragestellungen: zwei davon seien zur Illustration herausgegriffen.

Streptomyceten, vielseitige Antibioticabildner

Die weitaus meisten, heute bekannten Antibiotica stammen aus einer speziellen Bakteriengruppe, den Streptomyceten (Tab. 2). Dies gilt z. B. für die Wirkstoffe Streptomycin, Erythromycin, Tetrazyklin, Rifamycin. Streptomyceten gehören zu den Actinomyceten («Strahlenpilze», weil man bis

Tabelle 2 Produzenten von Antibiotica (Stand 1980)

Organismengruppe	Anzahl beschriebener Antibiotica (%)
Bakterien	
Actinomyceten, insb. <i>Streptomyces</i>	2078 (63.7)
übrige Bakterien	361 (11.1)
Pilze	
Penicillien und Verwandte	242 (7.4)
übrige Pilze	530 (16.3)
Andere Mikroorganismen	ca. 50 (1.5)

ca. 1950 glaubte, es handle sich um Pilze und nicht um Bakterien). Actinomyceten zeichnen sich aus durch die Fähigkeit, echt verzweigte Zellen und Mycelien zu bilden, was sonst typisch ist für echte Pilze, aber bei Bakterien nur sehr selten auftritt. Innerhalb der Actinomyceten zeichnet sich die Gattung *Streptomyces* durch Bildung von Ketten von Luftmycelsporen aus (Bild 1), andere Gattungen bilden Sporangien, beides Strukturen, die man sonst nur bei Pilzen antrifft. Für die Evolutionsforschung ist diese parallele morphologische Entwicklung zweier sonst sehr verschiedener Organismengruppen (mycelbildende, differenzierende Pilze und mycelbildende, differenzierende Bakterien) interessant. Streptomycceten, und andere Actinomyceten, treten im Boden verbreitet auf und spielen die Hauptrolle bei der Ausbildung des typischen «Erdgeruchs».

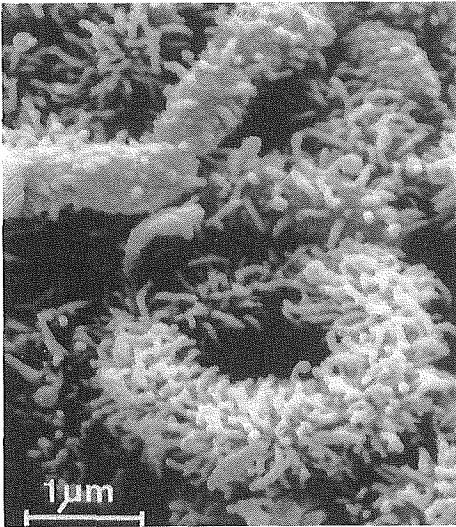


Bild 1 Elektronenmikroskopische Aufnahme von Luftmycelsporen des Bakteriums *Streptomyces glaucescens*. Die wurstförmigen Sporen sind mit dicken Haaren besetzt. Rasterelektronenmikroskopaufnahme von D. Studer, Mikrobiologisches Institut und EM-Service Labor ETH-Zentrum.

Bis Mitte dieses Jahrhunderts wurden Actinomyceten, mit Ausnahme einiger schädlicher Arten, nur wenig bearbeitet. Aufsehen erregte aber 1882 die Entdeckung des Tuberkuloseerregers, *Mycobacterium tuberculosis*, durch Robert Koch; weniger beachtet wurde die Identifizierung des Lepraerregers, *Mycobacterium leprae*, durch Hansen 1873. Erst nach 1944 erlangten die Actinomyceten, im speziellen die Untergruppe der Streptomycceten, grosse Bedeutung: S. A. Waksman, ein Bodenmikrobiologe, entdeckte das Streptomycin, das die medikamentöse Behandlung der Lungentuberkulose bedeutend verbesserte. Eine intensive Suche nach neuen Antibiotica und Wirkstoffen aus Streptomycceten setzte ein. Sie geht heute noch weiter.

