

Taxonomie

Genomik: Grundlage zum Verständnis des Erfolgs von *Roseobacter*-Gruppe

SONJA VOGET¹, MARKUS GÖKER², THORSTEN BRINKHOFF³

¹INSTITUT FÜR MIKROBIOLOGIE UND GENETIK, UNIVERSITÄT GÖTTINGEN

²LEIBNIZ-INSTITUT DSMZ – DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN, BRAUNSCHWEIG

³INSTITUT FÜR CHEMIE UND BIOLOGIE DES MEERES (ICBM), UNIVERSITÄT OLDENBURG

The *Roseobacter* group appears to be one of the most important groups of marine bacteria, present in high abundance in various habitats. During the last 25 years a multitude of strains affiliated with this group and showing very different physiological features was obtained. The characteristics of the isolates reflect their adaptations to different ecological niches. Analysis of a constantly increasing number of *Roseobacter* genomes indicates an adaptive structure and at least partially explains the success of this bacterial group.

10.1007/s12268-014-0441-2
© Springer-Verlag 2014

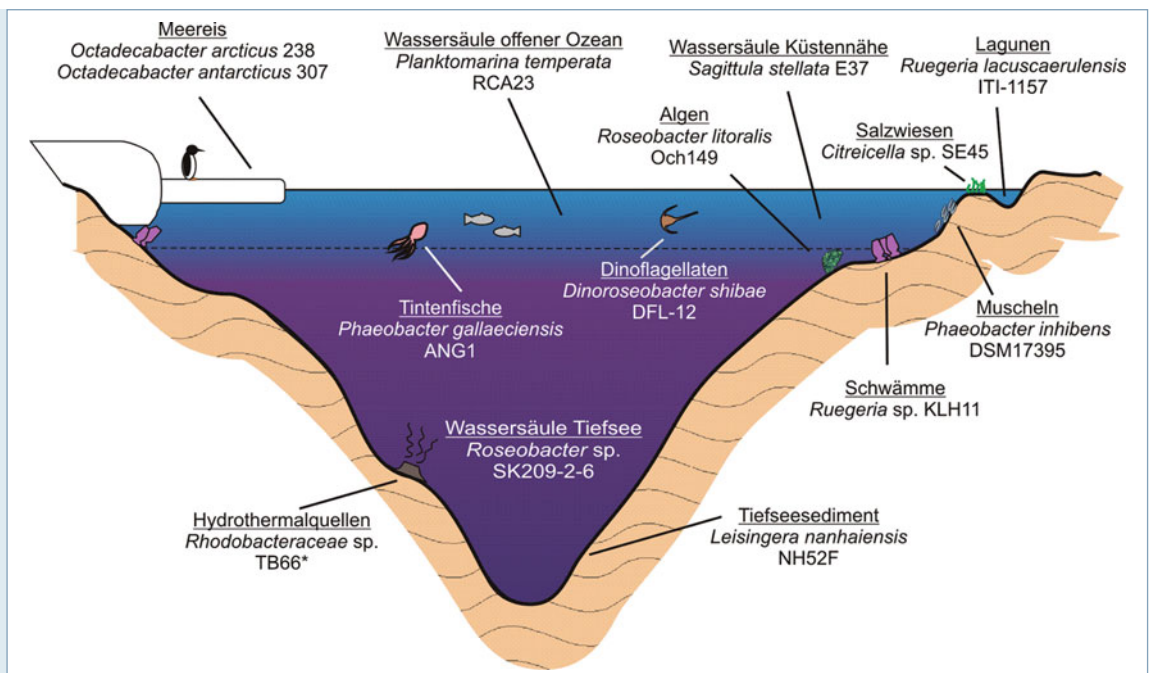
■ Bakterien der *Roseobacter*-Gruppe gehören zu den Alphaproteobakterien (Familie Rhodobacteraceae) und spielen weltweit eine bedeutende Rolle in vielen marinen Habitaten. Es gibt zahlreiche unterschiedliche Ver-