Streptomycceten besitzen einige bemerkenswerte genetische Eigenschaften. Die DNA weist einen ausnehmend hohen G+C-Gehalt von 72–74% auf. Dieser hohe G+C-Gehalt wird durch zwei Massnahmen erreicht. Einerseits ist in den kodierenden Regionen die Basenverteilung in den Triplets derart, dass die 3. Position zu über 90% von G oder C besetzt ist (Tab. 3). Andererseits finden sich in- und ausserhalb der kodierenden Regionen ununterbrochene G+C-Ansammlungen von bis zu 30 Basenpaaren. Welche Vorteile diese ungewöhnliche Basenverteilung dem Organismus bringt, ist unbekannt. Für molekulargenetische Arbeiten hat sie aber den Vorteil, dass damit proteinkodierende von nichtkodierenden Regionen unterschieden werden können.

Als zweite bemerkenswerte Eigenschaft fällt auf, dass viele Streptomycceten neben dem Chromosom noch extrachromosomale genetische Elemente besitzen, sogenannte Plasmide (Bild 2). Für die meisten Streptomyccetenplasmide kennen wir die Funktion nicht. Bei manchen wissen wir jedoch, dass es sich um «Fertilitätsfaktoren» handelt, die den Austausch von genetischem Material zwischen verschiedenen Streptomycceten fördern. Mehrere dieser Plasmide wurden zu Vektoren für die DNA-Technologie entwickelt.

Tabelle 3 Ungewöhnliche Guanin (G) plus Cytosin (C)-Zusammensetzung von Streptomyceten-genen. Angegeben sind die G+C-Prozente innerhalb der offenen Leseraster von Protein-kodierenden Genen.

Organismus und Gene	Position in Triplet			Durchschnittlicher G+C-Gehalt der DNA
	1	2	3	
Streptomyceten (Durchschn. versch. Gene)	67	47	91	68
<i>Streptomyces glaucescens</i> MELC-Gen	66.3	51.3	97.1	71.4
<i>Escherichia coli</i> (als Vergleich; Durchschnitt)	62	39	56	52

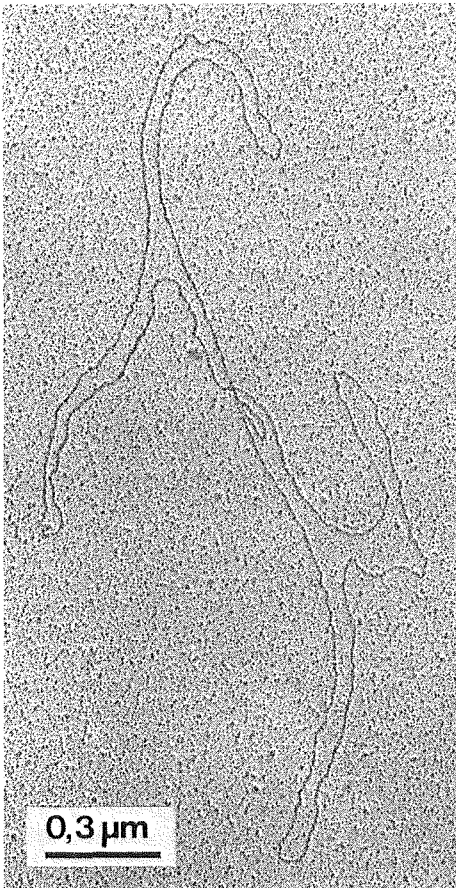


Bild 2 Das extrachromosomale Element pMEA100 aus der Rifamycin-produzierenden *Nocardia mediterranei*. Es handelt sich um ein DNA-Molekül von ca. 23.7 Kilobasenpaaren (ca. 8.06 μm), das sowohl frei als auch ins Chromosom integriert vorkommen kann. Gezeigt ist die freie, zirkuläre Form. Das Plasmid wurde von P. Moretti charakterisiert. Elektronenmikroskopische Aufnahme D. Studer, Mikrobiologisches Institut und EM-Service Labor ETH-Zentrum.