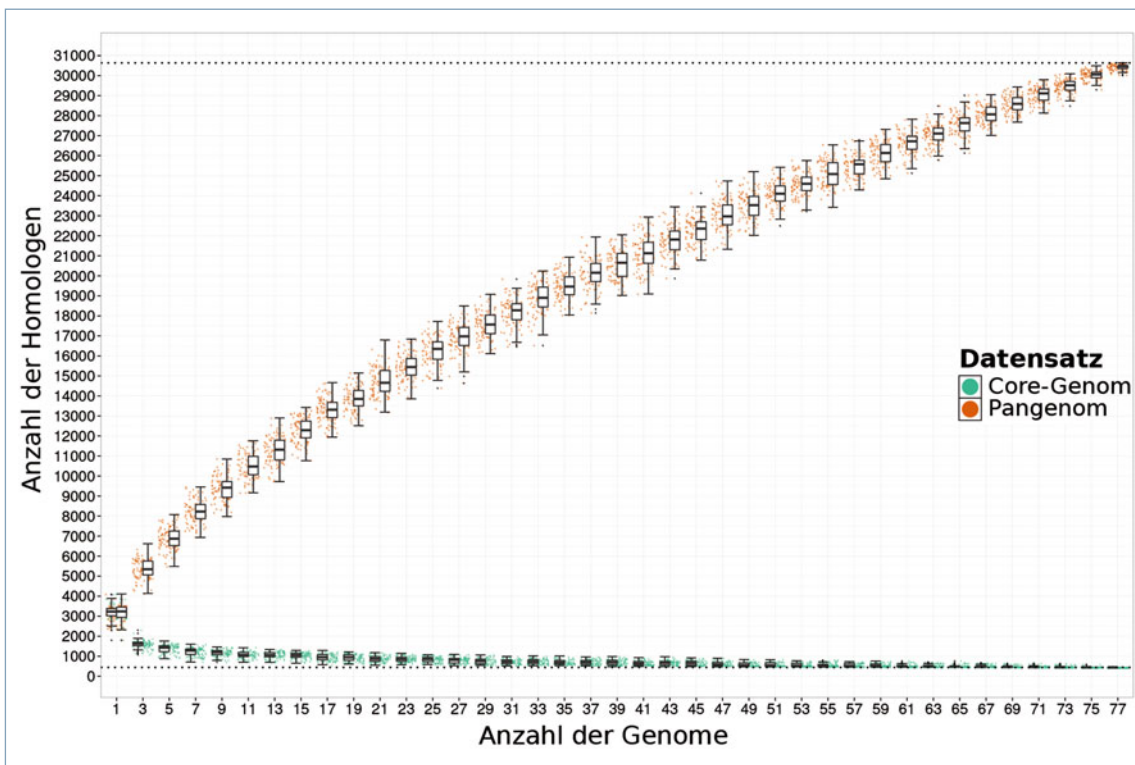
treter, die sich an die verschiedensten Bedingungen angepasst haben (Abb. 1), z. B. an das Leben auf Oberflächen und in Biofilmen, häufig assoziiert mit höheren Organismen, aber auch frei lebend im Pelagial, wo sie oft

Anteile bis über 20 Prozent der Bakteriengemeinschaft aufweisen [1]. Neben einigen bisher nicht oder nur schwer kultivierbaren Untergruppen gibt es eine Vielzahl von Isolat, die für physiologische Charakterisierungen und verschiedenste Studien genutzt wurden. Daher lässt sich schlussfolgern, dass der Erfolg der Gruppe u. a. durch ihre hohe metabolische Vielfalt zu erklären ist. Eine ständig steigende Zahl an beschriebenen Gattungen reflektiert die physiologische und genetische Diversität der *Roseobacter*-Gruppe.

Während alle Vertreter dieser Gruppe heterotroph wachsen und eine Vielzahl von organischen Verbindungen verwerten können, nutzen einige zusätzlich andere Wege der Energiegewinnung, das heißt sie betreiben Photoheterotrophie (durch aerobe, anoxygene Photosynthese) oder Lithoheterotrophie (durch die Oxidation von Kohlenstoffmonoxid oder reduzierten Schwefelverbindungen). Darüber hinaus produzieren manche *Roseobacter*-Vertreter eine Reihe von Sekundärstoffen. Vermutlich am intensivsten unter-

► **Abb. 1:** Vorkommen unterschiedlicher Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe in marinen Habitaten. Es wird deutlich, dass eine Vielzahl von Lebensräumen erschlossen wurde, vom Sediment über den freien Ozean bis hin zur Besiedlung verschiedener Oberflächen und Organismen. Es sind überwiegend Vertreter aufgeführt, deren Genom bereits sequenziert wurde. Organismen, deren Genome noch nicht sequenziert wurden, sind mit einem Stern markiert.





◀ **Abb. 2:** Analyse von Core-Genom und Pangenom basierend auf 78 Rhodobacteraceae-Genomen. Während sich das Core-Genom einer Sättigung bei ca. 400 verschiedenen homologen Genen annähert, zeigt die Erfassung des Pangenoms noch keinen Hinweis auf einen Abschluss.

sucht wurde die antibiotisch wirksame Trophodithiätsäure (TDA). TDA wird von Vertretern unterschiedlicher Gattungen produziert, von denen einige als potenziell probiotische Bakterien in Aquakulturen in Spanien und Dänemark untersucht werden [2].

Im Transregio-Sonderforschungsbereich (SFB) „Roseobacter“ werden aktuell physiologische, ökologische und evolutionäre Aspekte untersucht, wobei für viele Ansätze die Verfügbarkeit von qualitativ hochwertigen Genomen verschiedener *Roseobacter* extrem wichtig ist. Gegenwärtig stammen etwa ein Viertel aller *Roseobacter*-Genome aus dem SFB, darunter viele der geschlossenen Genome. Die Genomsequenzierungsprojekte des SFB schließen die phylogenetisch isoliertesten Vertreter ein [3], aber auch die (zu Projektbeginn) kompletten Gattungen *Leisingera* und *Phaeobacter*, da diese Organismen physiologisch besonders interessant sind [4]. Unsere Arbeiten tragen somit dazu bei, dass die *Roseobacter*-Gruppe eine der genomisch am besten untersuchten Gruppen mariner Bakterien ist.

Klassifikation der *Roseobacter*-Gruppe

Die taxonomische Klassifikation der *Roseobacter*-Gruppe leidet an der mangelnden Auflösung der 16S-rRNA, die meist als ausschließlicher phylogenetischer Marker eingesetzt wird [3]. Während die Familie Rho-

dobacteraceae (die auch nicht-marine Vertreter beinhaltet) gut abgesetzt ist, ist die statistische Unterstützung zur Abgrenzung von einigen Untergruppen und Gattungen innerhalb der Familie recht gering. So lieferte eine bislang unveröffentlichte 16S-rRNA-Analyse mit 245 Arten der Familie im Schnitt lediglich 45 Prozent Bootstrap-Unterstützung pro Ast. Daher ist trotz der in der Literatur verbreiteten Bezeichnung „*Roseobacter* clade“ unklar, ob die *Roseobacter*-Gruppe überhaupt eine geschlossene Abstammungsgemeinschaft bildet. Ferner ist für viele Gattungen mit mehr als einer Art unsicher, ob sie jeweils eine natürliche Gruppe bilden. Diese Schwierigkeiten liegen wohl am Erfolg bei der Isolierung von *Roseobacter*-Stämmen, da ein und dasselbe Gen (das 16S-rRNA-Gen) nun für die Platzierung einer steigenden Zahl von Organismen verwendet wird.

Genomdaten können hier Abhilfe schaffen, da sie wesentlich mehr Merkmale (Sequenzinformation) liefern als die 16S-rRNA [5]. Unsere Analyse von 78 Genomen der Rhodobacteraceae ergab zwischen 2.240 und 5.730 Protein-codierende Gene und 374 bis 740 verschiedene Enzyme pro Genom. Während ca. 400 verschiedene homologe Gene in allen untersuchten Genomen vorkamen (also das Core-Genom bildeten), zeigte die Gesamtheit aller Gene, das heißt das Pangenom, noch keine Tendenz zur Sättigung (**Abb. 2**). Hier wird deutlich, dass die (genomische) Analyse wei-

terer Stämme auch weitere neue Gene und Eigenschaften liefern wird. In der phylogenetischen Analyse solcher genomweiter Datenmatrizen („Supermatrizen“) traten durchschnittliche Bootstrap-Support-Werte bis zu 99 Prozent auf. Wichtig ist hierbei, dass auch Einzelgene, die von horizontalem Gentransfer (HGT) betroffen sind, erfolgreich in phylogenetischen Analysen vieler kombinierter Gene (Supermatrizen) herangezogen werden können [5]. Diese Genomdaten widersprechen u. a. statistisch signifikant der Klassifikation einiger Arten, z. B. innerhalb der Gattungen *Leisingera* und *Phaeobacter*.