Eine dritte interessante Eigenschaft betrifft die Antibioticabildung. Die bisherigen Analysen deuten darauf hin, dass die Gene, die für Antibioticabiosyntheseenzyme kodieren, auf dem Chromosom nebeneinander liegen und vielleicht sogar in einem Operon vereinigt sind, und dass häufig Resistenzgene, welche den Produzentenstamm gegen sein eigenes Antibioticum schützen, unmittelbar benachbart liegen. Dadurch wird das Klonieren ganzer Biosynthesewege für Antibiotica und damit deren molekulargenetische Analyse und Manipulation stark erleichtert. Es liegen bis jetzt jedoch noch keine vollständigen DNA-Sequenzen von Antibioticabiosynthesegen-Regionen vor. Hingegen ist bei uns das regulierbare MEL-Operon aus *Streptomyces glaucescens* kloniert und teilweise charakterisiert worden (Bild 3). Die DNA-Sequenz wurde am Biochemischen Institut der Universität Zürich (Herr M. Huber, Arbeitsgruppe PD Dr. K. Lerch) ermittelt. Das MEL-Operon enthält u. a. das Tyrosinase-Strukturgen MELC; die Tyrosinase katalysiert eine Oxidation von Tyrosin, was in der Bildung von schwarzbraunen Pigmenten, sogenannten Melaninen, resultiert.

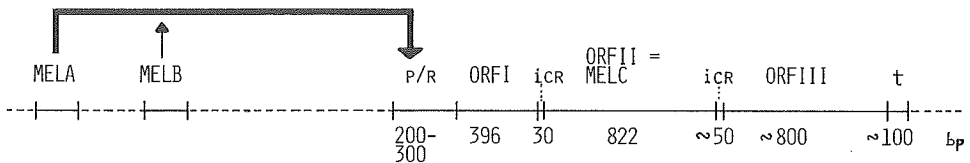


Bild 3 Schematische Darstellung des MEL-Operon von *Streptomyces glaucescens* und Modell für dessen Regulation.

Das MEL-Operon umfasst 3 Gene. Vom mittleren Gen (ORFII = MELC) kennen wir die Funktion (Tyrosinase), für die anderen beiden Gene ORFI und ORFIII nicht (ORF = open reading frame; offene Leseraster). Das Regulationsgen MELA kodiert für ein Genprodukt, das direkt mit der Promotor-/Regulator-Region *p/r* interagiert; das MELB-Produkt moduliert die Aktivität des MELA-Produktes. *icr* bezeichnet intercistronische (intergene) Regionen ohne proteinkodierende Funktion. *t* steht für Terminatorregion. Die Zahlen bezeichnen die Grösse der Genomabschnitte in Basenpaaren (bp). Das Operon wurde von G. Hintermann kloniert und charakterisiert.

Als vierte interessante Eigenschaft sei die «genetische Instabilität» erwähnt. Beim Vergleich von Einzelnachkommen fast aller Streptomycceten frappt die Vielfalt an Kolonietypen, Koloniefarben und in der Ausprägung anderer Eigenschaften wie Antibioticaresistenz oder Antibioticabildung. Ein wesentlicher Teil dieser Veränderungen ist auf Änderungen im Genom zurückzuführen. Für manche Eigenschaften sind bis zu 1% der Nachkommen verändert, ein Wert der etwa 10000 Mal höher liegt als die übliche spontane Mutantenhäufigkeit.

Am Genom können zwei hauptsächliche Umstellungen beobachtet werden: gewisse DNA-Abschnitte gehen verloren und Deletionen von > 100 kb (kb = Kilobasenpaare; 1 kb entspricht ca. 1 Gen) werden beobachtet. Andere DNA-Abschnitte werden bis zu 500fach kopiert (Bild 4). Die Kopien liegen benachbart vor. Es ist Ziel unserer Arbeit festzustellen, welche molekularen Mechanismen diese Genomumstellungen bewirken, wie die «genetische Instabilität» reduziert oder vermieden werden kann (was u. a. für die Aufrechterhaltung von Hochleistungsstämmen wichtig ist), und ob hoch amplifizierbare DNA-Regionen benützt werden können, um Fremdgene einzubauen und zu amplifizieren.