Plasmide der *Roseobacter*-Gruppe

Die verfügbaren Genomdaten ergaben, dass die meisten Vertreter der *Roseobacter*-Gruppe Plasmide aufweisen, die oft wichtige Eigenschaften codieren, wie die Produktion der oben genannten TDA [6]. Kürzlich konnten wir zeigen, dass als obligat aerob beschriebene Stämme doch Nitrit reduzieren können und somit ebenfalls zu einer anaeroben Lebensweise befähigt sind. Einige der hier beteiligten Gene sind ebenfalls Plasmid-codiert [4]. Aufgrund der Vielfalt der Plasmide der *Roseobacter*-Gruppe wurde im Rahmen des SFB ein neuartiges Plasmidklassifikationssystem eingeführt, das sich an den Replikationssystemen orientiert [7]; nur Plasmide mit kompatiblen Systemen kommen gemeinsam in derselben Wirtszelle vor. Derzeit wird

im SFB der Zusammenhang zwischen Biofilmbildung und Plasmiden intensiv untersucht. Die Plasmide dürften auch einen erheblichen Beitrag zum Pangenom (**Abb. 2**) der *Roseobacter*-Gruppe leisten.

Polare *Roseobacter*

Der Großteil der bisher sequenzierten *Roseobacter*-Stämme kommt aus den gemäßigten Temperaturzonen, wohingegen derzeit nur zwei psychrophile Isolate aus Packeis vorliegen, die zudem von den entgegengesetzten Polregionen stammen: *Octadecabacter arcticus* und *Octadecabacter antarcticus*. Die Sequenzierung und Analyse der *Octadecabacter*-Genome ergab unter den Vertretern der *Roseobacter*-Gruppe einzigartige Eigenschaften. Hervorzuheben ist hierbei mikrobielles Rhodopsin aus der Gruppe der Xanthorhodopsine. Die Gruppe der Xanthorhodopsine spaltet sich in zwei Untergruppen auf, wobei die Untergruppe II im Rahmen des SFB zum ersten Mal beschrieben wurde [8]. Analysen weltweiter Metagenomdatenbanken zeigten, dass Xanthorhodopsine kein typisch marines Merkmal sind und vor allem in extremen Habitaten vorkommen. Die Untergruppe I ist hierbei eher in Habitaten mit höheren Temperaturen, die Untergruppe II hingegen überwiegend im Eis und bei niedrigen Temperaturen zu finden.

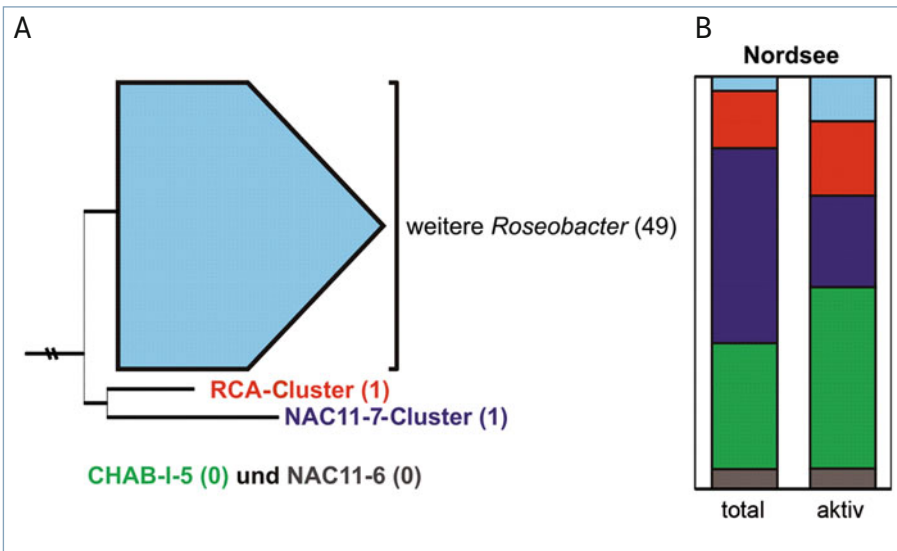
Die Auswertung der *Octadecabacter*-Genome trug auch zu einem besseren Verständnis der Evolution der gesamten Gruppe bei. Diese weist ein umfangreiches Pangenom auf (**Abb. 2**), was die Bedeutung von HGT innerhalb der Gruppe unterstreicht. So sind nur zwei Prozent der Gene der beiden Isolate spezifisch für die Gattung *Octadecabacter* [8]. Eine treibende Kraft scheinen die in der *Roseobacter*-Gruppe weit verbreiteten *gene transfer agents* (GTA) zu sein – Phagen-ähnliche Partikel, welche zufällige Frag-