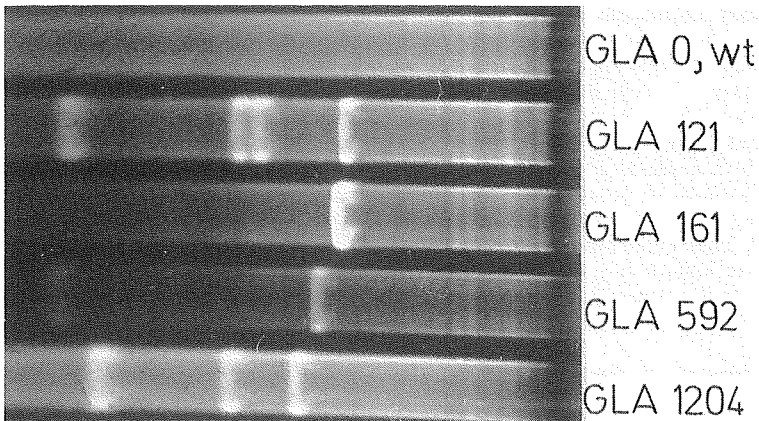


Bild 4 Hochamplifizierte DNA-Sektoren im Genom von *Streptomyces glaucescens*-Stämmen. DNA aus dem Wildtyp und aus Mutantenstämmen wird extrahiert und mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut, so dass definierte DNA-Bruchstücke entstehen. Diese DNA-Bruchstückmischung (2000–5000 Bruchstücke pro Genom) wird auf Agarosegelen elektrophoretisch nach Grösse aufgetrennt. Nach der Trennung wird mit Ethidiumbromid angefärbt. Wo wenig DNA vorkommt, leuchtet das Gel nur schwach, in Regionen mit vielen DNA-Bruchstücken gleicher Grösse sind starke helle Banden sichtbar. Die Figur zeigt *Bam*HI-verdaute DNA vom Wildtypstamm GLA0 und von vier Mutantenstämmen GLA121, GLA161, GLA592 und GLA1204. Grösse der markanten Banden in kb (von rechts nach links in GLA121 3.6 2.4 2.2 und 0.9, in GLA161 3.4, in GLA592 3.0 und 0.8 (schwach), in GLA1204 2.8 2.0 und 1.0 (Doppelbande). kb = Kilobasenpaare.

Hefen, auch begehrte Objekte der Grundlagenforschung

Viele Grundlagen der Molekulargenetik sind am Bakterium *Escherichia coli* erarbeitet worden. Der Sprung von den Bakterien zu den uns näher stehenden Warmblüter- und Pflanzenzellen war in mancher Hinsicht zu gross. Man suchte daher nach einem einfacheren Modellsystem für «höhere» eukaryontische Zellen. Das fand man in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. An geeigneten Laborstämmen dieser Hefe konnten viele Fragen der Organisation und Regulation eukaryontischer Genome bearbeitet werden, und der Organismus wurde rechtzeitig für gentechnologische Anwendungen entwickelt.

Hefen sind Pilze, die nicht in Form von Myzelien wachsen, sondern meist als Einzelzellen. Ihre Züchtung und genetische Manipulation im Labor haben viel gemeinsam mit den Techniken der Bakteriengenetik. Die meisten Laborhefen sind haploid (besitzen nur einen Chromosomensatz), so dass sich leicht Mutanten isolieren und analysieren lassen. Kulturrassen scheinen meist diploid, aneuploid oder polyploid zu sein (mit zwei Chromosomensätzen; mit einem oder mehreren zusätzlichen, unvollständigen Chromosomensätzen; mehrere vollständige Chromosomensätze), was die genetische Arbeit beträchtlich erschwert. Dies gilt zumindest für die bei uns verwendeten Stämme der Brau- und Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Wir verwenden den Organismus zum Studium der Regulation des Aminosäurestoffwechsels, mit Schwergewicht auf der Tryptophanbiosynthese. Die fünf Strukturgene für die Tryptophanbiosyntheseenzyme liegen über verschiedene Chromosomen verstreut vor. Reguliert wird die Tryptophanbiosynthese und -akkumulation vor allem durch drei Mechanismen: Verfügbarkeit von Vorstufen, Einschleusen der Vorstufe Chorisminsäure in den eigentlichen Tryptophanbiosyntheseweg durch die Anthranilatsynthase, und Abbau von überschüssigem Endprodukt. Die Synthese der Enzyme ist nur einer schwachen, aber biologisch trotzdem bedeutsamen Regulation unter-