mente des Wirtsgenoms verpacken und in nah verwandte Bakterien einschleusen. GTAs könnten es Mitgliedern dieser Gruppe ermöglichen, sich an die unterschiedlichsten Umweltbedingungen anzupassen (**Abb. 1**). Bei den polaren *Octadecabacter* spp. wird dieser Effekt durch die ungewöhnlich hohe Anzahl an transposablen Elementen (TE) noch verstärkt. *O. arcticus* besitzt 175 TEs pro Megabase, wohingegen der Mittelwert der *Roseobacter*-Gruppe bei 21 TEs pro Megabase liegt. Es wurde bereits vermutet, dass Meereis als *hot spot* für HGT in marinen Habitaten fungiert, was wir bestätigen konnten. Erste Einblicke in die Genome nicht-polarer *Octadecabacter* unterstützen diese Ergebnisse, da sie deutlich weniger TEs als ihre polaren Verwandten aufweisen.

Metagenomik der *Roseobacter*-Gruppe

Im Rahmen des SFB wurden nicht nur neue Isolate sequenziert und analysiert, sondern auch Diversitätsstudien natürlicher, mariner Bakteriengemeinschaften durchgeführt. So wurde der Einfluss einer Algenblüte auf die aktive Bakteriengemeinschaft in der Deutschen Bucht mittels Pyrosequenzierung von 16S-rRNA-Amplikons untersucht [9]. Hierbei konnten rund 20 Prozent der Sequenzen allein dem RCA(*Roseobacter clade affiliated*)-Cluster, einer abundanten pelagischen *Roseobacter*-Untergruppe, zugewiesen werden. Unsere weiteren Untersuchungen in der Nordsee zeigten, dass pelagische *Roseobacter*-Untergruppen die frei lebende bakterielle Gemeinschaft mit einem Anteil von bis zu 48 Prozent dominieren.

Jedoch konnten von den meisten der hier detektierten pelagischen Untergruppen noch keine Vertreter kultiviert werden. Hierdurch wird deutlich, dass, obwohl bereits ca. 70 Genome verschiedener *Roseobacter*-Vertreter ver-



◀ **Abb. 3:** Vergleich der genomischen Ausstattung vorhandener *Roseobacter*-Genome und Abundanz verschiedener Untergruppen der *Roseobacter*-Gruppe in Umweltproben aus der Nordsee. **A,** Clustering auf der Basis des Genausstattungs (*gene content*) von 51 *Roseobacter*-Vertretern. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der zugrunde liegenden Genomsequenzen an. Evident wird, dass Vertreter der pelagischen Cluster RCA und NAC11-7 sich deutlich von anderen *Roseobacter* unterscheiden. **B,** Zusammensetzung der *Roseobacter*-Gruppe in der Nordsee. „Total“ markiert hierbei die Zusammensetzung auf DNA-Ebene, „aktiv“ auf RNA-Ebene. Es ist zu sehen, dass für die dominanten Gruppen (erkennbar an den Farbmarkierungen) nur wenige (RCA, NAC11-7) oder keine (CHAB-I-5, NAC11-6) Genomsequenzen vorhanden sind und die genomische und vermutlich auch die physiologische Diversität der *Roseobacter*-Gruppe noch nicht repräsentativ erfasst ist.

fürbar sind, die genomische und physiologische Diversität der gesamten Gruppe noch lange nicht komplett erfasst wurde (**Abb. 3**). Diese Schlussfolgerung wird auch durch andere Metagenom-Studien gestützt, in denen gezeigt werden konnte, dass natürliche *Roseobacter*-Populationen in ihren genomischen Eigenschaften stark von denen kultivierter Vertreter abweichen [10]. Im Rahmen des SFB soll auch diese Lücke geschlossen werden; es stehen bereits mehrere Isolate einer der wichtigsten pelagischen Gruppen zur Verfügung, wie z. B. von *Planktomarina temperata*, einem Mitglied des RCA-Clusters [1].