worfen. Ein System, das wir «allgemeine Kontrolle der Aminosäurebiosynthese» nennen, gestattet Anpassungen in den Enzymniveaus innerhalb einer Bandbreite von ca. 3. Diese im Vergleich zu Bakterien mit ihren spezifischen Regulationen geringe Schwankung genügt aber der Hefe, um sich rasch an veränderte Nährstoffbedingungen anzupassen. Analoge Regulationen im Aminosäurestoffwechsel wurden in allen untersuchten Hefen und Pilzen festgestellt. Wir interessieren uns für den molekularen Mechanismus der Kontrolle der Aminosäurebiosynthese. Welche Regulationsgene sind daran beteiligt, wie sehen sie aus und wie wirken sie? Wie sind die Regulationsregionen aufgebaut, die den Strukturgenen vorgeschaltet sind? Zu diesem Zweck sind die fünf Strukturgene kloniert worden (zwei wurden in den USA kloniert, drei bei uns). Sequenz- und Funktionsanalysen sind bei zwei Genen durchgeführt worden. Zur Zeit arbeiten wir an der Isolierung von Regulationsgenen.

Neben diesen molekulargenetischen Arbeiten versuchen wir auch festzustellen, wieweit Hefe fähig ist, die Aminosäure L-Tryptophan zu akkumulieren und ins Medium auszuschütten. Welche Manipulationen sind nötig, um den Fluss durch den Tryptophanweg zu maximalisieren? Zuerst wurden in der haploiden Hefe vier Mutationen eingeführt (Bild 5), welche die Synthese steigern und den Abbau von akkumuliertem Tryptophan reduzieren. In derartigen Stämmen werden ca. $\frac{2}{3}$ der möglichen maximalen Synthesekapazität, welche durch die Niveaus und Umsatzraten der Enzyme bestimmt wird, ausgeschöpft. Um eine weitere Steigerung zu erreichen, müssen die Enzymniveaus signifikant erhöht werden. Dies kann durch Anheben der Gendosis erreicht werden, denn im angestrebten Bereich ist die Gendosis proportional der Enzymdosis. Durch Vereinigung der fünf einzel klonierten Strukturgene TRP1 bis TRP5 auf einem Multicopy-Vektor (Bild 6) gelingt es, in einer haploiden Hefe die Gendosis um einen Faktor 10 zu erhöhen. Dadurch wird die Leistungsfähigkeit der Hefe zur Tryptophanakkumulation beträchtlich gesteigert (Tab. 4).

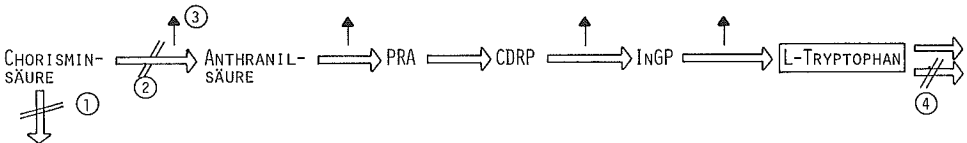


Bild 5 Tryptophanbiosynthese bei *Saccharomyces cerevisiae* und Mutationen, welche die Synthese und Akkumulation von L-Tryptophan beeinflussen. \Rightarrow bezeichnen Enzyme für die fünf Biosyntheseschritte und für Konkurrenzreaktionen. Die vier Mutationen betreffen ① Ausschalten der Konkurrenzreaktion Chorismat-Mutase, ② Ausschalten der Rückkoppelungshemmung der Anthranilatsynthese, ③ Erhöhung der Enzymniveaus 1, 2, 4 und 5 um einen Faktor 3 durch Einführen einer Regulationsmutation, ④ Ausschalten einer der beiden Aminotransferasen, welche einen starken Abbau des akkumulierten L-Tryptophans bewirkt.

Tabelle 4 Einfluss der Gendosis auf Enzymniveauus und Endproduktakkumulationsrate. Angegeben sind als Beispiele die Aktivität des ersten und des letzten Enzyms der Tryptophanbiosynthese (Anthranilatsynthese und Tryptophansynthase) sowie die Rate der Tryptophanakkumulation im Wildtyp und in einem Mutantenstamm mit dem Plasmid pME554 (vgl. Fig. F) und einem Defekt im allgemeinen Aminosäurebiosynthese-Kontrollsystem (*gcd*).

Stamm	Enzymniveaus (nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)		Tryptophan-Akkumulationsrate (nmol min ⁻¹ mg Protein ⁻¹)
	Anthranilat-Synthase	Tryptophan-Synthase	
X2180-1A, Wildtyp	1.42	3.82	0.19
RH1075 <i>gcd</i> (pME554)	56.23	133.7	4.76

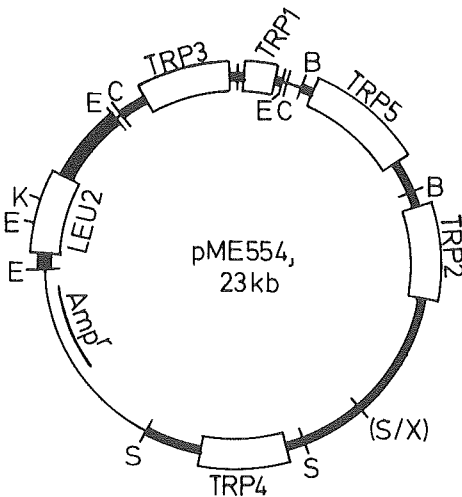


Bild 6 Zusammengesetztes Plasmid pME554 mit den fünf *TRP*-Strukturgenen von *Saccharomyces cerevisiae*. □ klonierte Hefe-DNA-Fragmente mit Tryptophan-Biosynthesegenen *TRP1* bis *TRP5* und dem *LEU2*-Gen. ■ chromosomale Hefe-DNA ausserhalb der angegebenen Strukturgene und Teile der extrachromosomalen 2 μ m-DNA aus Hefe. — Sequenzen des *E. coli*-Vektors pBR322 mit dem Ampicillin-Resistenzgen *Amp^r*. B, C, E, S und X bezeichnen Restriktionsstellen für *Bam*HI, *Cla* I, *Eco*RI, *Sal* I und *Xho* I. Die Konstruktion wurde von P. Niederberger ausgeführt.

Bei einzeln klonierten Genen kann eine Gendosis von > 30 erreicht werden. Dies gestattet in Verbindung mit Regulationsmutationen die gebildete Menge eines gewünschten Enzyms ca. 100fach zu steigern. Da viele Enzyme in den Wildtypzellen nur in geringen Mengen vorliegen ($\ll 1$ Promille der Gesamtproteine) ist eine derartige Steigerung des relativen Anteils eines Enzyms am Gesamtprotein auf $> 1\%$ für Enzymreinigung und -charakterisierung sehr nützlich.

Das konstruierte Plasmid pME554 kann auch im Bakterium *Escherichia coli* vermehrt werden. Bemerkenswerterweise vermag es dort alle Funktionen der Tryptophanbiosynthese zu übernehmen. Das bedeutet, dass alle fünf Hefegene auch im Bakterium abgelesen werden, dass die Ableitung ziemlich korrekt sein muss und dass die Hefe-Enzyme ihre katalytische Aktivität auch im Bakterium entfalten können. Die Enzymniveaus, welche mit den Hefegenen in *E. coli* erreicht werden, liegen, mit einer Ausnahme, im gleichen Bereich, wie dies für die *E. coli*-Gene selbst der Fall ist. Der Befund, dass eine ganze Biosynthesekette aus einem eukaryontischen Organismus in einer prokaryontischen Zelle ohne spezielle Konstruktionshilfsmittel befriedigend funktionieren kann, eröffnet interessante Möglichkeiten für die Evolutionsforschung von Genen und Enzymen und für den horizontalen Gentransfer.