Danksagung

Die Autoren danken ihren Kolleginnen und Kollegen sowie zahlreichen Kooperationspartnern. An den hier vorgestellten Ergebnissen waren im besonderen Maße beteiligt (in alphabetischer Reihenfolge): Marco Dogs, Prof. Dr. Rolf Daniel, Dr. Helge Giebel, Dr. Daniela Kalhöfer, Dr. Hans-Peter Klenk, Dr. Jörn Petersen, Carmen Scheuner, Prof. Dr. Dietmar Schomburg, Prof. Dr. Meinhard Simon, Dr. Sebastian Thole, Marcus Ulbrich, Dr. John Vollmers und Dr. Bernd Wemheuer. Die Projekte wurden bzw. werden unterstützt von der Volkswagen-Stiftung (VW-Vorab) und

der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Rahmen des Sonderforschungsbereichs TRR51 „Roseobacter“.

Literatur

- [1] Giebel H-A, Kalhoefer D, Lemke A et al. (2011) Distribution of *Roseobacter* RCA and SAR11 lineages in the North Sea and characteristics of an abundant RCA isolate. *ISME J* 5:8–19
- [2] Pintado J, Pérez-Lorenzo M, Luna-González A et al. (2010) Monitoring of the bioencapsulation of a probiotic *Phaeobacter* strain in the rotifer *Brachionus plicatilis* using denaturing gradient gel electrophoresis. *Aquaculture* 302:182–194
- [3] Göker M, Klenk H-P (2013) Phylogeny-driven target selection for genome-sequencing (and other) projects. *Stand Genomic Sci* 8:360–374
- [4] Dogs M, Voget S, Teshima H et al. (2013) Genome sequence of *Phaeobacter inhibens* type strain (T5^T), a secondary metabolite producing member of the marine *Roseobacter* clade, and emendation of the species description of *Phaeobacter inhibens*. *Stand Genomic Sci* 9:334–350
- [5] Klenk H-P, Göker M (2010) En route to a genome-based taxonomy of *Archaea* and *Bacteria*? *Syst Appl Microbiol* 33:175–182
- [6] Thole S, Kalhoefer D, Voget S et al. (2012) *Phaeobacter gal-laeciensis* genomes from globally opposite locations reveal high similarity of adaptation to surface life. *ISME J* 6:2229–2244
- [7] Petersen J (2011) Phylogeny and compatibility: plasmid classification in the genomics era. *Arch Microbiol* 193:313–321
- [8] Vollmers J, Voget S, Dietrich S et al. (2013) Poles apart: Arctic and Antarctic *Octadecobacter* strains share high genome plasticity and a new type of xanthorhodopsin. *PLoS One* 8:e63422
- [9] Wemheuer B, Güllert S, Billerbeck S et al. (2013) Impact of a phytoplankton bloom on the diversity of the active bacterial community in the southern North Sea as revealed by meta-transcriptomic approaches. *FEMS Microbiol Ecol*, doi: 10.1111/1574-6941.12230
- [10] Luo H, Löytynoja A, Moran MA (2012) Genome content of uncultivated marine *Roseobacter* in the surface ocean. *Environ Microbiol* 14:41–51

Korrespondenzadresse:

Dr. Thorsten Brinkhoff
 Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM)
 Universität Oldenburg
 Carl-von-Ossietzky-Straße 9–11
 D-26129 Oldenburg
 Tel.: 0441-798-3269
 Fax: 0441-798-3438
 t.brinkhoff@icbm.de

AUTOREN



Sonja Voget

1996–2002 Biologiestudium an der Universität Göttingen; dort 2006 Promotion (Dr. rer. nat.) im Institut für Mikrobiologie und Genetik. Seit 2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Goettingen Genomics Laboratory (G2L) der Universität Göttingen.



Markus Göker

1993–1999 Biologiestudium an der Universität Heidelberg. 2004 Promotion (Dr. rer. nat.), 2008 Habilitation an der Universität Tübingen. Seit 2008 wissenschaftlicher Mitarbeiter des Leibniz-Instituts DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig. Seit 2010 Projektleiter im SFB „Roseobacter“.



Thorsten Brinkhoff

1988–1994 Biologiestudium an der Universität Osnabrück. 1998 Promotion (Dr. rer. nat.) am Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie in Bremen. Seit 1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Chemie und Biologie des Meeres (ICBM) der Universität Oldenburg. 2008 Habilitation im Fachgebiet Mikrobiologie. Seit 2010 Projektleiter im SFB „Roseobacter“.